

Aus dem
Charité Centrum 13 für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Nephrologie und internistische Intensivmedizin
Campus Virchow- Klinikum
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. U. Frei

Habilitationsschrift

Klinische Prüfung von immunologischen Strategien zur Therapie von Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité- Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Jörg Christian Schefold

geboren am 16.06.1975 in Frankfurt am Main

Eingereicht: Februar 2010

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag: 15. Dezember 2010

Dekanin: Frau Prof. Dr. med. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Trautwein, Aachen

2. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Hartung, Baltimore, USA

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1.	Sepsis: historischer Überblick.	5
1.2.	Sepsis: Definition, Stadien und epidemiologische Bedeutung.	6
1.3.	Leitliniengerechte Therapie: schwere Sepsis/ septischer Schocks.	7
1.4.	Immunologische Biomarker bei Sepsis.	11
1.5.	Immunpathogenese der Sepsis und Einfluss des zellulären Immunsystems.	14
2	Eigene Arbeiten	17
2.1.	Selektive LPS, C5a und IL-6- Immunadsorption zur Rekonstruktion der monozytären Immunkompetenz bei Patienten mit Sepsis: eine Pilotstudie.	17
2.2.	Wiederherstellung der monozytären Immunkompetenz mittels Immunstimulation (GM-CSF) bei septischen Patienten: eine multizentrische randomisierte placebo-kontrollierte Studie.	18
2.3.	GM-CSF Therapie zur Behandlung der sepsis-assoziierten Immunsuppression ist assoziiert mit reduzierter IDO-Aktivität und Kynureninen in Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock.	19
2.4.	Phänotypveränderungen und beeinträchtigte Funktion von dendritischen Zellen bei Patienten mit Sepsis: eine prospektive Beobachtungsstudie.	20
2.5.	Interleukin-6 Messung mittels point-of-care Technik bei Patienten mit Sepsis: eine Vergleichsuntersuchung zum Goldstandard (ELISA).	21
3	Diskussion	22
4	Zusammenfassung	27
5	Literaturverzeichnis	30
6	Danksagung	45
7	Eidesstattliche Erklärung	46

Abkürzungsverzeichnis

ACCP/ SCCM	American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Med
ACTH	Adrenocorticotropin
APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score
APC	Aktiviertes Protein C
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
C(5a)	Komplementfaktor (5a)
CD	Cluster of Differentiation
CoA	KoenzymA
CRP	C-reaktives Protein
EGDT	Early goal directed therapy
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie
HC	Hydrokortison
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HMGB	High Mobility Group Box
HR	Hazard Ratio
HZV	Herzzeitvolumen
IDO	Indoleamine-2,3-dioxygenase
IFNGR	Interferon-gamma Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IIT	Intensivierte Insulintherapie
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
MAD	Mittlerer arterieller Blutdruck
mHLA-DR	HLA-DR Expression auf Monozyten
MHC	Major Histocompatibility Complex
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MOV	Multiorganversagen
NAD	Nikotinamiddinukleotid
NFkB	Nuclear Factor Kappa B
NK	Natural Killer Cells, Killerzellen
NO	Stickstoffmonoxid
OR	Odds Ratio
PaCo ₂	Partialdruck des arteriellen Co ₂
PCT	Procalcitonin
POC	Point-of-care (Test)
ROS	Reactive oxygen species, Sauerstoffradikale
ScvO ₂	Zentralvenöse Sauerstoffsättigung
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	Sepsis-Related Organ Failure Assessment Score
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
ZVD	Zentraler Venendruck

1. Einleitung

Mit ca. 60.000 Todesfällen/ Jahr zählen septische Erkrankungen zu den Haupttodesursachen in Deutschland. Durch eine systemische Infektion kommt es bei schwerer Sepsis/ septischem Schock zu einer ausgeprägten pro-inflammatorischen Immunantwort. Als Folge dieser raschen und massiven Mediatorfreisetzung kann konsekutiv ein (Multi-) Organversagen entstehen, welches die Behandlung kompliziert und die Prognose limitiert. Bei rascher intensivmedizinischer Versorgung wird diese initiale Phase heute häufig überlebt. Im Verlauf entwickelt sich in vielen Fällen ein anti-inflammatorisches Syndrom mit Zeichen eines „Immunorganversagens“, welches auch als „Immunparalyse“ bezeichnet wird und derzeit im Rahmen des (Multi-)Organversagens in Ermangelung therapeutischer Optionen meist unbeachtet bleibt. Die Persistenz einer „Immunparalyse“ ist mit einer erhöhten sekundären Infektionsrate, kompliziertem Verlauf und einer erhöhten Mortalität assoziiert.

Bislang zielten immunmodulierende Therapiestudien bei Sepsis meist darauf ab, innerhalb eines großen Kollektivs septischer Patienten einen spezifischen pro-inflammatorischen immunologischen Mediator zu blockieren bzw. zu reduzieren. Diese teils großangelegten Studien verliefen zumeist frustan. Ursachen des Versagens von „single-mediator“ Strategien scheinen in der Pleiotropie und Redundanz entsprechender Mediator-/ Zytokinnetzwerke und in einer unzureichenden immunologischen Charakterisierung entsprechender Studienpatienten begründet zu sein. Eine adäquate immunologische Charakterisierung von Studienpatienten scheint nötig, da immunologische Interventionen den Nachweis einer immunologischen Effizienz schulden. Dies ist insbesondere im Hinblick auf das heterogene Kollektiv septischer Patienten der Fall und begründete den Drang Biomarker zu entwickeln, welche eine immunologische Charakterisierung und Prognoseabschätzung zulassen.

Monozyten stellen ein Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität dar und nehmen eine zentrale Rolle in der Immunantwort bei Sepsis ein. Die standardisierte Messung der mHLA-DR Expression dient als Surrogatparameter für monozytäre Funktionen und erlaubt eine immunologische Charakterisierung entsprechender Patienten. Erholung einer initial reduzierten mHLA-DR Expression deutet auf eine Normalisierung der zellvermittelten Immunität bzw. eine monozytäre Reaktivierung hin. Basierend auf experimentellen Daten des Instituts für medizinische Immunologie haben wir diesen Ansatz in die Klinik geführt und nachfolgend immunmodulatorische Interventionen bei septischen Patienten mit definiertem

immunologischem Status getestet. In proof-of-concept Studien untersuchten wir, ob eine Reduktion inhibitorischer Substanzen (LPS, IL-6, C5a) bzw. eine immunstimulierende Therapie (GM-CSF) zu einer Balancierung der monozytären Immunität (mHLA-DR Expression) führt. In der ersten immunmonitoring-basierten randomisierten placebo-kontrollierten Studie zur Immunstimulation bei Sepsis konnten wir zeigen, dass eine therapeutische Beeinflussung des monozytären Versagens möglich ist. Darüber hinaus wurden günstige Effekte auf den klinischen Verlauf der behandelten Patienten beobachtet. Die durchgeführten „proof-of-concept“ Studien erlauben jedoch aufgrund ihrer statistischen Kraft keine Aussage bezüglich klinischer Endpunkte. Unsere Beobachtungen bilden nun die Grundlage für die Planung größerer Therapiestudien, welche die Effekte einer immunologischen Therapie auf harte klinische Endpunkte (Mortalität) testen sollen.

1.1. Sepsis: historischer Überblick.

Der Begriff „Sepsis“ wurde vermutlich von Hippokrates von Kos (ca. 460-366 a.D.) geprägt und stammt vom griechischen Begriff „σηπω“ ab (verderben, faul machen). Hippocrates erkannte den Unterschied zwischen lokaler und generalisierter Entzündung und identifizierte Fieber als ein Hauptmerkmal der „generalisierten Entzündung“. In der antiken Literatur finden sich insbesondere Beschreibungen von schweren Wundinfektionen („Wundfäule“). Verschiedene Theorien über deren Ätiologie wurden aufgestellt. Bis in die Neuzeit wurde die Auffassung vertreten, dass die Wundfäule durch „Substanzen aus der Luft“ übertragen wird. 1863 beschrieb Ignaz Semmelweis (1818-1865) dass „Leichenteilchen welche in die Blutbahn gelangen“ die Erkrankung „Kindsbettfieber“ (Sepsis puerperalis) „verursachen“. 1880 gelang dem französischen Naturwissenschaftler Louis Pasteur (1822-1895) der Nachweis von „Einzellern“ in Blutproben bei Sepsis puerperalis. Er postulierte, dass entsprechende Krankheitssymptome auf eine systemische Antwort des Organismus zur Bekämpfung der Mikroben zurückzuführen sind. 1914 legte Hugo Schottmüller (1867-1936) den Grundstein für die moderne Sepsis-Definition: „Eine Sepsis liegt 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“. Er postulierte, dass sich eine Therapie nicht gegen „im Blute kreisenden Bakterien“, sondern vornehmlich gegen „frei werdenden Bakterien-Toxine“ richten sollte [1]. Roger Bone (1941-1997) legte dann den Grundstein für die heute gültige Sepsisdefinition: „Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des

Organismus auf diese Invasion“ und plädierte für eine Konsensusdefinition [2]. 1991 wurde in der internationalen ACCP/ SCCM Konsensuskonferenz unterschiedlichen Formen und Schweregrade der Sepsis definiert bzw. standardisiert [3].

1.2 Sepsis: Definition, Stadien und epidemiologische Bedeutung.

Die Begriffsdefinition der unterschiedlichen Formen und Schweregrade der Sepsis umfasst die Begriffe SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock. Zudem wurde das Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) definiert. Die Begriffe definieren unterschiedliche Schweregrade, welche wiederum mit der Mortalität entsprechender Patienten korrelieren. Die Begriffe „schwere Sepsis“ bzw. „septischer Schock“ beschreiben das Vorhandensein mindestens einer Organdysfunktion bzw. das Auftreten eines volumenrefraktären Kreislaufversagens (Tab. 1) [3-5].

SIRS	Klinischer Zustand, der durch das Vorliegen von mindestens zwei der folgenden Kriterien charakterisiert ist: - Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$, - Herzfrequenz $>90/\text{min}$, - Atemfrequenz $>20/\text{min}$ oder $\text{PaCO}_2 <32 \text{ mmHg}$, - Leukozyten $>12000/\text{mm}^3$ oder $<4000/\text{mm}^3$
Sepsis	SIRS hervorgerufen durch eine Infektion
Schwere Sepsis	Sepsis und Vorliegen mindestens einer Organdysfunktion
Septischer Schock	Sepsis und Vorliegen eines volumenrefraktären Kreislaufversagens
MODS	Veränderte Organfunktion beim akut kranken Patienten, in der Art, dass die Homöostase nicht ohne Intervention aufrechterhalten werden kann

SIRS - Systemic Inflammatory Response Syndrome, PaCO_2 - arterieller Kohlendioxidpartialdruck, MODS - Multiorgandysfunktions-Syndrom.

Tabelle 1: Sepsis: Definitionen in Anlehnung an die ACCP/ SCCM Konsensuskonferenzen von 1991, 2001 [3, 5].

Epidemiologische Untersuchungen zeigen, dass Sepsis die häufigste Todesursache kritisch kranker Patienten auf nicht-kardiologischen Intensivstationen ist [6-9]. Die Inzidenz der Sepsis und des sepsis-induzierten Multiorganversagens ist in den letzten Jahren kontinuierlich gestiegen [7, 8, 10, 11]. US-amerikanische Zahlen gehen von ca. 750.000 Fällen einer schweren Sepsis in den USA pro Jahr aus. 2001 lag die Gesamtmortalität der schweren Sepsis in den USA bei 28,6 % [12]. Martin et al. beschreiben eine Zunahme der Inzidenz um 9 % pro Jahr in den USA im Zeitraum von 1977 bis 2000; eine Inzidenz von 50-95 Fällen pro 100.000

Einwohner wird 2003 angegeben [7]. Mehr als 10% aller intensivstationären Aufnahmen werden aufgrund eines septischen Schocks veranlasst [11, 13].

Epidemiologische Untersuchungen aus Deutschland zeigen, dass ca. 75.000 Einwohner (110 von 100.000) pro Jahr an einer schweren Sepsis und ca. 79.000 Einwohner (116 von 100.000) an einer Sepsis erkranken [6]. Die 90- Tage Sterblichkeit von Patienten mit schwerer Sepsis beträgt ca. 54 %. Mit ca. 60.000 sepsis-bedingten Todesfällen/ Jahr stellen septische Erkrankungen die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar. Atemwegsinfektionen (63 %) und intra-abdominelle Infektionen (25 %) sind die Hauptursachen [6, 7, 10, 11, 14]. Dies hat erhebliche gesundheitsökonomische Auswirkungen. Die Gesamtbehandlungskosten werden für Deutschland auf ca. 1,8 Milliarden Euro/ Jahr beziffert [15]; etwa 30 % der intensivmedizinischen Behandlungskosten entfallen auf die Diagnose „schwere Sepsis“ [16].

Die Inzidenz des septischen Schocks ist bei Patienten in der sechsten Lebensdekade am höchsten [11]. Prädisponierende Faktoren sind maligne Grunderkrankung, erworbene/ angeborene Immundefizienz, chronisches Organversagen, iatrogene [6, 7, 10-12, 14] und genetische Faktoren: männliches Geschlecht [17], ethnische Gruppenzugehörigkeit [7] und Polymorphismen in Genen, welche für die Regulation der Immunität verantwortlich sind [18]. Klinische Studien [19, 20] und epidemiologische Arbeiten [13, 14] zeigen, dass eine bakterielle Sepsis in ca. 30- 50 % der Fälle durch gram-positive Organismen (insbesondere Staphylokokken, Streptokokken) und in ca. 25- 30% durch Mischinfektionen bedingt ist. Die Rate gram-negativer Infektionen und die Rate an durch multiresistente Bakterien und Pilzinfektionen verursachten Infektionen wird mit ca. 25% angegeben [10, 21]. Die Rate an Pneumonien, Infektionen mit multiplen Foci und die Rate der nachgewiesenen Bakteriämien nimmt derzeit zu [7, 10]. Insgesamt sind nur etwa 30% der Blutkulturen positiv [22]. Wichtig scheint, dass der Nachweis entsprechender Keime nicht grundsätzlich auf deren kausale Rolle schließen lässt. In bis zu 30-40 % aller Fälle gelingt keine Erregeridentifizierung [9, 23]. Dies ist insbesondere bei antibiotischer Vorbehandlung der Fall [6, 11, 14].

1.3. Leitliniengerechte Therapie: schwere Sepsis/ septischer Schock

Die Therapie der schweren Sepsis und des septischen Schocks sollte in Anlehnung an internationale (International Sepsis Forum, ISF und Surviving Sepsis Campaign, SSC) [24] bzw. nationale [25, 26] Empfehlungen erfolgen. Die 2006 publizierte S2-Leitlinien der Deutschen Sepsisgesellschaft sprechen gemäß entsprechender Evidenzgrade Empfehlungen

der Grade A-E aus [25, 26]. Die frühzeitige Identifizierung entsprechender (Risiko-) Patienten bzw. eine frühe Diagnosestellung ist prognoserelevant [27-29]. Die Empfehlungen zur Behandlung von septischen Patienten zielen insbesondere auf die frühzeitige supportive intensivmedizinische (organ-)unterstützende Therapie, inklusive extrakorporaler Organunterstützungsverfahren. Eine frühe Fokusidentifizierung bzw. Fokussanierung ist notwendig [25, 26, 30]. Frühzeitig (< 1h) muss eine kalkulierte bzw. im Verlauf gezielte antibiotische Therapie eingeleitet werden. Eine initial inadäquate antibiotische Therapie ist mit einer erhöhten Sterblichkeit assoziiert [29, 31]; auf die lokale Resistenzlage ist zu achten. Ausreichende Volumengabe bzw. frühe zielgerichtete zirkulatorische Optimierung [32] sind weitere Basismaßnahmen [24, 33]. Nachfolgend werden die wichtigsten Studien/Therapieprinzipien kurz dargestellt.

Frühe zielgerichtete Therapie („early goal directed therapy“)

Eine randomisierte Studie an 263 Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock konnte 2001 zeigen, dass eine frühzeitige („early goal directed therapy“) an Zielkriterien definierte Therapie (u.a. Monitoring von ZVD, MAD, ScvO₂ und Urinausscheidung) die Krankenhaussterblichkeit von 46.5 % auf 30.5 % (p=0.009) senkt. Diese Therapie sollte vor Aufnahme auf die Intensivstation eingeleitet werden und umfasst eine Vorlast-/ HZV-Optimierung. Adäquate Volumentherapie bzw. Transfusion, ggf. Gabe von Inotropika (Dobutamin) und Aufrechterhaltung eines adäquaten Organperfusionsdrucks (Noradrenalin) sollten beachtet werden [32].

Aktiviertes Protein C

Aktiviertes Drotrecogin alpha (rekombinantes humanes aktiviertes Protein C, APC) hat anti-thrombotische (Faktor Va, VIIIa Inhibition), anti-inflammatorische und pro-fibrinolytische Eigenschaften. APC wurde in einer multizentrischen doppel-verblindeten placebo-kontrollierten randomisierten Studie an 1690 Patienten mit schwerer Sepsis untersucht (PROWESS) [19]. Die PROWESS-Studie zeigte eine signifikante Reduktion der totalen 28-Tage Mortalitätsrate von 30.8 % auf 24.7 % in der Behandlungsgruppe (p=0.005; Reduktion des RR im 28-Tage Mortalitätsrisikos um 19.4 %, 95 % CI: 6.6- 30.5). Insbesondere Patienten mit einem initial hohen Mortalitätsrisiko (APACHE II Score \geq 25, Mehrorganversagen) profitieren von einer Therapie mit APC [19]. Dieser Effekt war unabhängig von der Höhe der initialen Protein C Spiegel. Einjahresüberlebendenzahlen zeigen, dass in der Hochrisikogruppe (APACHE II Score \geq 25) der Mortalitätseffekt über den Studienzeitraum hinaus erhalten bleibt

(48 % vs. 59%, RR: 0.73, 95 % CI: 0.60- 0.88). Bei Patienten mit initialem APACHE II Score <25 ist die APC-Behandlung mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Dieser Effekt bleibt ebenfalls über den Studienzeitraum erhalten (1 Jahres RR: 1.24, 95 % CI: 0.97- 1.58). Die randomisierte doppel-verblindete placebo-kontrollierte Nachfolgestudie ADDRESS [34] untersuchte 2640 Patienten (geplant 11440 Patienten, Abbruch nach Interimsanalyse) mit schwerer Sepsis ohne erhöhtes Mortalitätsrisiko (APACHE II Score <25 oder 1-Organversagen). Die 28-Tage Mortalität war hier 18.5 % (243/1333) in der APC-Gruppe und 17.0 % (221/1307) in der Placebogruppe (p=0.34; RR: 1.08, 95% CI: 0.92- 1.28) [34]. Die Rate schwerer Blutungsepisoden war in der APC-Gruppe erhöht. Daten der Effizienz- und Sicherheitsstudie ENHANCE [35] zeigen, dass die indizierte Gabe von APC frühzeitig (< 24 h) beginnen sollte. Es bleibt festzuhalten, dass basierend auf der aktuellen Datenlage eine APC-Behandlung bei Patienten mit Mehrorganversagen (≥ 2 Organe) und APACHE II Score >25 unter Beachtung der Kontraindikationen zeitnah begonnen werden sollte. Eine APC-Behandlung ist bei Patienten ohne erhöhtes Mortalitätsrisiko und bei pädiatrischen Patienten (RESOLVE [36]) nicht indiziert. Eine begleitende Therapie mit niedrig dosiertem Heparin kann erfolgen (XPRESS Studie, n=1935 Pat. mit erhöhtem Mortalitätsrisiko). Das Risiko für leichte Blutungen, aber nicht das Risiko für schwerwiegende Blutungen ist dann erhöht [37].

Kortikosteroidtherapie in der Sepsis

Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse ist an der Regulation der sepsis-induzierten Immunantwort durch Beeinflussung der Zahl und Funktion von Leukozyten-Subpopulationen, Zytokinen und NO-Produktion beteiligt [38-40]. Bei Sepsis reduzieren Kortikosteroide die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, die Aktivierung von Endothelzellen und neutrophilen Granulozyten [40, 41] und inhibieren die Akute-Phase-Reaktion [38, 40, 41]. TNF- α und andere Zytokine wirken in der Sepsis suppressiv auf die ACTH-induzierte Kortisolproduktion [42] und beeinträchtigen die periphere intrazelluläre Kortisolwirkung [43, 44]. Septische Patienten erleiden daher häufig eine relative und/oder absolute Nebennierenrindeninsuffizienz [38, 45]. In verschiedenen Tiermodellen wurde gezeigt, dass die Gabe von hoch- [46] und niedrig-dosierten [47, 48] Kortikosteroiden das Überleben septischer Tiere verlängert. Klinische Studien zeigen keine oder adverse Effekte auf die Mortalität septischer Patienten unter hochdosierten (meist initiale Bolusgabe) Kortikosteroiden [49]. Die bislang gültige Empfehlung zur niedrig-dosierten (200- 300mg/d) Gabe von Hydrokortison bei septischem Schock basierte auf Daten einer randomisierten placebo-kontrollierten Studie [20]. Hier erfolgte in der Behandlungsgruppe eine 6-stündliche

i.v.-Gabe von 50mg Hydrokortison plus 50 µg/d Fludrokortison (p.o.) nach ACTH-Test zwecks Identifizierung von Patienten mit relativer Nebennierenrindeninsuffizienz („Non-responder“). Eine Reduktion der 28-Tage Mortalität (63% auf 53%, HR 0.67 [95% CI 0.47-0.95], p=0.02) wurde nach Cox-Adjustierung um 6 Variablen in der Interventionsgruppe beobachtet [20]. Bei Patienten ohne Nebennierenrindeninsuffizienz („Responder“) zeigte sich eine nichtsignifikante Zunahme der Sterblichkeit [20]. Eine kürzlich publizierte multizentrische randomisierte Studie (CORTICUS) [50] zeigt, dass Hydrokortison die 28-Tage-Mortalitätsrate nicht beeinflusst (bei „Non-Responndern“ und im Gesamtkollektiv). Gabe von niedrig-dosiertem Hydrokortison führte jedoch zu einer erhöhten Rate an sekundären Infektionen/ sekundärer Sepsis [50]; ein Effekt, der zum Teil durch inhibierte Monozyten-/ Makrophagenfunktion erklärt werden könnte [51]. Ein Effekt auf die sekundäre Infektionsrate wurde jedoch in einer Metaanalyse nicht bestätigt [38]. Hydrokortison erhöht zudem das Hyperglykämie- und Hybernatriämie- Risiko [50]. Niedrig-dosiertes Hydrokortison bietet bei ausgeprägtem Kreislaufversagen [52] oder Lungenversagen [53] eine therapeutische Option. Konsensusempfehlungen folgend wird ein genereller Einsatz von Hydrokortison bei schwerer Sepsis/ septischem Schock im Rahmen der Standardtherapie nicht empfohlen [24, 28, 54].

Glykämiekontrolle bei Sepsis

Hyperglykämie und Insulinresistenz treten bei kritisch kranken Patienten gehäuft auf und sind mit erhöhter Morbidität und Mortalität assoziiert [55-58]. Studien und Metaanalysen zur glykämischen Kontrolle bei kritisch kranken Patienten gelangen zu diskrepanten Aussagen [59, 60]. Basierend auf zwei randomisierten Studien wurde zunächst eine intensivierete Insulintherapie (IIT, Ziel-Blutglukosewert 80-110 mg/dl) bei kritisch kranken chirurgischen [61] und medizinischen [62] Intensivstationspatienten empfohlen. Eine Behandlung mittels IIT führte in beiden Patientenkollektiven zu einer Morbiditätsreduktion. Im chirurgischen, nicht aber im medizinischen Patientenkollektiv war zudem eine Mortalitätsreduktion zu verzeichnen [61, 62]. Eine 2008 publizierte Metaanalyse [59] (29 randomisierte Studien) konnte keinen Unterschied in der Krankenhaussterblichkeit bei kritisch kranken Patienten (n=8432), welche mit oder ohne intensivierete Insulintherapie (IIT, Ziel-Glukosewerte 80-110 mg/dl) bzw. einer moderaten Hyperglykämiekontrolle (Ziel-Glukosewerte <150 mg/dl) behandelt wurden, feststellen (21.6% vs. 23.3%, HR 0.93; 95% CI: 0.85-1.03). Ein Unterschied zwischen chirurgischen (8.8% vs. 10.8%, HR 0.88, 95% CI: 0.63-1.22) und medizinischen Intensivstationspatienten war nicht zu detektieren (26.9% vs. 29.7%, HR 0.92, 95% CI: 0.82-1.04). Die Glykämiekontrolle führte nicht zu einer Absenkung des Risikos für

einen Bedarf an Nierenersatztherapie, jedoch zu einem signifikant niedrigeren Risiko eine „Septikämie“ zu erleiden (10.9% vs. 13.4%, HR 0.76, 95% CI: 0.59-0.97) und zu einem signifikant erhöhten Hypoglykämierisiko [59]. In einer multizentrischen randomisierten Studie (VISEP) konnten ebenfalls keine günstigen Effekte einer IIT auf die Morbidität und Mortalität von Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock gezeigt werden [63]. Eine um den Faktor 6 erhöhte Rate an schweren Hypoglykämien war festzustellen. Kürzlich publizierte Daten der NICE-SUGAR Studie [64, 65] zeigen (n=6104 Patienten), dass die 90-Tage Mortalität der Subgruppe von Patienten mit liberaler Einstellung der Glukosespiegel (Ziel-Spiegel ≤ 180 mg/dl, n=3050) im Vergleich zu IIT-Patienten (n=3054) signifikant reduziert war (HR für IIT 1.14, 95% CI: 1.02- 1.28, p=0.02). Die Rate schwerer Hypoglykämien war in der IIT-Gruppe erhöht. Signifikante Unterschiede bezüglich der Behandlungs- und Beatmungsdauer, oder der Dauer der Nierenersatztherapie wurden nicht beobachtet [64]. Auch wenn die genannten Studien teils kontroverse Ergebnisse zeigen und derzeit diskutiert werden [65-74] kann eine IIT Behandlung im Rahmen der Standardtherapie derzeit nicht empfohlen werden [24, 27, 28].

1.4. Immunologische Biomarker bei Sepsis.

Biomarker werden bei Sepsis zur Diagnosefindung, Risikostratifizierung, Verlaufskontrolle und Therapiesteuerung eingesetzt. Neben unspezifischen Entzündungs-/ Akutphasemarkern (Leukozytenzahl, CRP) stehen Biomarker mit hoher Spezifität und Sensitivität (PCT) zur Verfügung [75]. Das häufig eingesetzte CRP hat aufgrund seiner langen Induktionszeit (bis 48h) und Persistenz erhöhter Spiegel keine Bedeutung sowohl in der Frühdiagnose, als auch in der Verlaufs- und Prognosebeurteilung bei Sepsis [76, 77]. Diese konventionellen Marker lassen keinen Rückschluss auf die jeweilige immunologische Situation bei Sepsis zu (vergl. Kapitel 1.4., 1.5). Zelluläre immunologische Funktionsmarker (mHLA-DR) wurden in den letzten Jahren entwickelt und deren Testung standardisiert [78, 79]. Es bietet sich nun die Möglichkeit Patientenkollektive zu identifizieren, welche von einer immunmodulatorischen Therapiestrategie profitieren könnten [80, 81]. Der Stellenwert genomischer Analytik und PCR-basierter mikrobiologischer Diagnostik bei Sepsis bleibt abzuwarten.

Procalcitonin

PCT ist ein Prohormon (116 Aminosäuren, 13kDa), welches bei gesunden Individuen in der Schilddrüse gebildet und nicht in die Zirkulation abgegeben wird (Plasmaspiegel <0.1 ng/ml)

[82]. PCT wird rasch (1-2 h) und ausgeprägt (bis 10.000fach), insbesondere bei systemischen bakteriellen Infektionen, induziert [83, 84]. PCT-Serumspiegel korrelieren mit dem Erkrankungsschweregrad bei Sepsis und weisen eine hohe Sensitivität und Spezifität auf (89-96% bzw. 78-94%, cut-off: 1.1-2.0 ng/ml). Der Stellenwert von PCT als sensitivem und spezifischem Marker bei Sepsis wurde belegt [76, 77, 83]. PCT kann darüber hinaus helfen die antibiotische Therapie zu steuern [85].

Interleukin 6

IL-6 ist ein von Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten exprimiertes pleiotropes Zytokin, dessen Spiegel bei Sepsis rasch ansteigen (Plasmaspitzenpiegel nach 2h) [86]. IL-6 unterstützt die Initiierung einer adaptiven Immunantwort via T-Zellaktivierung/ -proliferation und B-Zelldifferenzierung [86, 87]. IL-6-Plasmakonzentrationen korrelieren mit dem Schweregrad der Erkrankung bei Patienten mit Sepsis [88]. Eine Subanalyse der MONARCS (anti-TNF- α) Therapiestudie zeigte in der Placebogruppe eine enge Korrelation von IL-6 Plasmaspiegeln mit der Schwere der Organdysfunktion und der Prognose [89, 90]. Die PROWESS Studie ergab jedoch keinen Hinweis auf eine prognostische Aussagekraft von IL-6, wenn die Patienten post-hoc nach IL-6 Spiegeln stratifiziert wurden [19]. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit, schnellen Induktionszeit und der intra-individuellen Varianz ist IL-6 im Rahmen der Frühdiagnostik insbesondere bei Neonaten und zur individuellen Verlaufsbeobachtung geeignet [85, 87, 91, 92].

LPS-bindendes Protein (LBP)

LBP ist ein lösliches Akut-Phase-Protein, welches LPS-signaling über Bindung an den TLR-4-Komplex vermittelt. LBP ist ein sensibler, jedoch nicht-spezifischer Index für Endotoxämie, wird insbesondere bei gram-negativen Infektionen induziert, und trägt zur Vermittlung einer LPS-abhängigen mononukleären Immunantwort bei [93]. Die hepatische und epitheliale Induktion von LBP Protein dauert ca. 36h. LBP kann jedoch eine infektiöse nicht von einer nicht-infektiösen Genese differenzieren [94]. Die Studienlage bei Sepsis ist begrenzt.

Monozytäre HLA-DR Expression (mHLA-DR)

HLA-DR gehört zu den MHC-Klasse II Molekülen. Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass eine reduzierte mHLA-DR Expression mit einer reduzierten Antigenpräsentation und

verminderten Zytokinfreisetzung einhergeht [95-98]. Bei Sepsis kann der Verlust der mHLA-DR Expression im Rahmen einer globalen transkriptionellen Inhibition eines zur Antigenpräsentation über MHC Klasse II benötigten Gen-Panels erfolgen [99]; insbesondere Class II Transcriptor Activator (CIITA) Gene sind hier involviert [99-101]. LPS, Immunsuppressiva [95, 96, 102, 103], IL-10 [96, 103-107], Kortikosteroide [51, 99, 108], und Katecholamine [109] induzieren eine verminderte Transkription. Reduzierte mHLA-DR Expression ist ein Prädiktor für die Entwicklung von (sekundären) Infektionen, septischen und assoziierten Komplikationen bei Patienten mit Trauma [110-115], Verbrennung [116-118], kardiopulmonaler Bypassoperation [119], Pankreatitis [120-122], Transplantation [123, 124], neurochirurgischen Eingriffen [125, 126], schwerer Sepsis/ septischem Schock [51, 95, 100, 114, 127-130] und bei Patienten auf der Intensivstation [114, 124, 131]. Der prädiktive Wert einer mHLA-DR Bestimmung bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock für Mortalität ist noch nicht endgültig geklärt [95]. Die Mehrzahl [51, 127, 128, 132-136], nicht jedoch alle Arbeiten [137-139], zeigen eine Korrelation von erniedrigter mHLA-DR Expression zur Mortalität septischer Patienten. Die zum Teil konträren Ergebnisse sind zum Teil auf unterschiedliche Messzeitpunkte [127] und auf eine damals fehlende Standardisierung der Methode [140] zurückzuführen [78, 79, 95]. Der aktuell verfügbare standardisierte Test hat einen Variationskoeffizienten von 3% (intra-lab) bzw. 18% (inter-lab) und ist unabhängig vom verwendeten Durchflusszytometer bzw. dessen Einstellungen [140] und erlaubt die quantitative Messung von pro Zelle markierten Oberflächenmolekülen. Zuvor wurde der Prozentsatz positiver Monozyten bzw. die „mean fluorescence intensity, MFI“ angegeben; die erhobenen Daten waren laborspezifisch. Ein inter-lab Vergleich war nicht möglich [136, 140]. Weitere Studien bezgl. optimaler cut-off Werte bzw. prädiktiver Aussagekraft sind notwendig (vergl. Kapitel 1.4, 1.5).

Ex-vivo Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α Spiegel

LPS der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien wirken über toll-like Rezeptoren auf Monozyten, Granulozyten und Endothelzellen. Die Sekretion der Monokine (insbes. TNF- α , IL-10) kann nach *in vitro* LPS-Stimulation (500 pg/ml) und Inkubation in Zellkulturmedium gemessen werden und gibt Auskunft über die monozytäre Immunkompetenz [95, 119]. *Ex vivo* TNF- α Freisetzung wurde als Biomarker für monozytäre Immunkompetenz in klinischen Studien eingesetzt [80, 81, 95, 119, 141]. Großangelegte Studien fehlen.

1.5. Immunpathogenese der Sepsis und Einfluss des zellulären Immunsystems.

Sepsis ist charakterisiert durch eine massive Freisetzung endogener und exogener Mediatoren als Antwort auf eine durch lokale immunologische Abwehrmechanismen nicht kontrollierte Infektion [10, 142, 143]. Es kommt zur Induktion von multiplen pleiotropen pro- (u.a. TNF- α) und anti-inflammatorischen (IL-10, transforming growth factor- β , TGF- β) Immunmediatoren in regulierten, dynamischen Kaskaden. Bei Persistenz des inflammatorischen Stimulus kommt es zur Induktion anti-inflammatorischer Mechanismen (compensatory antagonistic response syndrome, CARS) [144]. CARS ist durch erhöhte Plasmaspiegel anti-inflammatorischer Mediatoren (insbes. IL-10) gekennzeichnet [10, 40, 79, 142, 143]. Fortbestehende Anti-Inflammation bei nicht überwundener Infektion kann eine Deaktivierung von Immunzellen induzieren. Diese funktionelle Deaktivierung wird als „Immunparalyse“ bezeichnet [95, 130, 145, 146] und umfasst Monozyten/ Makrophagen [95], dendritische Zellen [147] und Lymphozyten [148-150].

Monozyten/ Makrophagen

Zentrale Monozyten-/ Makrophagenfunktionen bei Sepsis sind Erkennung, Aufnahme, Abtötung von Mikroorganismen und Antigenpräsentation (Expression von HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ, CD80/ 86) zur Einleitung einer adaptiven Immunantwort. Die Deaktivierung von Monozyten umfasst eine eingeschränkte Phagozytose, verminderte Antigenverarbeitung/-präsentation und eine reduzierte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine aus Monozyten [95]. Der Oberflächenmarker mHLA-DR kann standardisiert quantitativ gemessen und als Surrogatmarker für monozytäre Immunkompetenz herangezogen werden. Reduzierte mHLA-DR Expression reflektiert ein funktionelles Versagen der zellulären Immunität [95, 145, 146, 151] und ist -bei Persistenz- mit einer schlechten Prognose assoziiert [51, 127-129]. Die Aussagekraft der Untersuchung ist jedoch eingeschränkt, wenn diese in der Frühphase der Erkrankung (<48 h nach Symptombeginn) durchgeführt wird und wenn keine Verlaufskontrolle erfolgt [127] (vergl. Kapitel 1.3). Normalerweise sind ca. 10-15 % der zirkulierenden Monozyten CD16 positiv (Fc γ Rezeptor III positiv). CD16 positive Monozyten exprimieren höhere Level an HLA-DR und pro-inflammatorischen Zytokinen als CD16 negative Zellen. CD16 positive Monozyten expandieren in der Sepsis und werden als pro-inflammatorische Monozyten bezeichnet [152]. Wir konnten zeigen, dass neben „klassischen“ Monozyten auch CD16 positive Monozyten von einer funktionellen Deaktivierung bei Patienten mit Sepsis betroffen sind [147].

Dendritische Zellen (DZ)

DZ nehmen als potente antigen-präsentierende Zellen eine Schlüsselrolle in der angeborenen und erworbenen Immunität ein [153]. Phänotypisch und funktionell unterschiedliche Subtypen wurden identifiziert: myeloide (MDZ) und plasmazytoide DZs (PDZ) [154]. Verschiedene Tiermodelle konnten zeigen, dass eine verminderte DZ-Funktion mit erhöhter Krankheitsschwere und adverserem Outcome bei Sepsis assoziiert ist [153, 155-157]. Bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock wurde eine erhöhte DZ-Apoptoserate in der Milz nachgewiesen [158-160]. Eine apoptose-induzierte Verminderung der zirkulierenden DZ-Zahl ist mit erhöhter Krankheitsschwere und erhöhter Mortalität bei septischen Patienten assoziiert [153, 161-163]. Im Mausmodell ist die IL-12 Produktion in DZ bei Sepsis reduziert [164], während die IL-10 Produktion gesteigert ist. Dies kann zu einer Polarisation von T-Helferzellen zu einer T_H2-Antwort bei gleichzeitiger Inhibition der T_H1 Antwort in der Sepsis beitragen [153]. Wir konnten zeigen, dass bei Sepsis langanhaltende phänotypische und funktionelle Veränderungen von DZ-Subpopulationen auftreten. Diese funktionellen Veränderungen sind vergleichbar mit beschriebenen Veränderungen der Monozytenreihe und beinhalten eine verminderte MHC II Expression und eine reduzierte pro-inflammatorische bei gleichzeitig gesteigerter anti-inflammatorischer Zytokinproduktion [147].

Neutrophile Granulozyten

Neutrophile spielen eine wichtige Rolle in der bakteriellen Abwehr. „Recruitment“ zu Infektionsorten, Gefäßwand- Adhäsion/ Migration, Extravasation, Migration mittels Chemotaxis und Phagozytose, Freisetzung von Mediatoren, proteolytischen Enzymen und Abtötung von internalisierten Pathogenen mittels ROS sind Schlüsselstationen in der anti-bakteriellen Abwehr [165]. Die Phagozytose von Bakterien durch Neutrophile ist verstärkt, wenn Bakterien mit IgG oder Komplementfaktoren überzogen sind, und CD64 (Fc_γ Rezeptor I, Neutrophilen-Aktivierungsmarker) bzw. CD14 hochreguliert ist [165]. Das „Priming“ von Neutrophilen bei Sepsis geschieht in der Zirkulation und beinhaltet eine verstärkte oxidative Aktivität und NFκB-Expression [166]. Faktoren für die Aktivierung von Neutrophilen sind u.a. C5a [167], LPS [168] und Zytokine [169] (vergl. Kap. 2.1). Zirkulierende Neutrophile sind kurzlebig (<14h) und betreiben Apoptose, sofern kein Antigenkontakt erfolgt. Die Apoptose von Neutrophilen ist in der Sepsis inhibiert [165, 170]. Dieser Prozess wird vermutlich durch LPS und Zytokine induziert [170-172]. Die Verlängerung der Lebensdauer neutrophiler Granulozyten in der Sepsis kann Gewebe-/ Organschäden verstärken und steht im Kontrast zur lymphozytären Apoptose in lymphatischen Organen [160, 173]. Neutrophile

unterlaufen bei nicht überwundener Infektion in der späten Sepsis somit eine phänotypische Veränderung, welche durch verlängerte Lebensdauer, gestörte Migration/ Chemotaxis, vermehrte Freisetzung proteolytischer Enzyme und pro-inflammatorischen Zytokinen, ROS und durch „gerinnungsfördernde“ Eigenschaften charakterisiert ist.

T- und B- Lymphozyten

Lymphozyten nehmen eine zentrale Rolle in der Koordination der Immunantwort bei Sepsis ein [174-178]. Bei schwerer Sepsis kommt es meist zur Suppression zirkulierender T-Zellzahlen, T-Zellfunktionen und NK- Zellzahlen [148-150, 160, 163, 179, 180]. Häufig ist eine periphere CD4+ T-Lymphopenie [178, 181] und eine Verminderung der splenalen B- und CD4+ T-Zellzahlen festzustellen [180]. Eine ausgeprägte periphere CD4+ T-Lymphopenie ist ein Prädiktor für eine erhöhte Mortalität bei Sepsis [179, 182] und ist meist langanhaltend [148]. Apoptosemechanismen (FasL, Fas, Kaspasen) scheinen hier ursächlich [183]. Im Tiermodell konnten Kortikoide [184], Fas ligand [185] und TNF- α [186] als pro-apoptotische Faktoren identifiziert werden. Eine Inhibition von Kaspasekaskaden reduziert im Tiermodell die Mortalität bei Sepsis [180]. Zudem wurde ein protektiver Effekt einer verminderten CD8+ T-Zellzahl bei Sepsis [148] und Trauma [187] beschrieben. Herabregulation von CD28 (Aktivierungsmarker) und CD62L (Homingrezeptor zum Lymphknoten [188]) auf CD8+ ist mit einer besseren Überlebensrate bei Patienten mit Sepsis assoziiert [148]. T-Zellen werden zudem hyporesponsiv bezgl. Proliferation und nehmen einen T_{H2} Phänotyp an: die IL-4, TGF- β , IL-10 Produktion ist gesteigert, die IL-12 und IFN γ Produktion ist supprimiert [189, 190]. Definierte Lymphozytensubpopulationen (CD4+ CD25+ regulatorische T-Zellen [Treg], NK-Zellen, CD8+ T-Zellen) supprimieren zudem aktiv die adaptive Immunantwort bei Sepsis [150, 191-196]. Tregs können zytotoxische Zellen direkt abtöten, inhibieren die Zytokinproduktion (IL-2, TNF- α) zytotoxischer Zellen und produzieren regulatorische Zytokine (IL-10, TGF- β). Bei Sepsis nimmt die Zahl der CD127- Treg und deren suppressive Funktion zu; die Zellzahl steigt durch selektive Depletion von CD25- T-Zellen [150, 195, 197-199]. Treg inhibieren bei Sepsis zudem die Aktivierung und Proliferation mononukleärer Zellen bzw. von T_{H1}- Zellen [195, 196, 199]. Prolongiertes Auftreten einer erhöhten Treg-Zellzahl bei Sepsis ist mit erhöhter Morbidität und Mortalität assoziiert [198]. Treg inhibieren zudem Monozytenfunktionen via Apoptose [160, 200, 201]. Der Stellenwert einer möglichen immunmodulierenden Strategie zur Beeinflussung von Treg oder Lymphozytenapoptose ist derzeit unklar [160, 163, 202, 203].

2. Eigene Arbeiten

2.1. Selektive LPS, C5a und IL-6- Immunadsorption zur Rekonstruktion der monozytären Immunkompetenz bei Patienten mit Sepsis: eine Pilotstudie.

Joerg C. Schefold, Stephan von Haehling, Malte Corsepius, Cosima Pohle, Peter Kruschke, Heidrun Zuckermann, Hans-Dieter Volk, Petra Reinke. A novel selective extracorporeal intervention in sepsis: immunoabsorption of endotoxin, interleukin 6, and complement-activating product 5a. Shock. 2007 Oct;28(4):418-25.

LPS, C5a, und IL-6 spielen im Rahmen der Entwicklung der monozytären Deaktivierung bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock eine zentrale Rolle. C5a ist Ligand eines G(i) Protein gekoppelten Rezeptors und ein potenter Inhibitor der monozytären IL-12 Produktion. C5a verhindert die IL-12 abhängige Induktion von IFN- γ , welche für die endogene Rekonstitution von Monozytenfunktionen notwendig ist [204]. Erhöhte systemische C5a Spiegel gehen in der Sepsis zudem einher mit A) einer erhöhten Mortalität septischer Patienten B) mit einem Verlust der Kontrolle über die Komplementaktivierung, C) mit einer nicht zielgerichteten Aktivierung von neutrophilen Granulozyten bzw. mit Deaktivierung der chemotaktischen Antwort, D) mit verstärkter Vasopermeabilität/ Schock und E) mit einer Beeinträchtigung der Fähigkeit zur Abwehr mikrobieller Komplementaktivatoren [167, 205]. Ein positives Feedback zwischen IL-6 Produktion und Expression des C5a-Rezeptors (C5aR) ist in der Sepsis beschrieben. Dies führt zu einer Amplifikation der IL-6 bzw. C5a Wirkung [206]. IL-6 Wirkung führt zudem über STAT zu einer Induktion der Hämoxygenase-1 und einer Verstärkung der Deaktivierung von Monozyten/ Makrophagen. LPS bewirkt über TLR-4 Aktivierung eine verstärkte Expression von IL-6 und C5a was oben genannte Immunphänomene weiter amplifiziert.

Wir testeten in der vorliegenden Studie erstmalig ob eine simultane selektive Reduktion der LPS-, C5a- und IL-6- Plasmaspiegel mittels Immunadsorption *in vivo* möglich ist und ob dies zu einer Normalisierung der mHLA-DR Expression führt bzw. den klinischen Verlauf günstig beeinflusst. Hierfür wurden selektive Immunadsorber entwickelt, prä-klinisch getestet und in einer ersten prospektiven nicht-verblindeten Pilotstudie eingesetzt. Wir konnten beobachten, dass unter Behandlung sowohl IL-6- und C5a- Plasmaspiegel als auch PCT- und LBP-Spiegel (eingesetzt als LPS Surrogatmarker) signifikant reduziert wurden. Die mHLA-DR Expression stieg bei den behandelten Patienten, nicht aber bei Kontrollen an. Am Studientag 7 konnte eine Erholung der mHLA-DR Expression bei allen behandelten Patienten mit initialer Immunparalyse beobachtet werden.

Wir konnten somit erstmalig zeigen, dass die simultane Reduktion systemischer LPS-, C5a- und IL-6- Spiegel mittels selektiver extrakorporaler Immunadsorption möglich ist und dass dies den immunologischen und klinischen Verlauf günstig beeinflusst. Diese extrakorporale Strategie bietet einen neuen Ansatz für die Behandlung von Patienten mit Sepsis und wurde durch eine nationale und eine internationale Fachgesellschaft mit Forschungspreisen ausgezeichnet. In einer größeren Folgestudie soll nun geklärt werden, ob eine solche adjunktive Therapie den klinischen Verlauf entsprechender Patienten begünstigt.

2.2. Wiederherstellung der monozytäre Immunkompetenz mittels Immunstimulation (GM-CSF) bei septischen Patienten: eine multizentrische randomisierte placebo-kontrollierte Studie.

Christian Meisel, Joerg C. Schefold*, Rene Pschowski, Tycho Baumann, Kathrin Hetzger, Jan Gregor, Steffen Weber-Carstens, Dietrich Hasper, Didier Keh, Heidrun Zuckermann, Petra Reinke, Hans-Dieter Volk. (*equal contribution). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 2009 Oct 1; 180(7):640-8.*

Anhaltende sepsis-assoziierte Immunsuppression ist mit einem gehäuften Auftreten von unkontrollierten Infektionen, „chronischem Multiorganversagen“ und erhöhter Sterblichkeit assoziiert. Die mHLA-DR Expression auf Monozyten/ Makrophagen kann mittels extrakorporaler Reduktion von inhibitorischen Faktoren (LPS, C5a, IL-6) wiederhergestellt werden (vergl. Kap. 2.1).

Nachfolgend testeten wir erstmalig in einer prospektiven doppelverblindeten randomisierten placebo-kontrollierten multizentrischen Studie, ob eine Reaktivierung von Monozyten/ Makrophagen bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock und sepsis-assoziiertes Immunsuppression (definiert als mHLA-DR Expression $<8,000$ Moleküle pro Zelle an zwei aufeinanderfolgenden Tagen) auch mittels Immunstimulation erreicht werden kann. Vorherige nichtrandomisierte Pilotstudien zeigten, dass die Gabe von $IFN\gamma$ (Döcke et al., Nature Medicine 1997 [134]) und GM-CSF (Nierhaus et al, Intensive Care Medicine 2003 [141]) eine Zunahme der mHLA-DR Expression auf Monozyten/ Makrophagen bei septischen Patienten bewirkt.

38 Pat. mit schwerer Sepsis/ septischem Schock und sepsis-assoziiertes Immunsuppression wurden eingeschlossen. Nach Randomisierung erhielten die Patienten subkutane Injektionen von $4\mu\text{g}/\text{kgKG}/\text{Tag}$ GM-CSF oder Placebo (0.9% NaCl) für 8 Tage. Eine Dosisescalation auf $8\mu\text{g}/\text{kgKG}/\text{Tag}$ GM-CSF wurde von Studientag 5 bis 8 in Fällen einer mHLA-DR Expression $<15,000$ Moleküle pro Zelle an Studientag 5 durchgeführt. Zu Studienbeginn war in beiden Gruppen eine vergleichbare mHLA-DR Expression festzustellen ($5,609 \pm 3,628$ vs. $5,659 \pm 3,332$ mAb pro Zelle). Nach 24 Stunden war ein signifikanter Anstieg der mHLA-DR Expression in der GM-CSF Gruppe festzustellen. An Studientag 9 war eine Normalisierung der mHLA-DR Expression bei 19/19 Patienten in der Behandlungsgruppe, jedoch nur bei 3/19 Patienten der Kontrollgruppe festzustellen ($p<0.001$). Wir konnten beobachten, dass Gabe von GM-CSF die (*ex vivo*) TLR 2/4-induzierte proinflammatorische Zytokinproduktion in Monozyten wiederherstellt. Klinischerseits wurde zudem beobachtet, dass Gabe von GM-CSF die Beatmungszeit septischer Patienten mit sepsis-assoziiertes Immunsuppression signifikant verkürzt (148 ± 103 vs. 207 ± 58 Stunden, $p=0.04$). Ein nicht signifikante Verkürzung der intrahospitalen Aufenthaltsdauer und der Behandlungsdauer auf der Intensivstation (59 ± 33 vs. 69 ± 46 bzw. 41 ± 26 vs. 52 ± 39 Tage) wurde in der GM-CSF Gruppe beobachtet.

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen, dass GM-CSF die monozytäre Immunkompetenz bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock und sepsis-assoziiertes Immunsuppression wiederherstellt. In dieser ersten immunmonitoring-basierten randomisierten Studie zur Immunstimulation in der Sepsis war zudem eine signifikante Verkürzung der Beatmungszeit entsprechender Patienten festzustellen. In einer größeren Studie soll hiervon ausgehend getestet werden, ob die hohe Mortalitätsrate von Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock durch den Einsatz von GM-CSF verringert werden kann.

2.3. GM-CSF Therapie zur Behandlung der sepsis-assoziierten Immunsuppression ist assoziiert mit reduzierterIDO-Aktivität und Kynureninen in Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock

Joerg C. Schefold, Jan-Philip Zeden, Rene Pschowski, Ben Hammoud, Christina Fotopoulou, Dietrich Hasper, Gerhard Fusch, Stephan von Haehling, Hans-Dieter Volk, Christian Meisel, Christine Schütt, Petra Reinke. Treatment with granulocyte–macrophage colony-stimulating factor is associated with reduced indoleamine 2,3-dioxygenase activity and kynurenine pathway catabolites in patients with severe sepsis and septic shock. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 2009; Dec. 4. Epub ahead of print.

GM-CSF Therapie führt bei schwerer Sepsis/ septischem Schock und sepsis-assoziiierter Immunsuppression zu einer Rekonstitution von monozytären Immunfunktionen (vergl. Kap. 2.2). Wir haben weiterführend untersucht, ob eine Behandlung mit dem pro-inflammatorischen Mediator GM-CSF zu einer Veränderung der systemischen IDO-Aktivität oder der von Kynurenin-Plasmaspiegeln führt. Dies scheint für das Verständnis der *in vivo* Regulation der zellulären Immunität unter GM-CSF Therapie bei Sepsis wichtig.

Das immunregulatorische Enzym Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) reguliert zu etwa 99% den Tryptophanmetabolismus und wird durch pro-inflammatorische Stimuli (u.a. IFN- γ und andere T_H1 Zytokine, LPS, bakterielle DNA, lösliche Zytokinrezeptoren) induziert. IDO ist als zentraler Immunregulator bei Schwangerschaft, Allergie, Autoimmunität und Infektion bekannt und stellt eine wichtige Schnittstelle zu Metabolismus und Energiestoffwechsel dar. Immunsuppressive Eigenschaften von IDO werden über antigenpräsentierende/ dendritische Zellen vermittelt und beinhalten die Regulation von pro- vs. anti-inflammatorischer Zytokinproduktion und von T-Zellfunktion über Tryptophandepriuation [207, 208]. Induktion von IDO katalysiert den initialen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Tryptophanabbau und führt zur Synthese von „Kynureninen“ (Kynurenin, Kynureninsäure, Quinolinsäure). Diese Katabolite können pro-apoptotisch auf Immunzellen wirken, was zu einer verstärkten Suszeptibilität gegenüber Infektionen beitragen kann. Frühere Studien konnten zeigen, dass eine gesteigerte IDO-Aktivität bei Patienten mit schwerem Trauma oder Sepsis mit einem schlechteren Überleben assoziiert ist [209, 210].

Mittels Tandem-Massenspektrometrie wurden die Plasmaspiegel von Tryptophan, Kynurenin, Kynureninsäure, Quinolinsäure, 5-Hydroxytryptophan, Serotonin bzw. der errechneten systemischen IDO-Aktivität verblindet gemessen. Vor Studienbeginn war kein Unterschied in den Plasmaspiegeln von Tryptophan, Tryptophanmetaboliten und IDO-Aktivität zwischen den Behandlungsgruppen (GM-CSF vs. Placebo) festzustellen. Nach GM-CSF Behandlung an Studientag 9 war die IDO-Aktivität signifikant reduziert (35.4 ± 21.0 vs. 21.6 ± 9.9 , $p=0.02$); ein signifikanter Unterschied zur Placebogruppe war festzustellen ($p=0.03$). Zudem wurde beobachtet, dass die Plasmaspiegel von Kynureninen, nicht jedoch die Spiegel von Serotonin-Stoffwechselwegprodukten, in der GM-CSF signifikant im Vergleich zur Kontrolle abfielen. Die IDO-Aktivität korrelierte signifikant mit PCT Serumspiegel ($p=0.0001$, $r=0.56$) und mit der HLA-DR Expression auf Monozyten ($p=0.005$, $r=-0.28$). Wir konnten somit zeigen, dass GM-CSF die IDO-Aktivität und Kynurenin-Plasmaspiegel *in vivo* reduziert. Obwohl die diesbezüglich zugrundeliegenden molekularen Mechanismen unklar bleiben tragen unsere Daten zum Verständnis der GM-CSF induzierten Immunregulation bei Sepsis bei.

2.4. Phänotypveränderungen und beeinträchtigte Funktion von dendritischen Zellen bei Patienten mit Sepsis: eine prospektive Beobachtungsstudie

Holger Poehlmann, Joerg C. Schefold, Heidrun Zuckermann-Becker, Hans-Dieter Volk, Christian Meisel. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. Critical Care 2009; 13(4): R119. Epub 2009 Jul 15.

Im Rahmen der Immunreaktion bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock ist bekannt, dass die Zahl dendritischer Zellen (DC) durch eine gesteigerte Apoptoserate abnimmt. Zudem ist eine verminderte DC- und Monozyten- Zellzahl mit einer erhöhten Krankheitsschwere und Mortalität bei Sepsis assoziiert (siehe Kap. 1.5). Hiervon ausgehend haben wir untersucht, ob bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock und sepsis-assoziiertes Immunsuppression langanhaltende phänotypische und funktionelle Veränderungen von DC und Monozyten Subpopulationen auftreten.

In einer prospektiven Beobachtungsstudie wurden 16 konsekutive Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock (Alter 59.2 ± 9.7 Jahre, 13 männliche Patienten, SOFA Score 6.1 ± 2.7) und ausgeprägter sepsis-assoziiertes Immunsuppression (mHLA-DR Expression <5000 Antikörper pro Zelle) und 16 gesunde Kontrollprobanden untersucht. DC Zellzahl, HLA-DR Expression und *ex vivo* Zytokinproduktion wurden über die Zeit zu definierten Subpopulationen von Monozyten verglichen. Im Patientenkollektiv war initial eine ausgeprägte Reduktion der Zahl myeloischer (MDC) und plasmazytoider (PDC) dendritischer Zellen als auch von CD14-CD16⁺ Monozyten festzustellen. Die Zahl von CD14⁺⁺CD16⁻ und von CD14⁺⁺CD16⁺ Monozyten war erhöht. Die HLA-DR Expression war im Vergleich zur Kontrolle auf allen DC- und Monozyten- Subpopulationen erniedrigt. Die extrazelluläre Freisetzung (*ex vivo*) als auch die intrazelluläre Produktion pro-inflammatorischer Zytokine nach TLR-4 (LPS) und TLR-2 (LTA) Stimulation war in den Monozyten-subpopulation und in MDC reduziert, wohingegen die IL-10 Produktion erhöht war. Die Antwort von INF- α stimulierten PDC war im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls signifikant reduziert. Die HLA-DR Expression und die Zytokinfreisetzung aus DC und Monozytenpopulationen septischer Patienten blieben bis Tag 28 vermindert.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock und Immunparalyse zusätzlich zu einer Reduktion der DC- und Monozyten- Zellzahl auch funktionelle Veränderungen dendritischer Zellen auftreten. Diese funktionellen Veränderungen sind langanhaltend und vergleichbar mit den beschriebenen Veränderungen der Monozytenreihe. Diese sepsis-induzierte funktionelle Deaktivierung von Monozyten- und DC-Zellen beinhaltet eine verminderte MHC Klasse II Expression und eine verminderte pro-inflammatorische bei gleichzeitig gesteigerter anti-inflammatorischer Zytokinproduktion. Dies kann zu der beschriebenen Schwäche der anti-bakteriellen Abwehr bei Sepsis beitragen. Weitere Studien sind notwendig um die individuelle Rolle einzelner DC Subpopulationen im Rahmen der Immunantwort bei Sepsis zu charakterisieren.

2.5. Interleukin-6 Messung mittels point-of-care Technik bei Patienten mit Sepsis: eine Vergleichsuntersuchung zum Goldstandard (ELISA)

Joerg C. Schefold, Dietrich Hasper, Stephan von Haehling, Christian Meisel, Petra Reinke, Hans-Georg Schlosser. Interleukin-6 serum level assessment using a new qualitative point-of-care test in sepsis: a comparison with ELISA measurements. Clinical Biochemistry 2008 Jul; 41(10-11): 893-898. Epub 2008 Mar 20.

Ein zentrales, grundsätzliches Problem bei Patienten mit Sepsis stellt die Früherkennung der Erkrankung dar. Dies ermöglicht die Einleitung einer adäquaten zielgerichteten Therapie (vergl. Kap. 1.3). Biomarker unterstützen die Diagnosefindung. Neben PCT ist hier IL-6 von Interesse, da IL-6 Plasmaspiegel bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock sehr rasch ansteigen (< 1h, Plasmaspitzenpiegel nach 2h; siehe Kapitel 1.3) und IL-6 eine sehr kurze Halbwertszeit aufweist (wenige Minuten). IL-6 Plasmakonzentrationen korrelieren zudem mit dem Schweregrad der Erkrankung und der Prognose bei Sepsis. Ein Problem der IL-6 Diagnostik bestand bislang darin, dass nur eine meist zeitaufwendige (ca. 5 Stunden) semiautomatische ELISA Diagnostik zur Verfügung stand.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuentwickelter point-of-care (POC) -Test, welcher die bettseitige IL-6 Diagnostik innerhalb von ca. 20 Minuten erlaubt, bei Patienten mit Sepsis evaluiert. Der verwendete Test ist ein Lateralfuss- bzw. enzymatischer Chemilumineszenz-Test. Zur Testung wird die Probe auf den Probenträger pipettiert. Das IL-6 in der Probe bindet an einen ersten monoklonalen anti-IL-6 Antikörper welcher an Goldpartikel konjugiert ist. Ein zweiter auf dem Teststreifen fixierter monoklonaler anti-IL-6 Antikörper bindet beladene Goldpartikel. Eine Farbreaktion (rot-blau) entsteht, deren Intensität proportional zur IL-6 Konzentration ist. Nicht IL-6 beladene Goldpartikel diffundieren im Teststreifen weiter und binden an eine Kontrollbande. Die Farbreaktion kann optisch mit einem Analysegerät analysiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden 392 Proben von Intensivstationspatienten untersucht. Verblindete IL-6 Messungen wurden mit der konventionellen semiautomatischen ELISA Methode und dem POC Test durchgeführt. Die mittleren IL-6 Spiegel waren 102.9 ± 388.6 pg/mL (ELISA) und 97.0 ± 535.5 (POC-Test). Eine signifikante Korrelation beider Meßmethoden war festzustellen ($p=0.0001$, $r=0.92$). Die Sensitivität/ Spezifität für Sepsis war 82.6%, 86.5% (ELISA, AUC: 0.88) bzw. 76.4%, 95.0% für den POC-Test (AUC: 0.87). Der Sensitivitätsbereich des POC Tests liegt bei 50–10.000 pg/mL IL-6.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir zeigen, dass IL-6 Messungen bei kritisch kranken Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock mittels patientennahe Labordiagnostik durchgeführt werden können. Eine signifikante Korrelation zum Goldstandard (ELISA) war festzustellen. In der durchgeführten receiver-operating curve (ROC) Analyse war zwischen den beiden Testmethoden kein signifikanter Unterschied festzustellen ($p=0.54$; 95% CI: -0.027-0.05). Mit einer Analysenzeit von etwa 20 Minuten (vs. ca. 3-5 Stunden) könnte der patientennahe Test helfen entsprechende Patienten zu detektieren. Weiterhin könnte der Test auch in Einrichtungen ohne spezialisierte Immunlabore zur einer früheren Einleitung einer zielgerichteten Therapie/ Versorgung entsprechender Patienten beitragen.

3. Diskussion

Immunmodulatorische Therapiestrategien zur Rekonstitution monozytärer Funktion bei Sepsis zielen darauf ab, anti-bakterielle Abwehrmechanismen zu stärken und die Zahl sekundärer/ nosokomialer Infektionen zu reduzieren [95, 142, 211]. Ziel eines solchen adjunktiven Therapieansatzes bei schwerer Sepsis/ septischem Schock ist letztlich die Reduktion der Morbidität und Mortalität der Erkrankung. Zur Rekonstitution monozytärer Immunität wurden verschiedene Strategien getestet. Es kamen Immunstimulantien und Therapieverfahren zum Einsatz, welche inhibitorische Faktoren selektiv aus der Zirkulation entsprechender Patienten entfernen. Nachfolgend sollen unsere Erkenntnisse vor dem Hintergrund bereits publizierter Daten diskutiert werden.

Immunstimulation

Kolonie-stimulierende Wachstumsfaktoren (CSF) sind Glykoproteine, welche über die Bindung an spezifische Rezeptoren die Proliferation, Differenzierung und funktionelle Aktivität entsprechender Immunzellen regulieren [212]. G-CSF wird von Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen produziert und verstärkt als zellreihen-spezifischer Faktor das Überleben, die Produktion, Differenzierung und Aktivität neutrophiler Granulozyten (Phagozytose, ROS-Freisetzung, antikörpermarkierte Antigene). Daten aus Tiermodellen zur Pneumonie zeigen, dass G-CSF Gabe die Phagozytose von Pathogenen aus der Lunge befördern kann [213]. G-CSF konnte in einer Studie bei Patienten mit schwerer ambulant erworbener Pneumonie die Entwicklung eines ARDS verhindern [214]. Die Datenlage läßt eine abschließende Beurteilung bezüglich Morbidität und Mortalität jedoch nicht zu [215, 216]. GM-CSF aktiviert zusätzlich die Monozyten/ Makrophagenreihe [212]. Vorherige nicht randomisierte klinische Untersuchungen zeigten, dass GM-CSF die Antigenpräsentation über MHC Klasse II Expression und die *ex vivo* LPS-induzierte pro-inflammatorische Zytokinsekretion steigert [141]. Weiterhin existieren Hinweise darauf, dass eine Therapie mit GM-CSF eine moderate Verbesserung des Gasaustausches bei sepsis-induziertem Lungenversagen bewirken kann [217].

Da Monozyten eine zentrale Rolle in der Immunantwort bei Sepsis einnehmen, wurde für die von uns durchgeführte erste randomisierte immunmonitoring-basierte Immunstimulationsstudie GM-CSF ausgewählt. Die von uns durchgeführte Studie zur adjunktiven Therapie mit GM-CSF bei Sepsis (Kap. 2.2) zeigt erstmalig in einem doppelblinden randomisierten

placebo-kontrollierten Studiendesign, dass Gabe von GM-CSF zu einer signifikant gesteigerten mHLA-DR Expression führt. Nach Beendigung der Intervention war ein signifikanter Unterschied in der mHLA-DR Expression zwischen Behandlungs- und Kontrollgruppe festzustellen. Unter GM-CSF Therapie war zudem eine Zunahme der CD4+ und CD8+ T-Zellzahl zu beobachten. T-Zellfunktionen wurden in der vorliegenden Studie nur orientierend untersucht; signifikante Unterschiede zwischen den Studiengruppen wurden hier nicht beobachtet. Da eine Erholung der T-Zellfunktionalität jedoch notwendig scheint, um eine adäquate antimikrobielle Abwehr zu gewährleisten, sollte die geplante größere Folgestudie den Einfluß einer GM-CSF Therapie auf T-Zellfunktionen im Detail untersuchen.

Eine wichtige Frage im Hinblick auf die größere Folgestudie ist die Frage nach der optimalen GM-CSF Dosis bei Sepsis. Auf die initiale Dosis von 4 µg/kgKG/Tag GM-CSF war bei 2 von 19 Patienten keine komplette Rekonstitution der mHLA-DR Expression (>15000 Moleküle/Zelle) in unserer Studie zu beobachten. Wie im Studienprotokoll festgelegt, wurde bei diesen Patienten die GM-CSF Dosis auf 8 µg/kgKG/Tag von Studientag 5 bis 8 erhöht. Hiernach wurden mHLA-DR Spiegel > 15000 Molekülen/ Zelle) bei 19 von 19 Patienten festgestellt. Dies kann auf eine relativ geringe Rate an partiellen Respondern unter 4µg/kgKG/Tag hinweisen. Eine etwaige optimale GM-CSF Dosis bei Sepsis kann jedoch aus unseren Daten nicht geschlossen werden; eine Dosisfindungsstudie wäre notwendig.

Unsere Daten werden eingeschränkt durch eine Tendenz zu höheren initialen Schweregraden der Erkrankung bei Kontrollpatienten (gemessen an klinischen Skalen). Obwohl wir nicht ausschließen können, dass dies die beobachteten klinischen Effekte von GM-CSF beeinflusst hat, wurden höhere initiale IL-6-, IL-10- und PCT- Serumspiegel in der Behandlungsgruppe zum Zeitpunkt des Studienbeginns beobachtet. Da IL-6, IL-10 und PCT Serumspiegel mit der Prognose septischer Patienten korrelieren, scheint es unwahrscheinlich, dass die beobachteten klinischen Effekte von GM-CSF auf eine gering erhöhte initiale Krankheitsschwere in der Kontrollgruppe zurückzuführen sind. Weiterhin muss festgestellt werden, dass die Fallzahl der Studie limitiert ist (n=38) und dass in der aktuellen Studie keine weiteren monozytären Funktionsteste durchgeführt wurden. Klinischerseits war festzustellen, dass eine adjunktive Behandlung mit GM-CSF zu einer Verkürzung der Beatmungszeit im Vergleich zu Kontrollpatienten führte. Diese Ergebnisse stimmen mit Daten aus Tiermodellen überein, welche zeigen, dass G-CSF und GM-CSF die Intensität der pulmonalen Inflammation

verringern kann [218-222]. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass die Datenlage bezüglich medikamentöser Immunstimulation mit GM-CSF bei Patienten mit Sepsis derzeit begrenzt ist. Ergänzend konnten wir zeigen (Kap. 2.3), dass eine Immunstimulation mit GM-CSF zu einer Verminderung der Aktivität des immunregulatorischen Enzyms IDO und von Kynurenin-Plasmaspiegeln *in vivo* führt. Reduzierte Tryptophankatabolite und IDO-Aktivität in der Behandlungsgruppe könnten eine verminderte Suszeptibilität gegenüber Infektionen unterstützen. Da eine gesteigerte IDO-Aktivität bei Patienten mit schwerem Trauma und Sepsis mit einer schlechteren Prognose einhergeht [209, 210], kann dies ein weiterer Hinweis auf einen prognostischen Vorteil einer adjunktiven GM-CSF Therapie bei Patienten mit sepsis-induzierter Immunsuppression sein.

Ein alternativ einsetzbares Immunstimulans bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock und sepsis-assoziiertes Immunsuppression ist IFN- γ . IFN- γ wird von nahezu allen Immunzellen produziert und reguliert transkriptionell ein weites Spektrum immunologisch relevanter Gene. Im Rahmen der Sepsis induziert IFN- γ anti-mikrobielle Mechanismen. Dies beinhaltet die Aktivierung von Immunzellen, verstärkte monozytäre Antigenverarbeitung und -präsentation, Sekretion von Zytokinen/ Chemokinen, Chemotaxis, Wachstum, Reifung, Differenzierung und Apoptose von (Immun)Zellen, Ig-Klassenswitch und NK-Zellaktivität. Die Bindung von IFN- γ an den ubiquitär exprimierten IFN- γ Rezeptor (IFNGR) bewirkt über intrazelluläre Jak 1/ STAT 1-Aktivierung eine breite, meist pro-inflammatorische antimikrobielle Antwort [223]. Experimentelle Vorarbeiten von Döcke et al. zur Immunstimulation mit IFN- γ bei Patienten mit Sepsis zeigen, dass IFN- γ Gabe die LPS-induzierte monozytäre TNF- α Sekretion auf subnormale Werte steigert. Bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock und sepsis-assoziiertes Immunsuppression bewirkt IFN- γ eine Wiederherstellung einer defizienten mHLA-DR Expression und *ex vivo* LPS-induzierten TNF- α Sekretion. Döcke et al. beschreiben in einer nicht-randomisierten Studie, dass die Wiederherstellung der monozytären Funktion bei 8 von 9 septischen Patienten mit sepsis-assoziiertes Immunsuppression zu einer Überwindung der Sepsis führte [134]. Ob eine adjunktive Therapie mit IFN- γ die Morbidität oder Mortalität septischer Patienten vermindern kann bleibt derzeit unklar, da größere randomisierte Untersuchungen fehlen. Eine Studie an 52 beatmeten Patienten mit Polytrauma konnte zeigen, dass die Gabe von inhalativem IFN- γ zur Rekonstitution einer verminderten HLA-DR Expression auf Alveolarmakrophagen führt und zu einer verminderten Rate an ventilator-assoziierten Pneumonien führt [224]. Daten von anderen prospektiven randomisierten Studien an Traumapatienten zeigen jedoch keinen

konsistenten Vorteil bezüglich Mortalität oder Infektionsrate [225, 226]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass intratracheale IFN- γ Applikation in kortikoid-vorbehandelten Ratten, nicht aber in immunkompetenten Ratten, zu einer signifikanten Abnahme der Erregerlast führt [227, 228]. Klinische Studien zum Nutzen von inhalativem IFN- γ bei Sepsis oder Pneumonie fehlen [229]. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass IFN- γ eine therapeutische Option bei sepsis-assoziiierter Immunsuppression im Rahmen von klinischen Studien oder individuellen Heilversuchen bietet [134]. Aufgrund der nahezu ubiquitären Expression des IFNGR kann die Gabe von IFN- γ bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock zu einer erhöhten Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren (u.a. TNF- α) führen [134]. Auch aus Sicherheitsgründen wurde daher in der von uns durchgeführten Immunstimulations-Studie GM-CSF gewählt.

Reduktion von inhibitorischen Faktoren

Alternativ zu Immunstimulation bietet die extrakorporale Reduktion von inhibierenden Faktoren eine weitere therapeutische Option zur Rekonstitution monozytärer Funktionen bei Sepsis. Nach präklinischer Charakterisierung testeten wir erstmalig eine auf polyklonalen IgY-Antikörpern basierende simultante, selektive Immunadsorption von LPS, IL-6 und C5a bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock. Diese drei Antigene wurden ausgewählt, da umfangreiche experimentelle Vorarbeiten zeigen, dass diese entscheidend zu einem Verlust der MHC Klasse II Expression auf Monozyten beitragen [86, 96, 99, 102, 103, 105, 167, 204]. Weiterhin wurde aufgrund des Versagens einer Reihe von „single-mediator“ Strategien bei Patienten mit Sepsis [10] ein Ansatz gewählt, welcher in drei verschiedene immunologische Kaskaden simultan eingreift. Dies scheint aufgrund der Pleiotropie und Redundanz der Zytokinnetzwerke notwendig. An 5 aufeinanderfolgenden Tagen erhielten die Patienten je 7,5 Stunden (ca. 9000 ml Plasmavolumen) plasma-basierte Immunadsorption. Die adjunktive Behandlung mit LPS-, IL-6-, und C5a- Immunadsorption führte zu einem signifikanten Abfall der Serumspiegel der Zielmoleküle über den Behandlungszeitraum. Eine signifikant höhere mHLA-DR Expression war bei behandelten Patienten nach Beendigung der Therapie im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. Der Anstieg der mHLA-DR Expression war bei Patienten mit initial sehr niedriger mHLA-DR Expression besonders ausgeprägt. Dies könnte darauf hinweisen, dass insbesondere Patienten mit einer schweren sepsis-assoziierten Immunsuppression von einer adjunktiven Therapie mit LPS-, IL-6 und C5a-Immunadsorption profitieren.

Unsere Daten stehen in Einklang mit Ergebnissen von Patienten mit septischem Schock, welche eine adjunktive Polymyxin-F (PMX-F) Hämo-perfusion erhielten. Ono et al. [230] konnten in einer unverblindeten nicht randomisierten Pilotanalyse zeigen, dass PMX-F Behandlung (n=10 Patienten) zu einer signifikanten mHLA-DR Zunahme führt. Eine Veränderung des Zytokinprofils hin zu einer verminderten Freisetzung anti-inflammatorischer Mediatoren war -vergleichbar zu unseren Daten- nach Hämo-perfusion festzustellen. Die randomisierte multizentrische EUPHAS Studie [231] untersuchte den klinischen Nutzen einer PMX-F basierten Therapie bei Patienten mit intra-abdomineller gram-negativer Sepsis. Eine Verbesserung der Hämodynamik und eine Reduktion der 28-Tage-Mortalität unter PMX-F Therapie wurde beobachtet. Daten zum Verlauf von Monozytenfunktion bzw. zellulären Immunmarkern fehlen, so dass eine diesbezügliche Wirkung einer PMX-F Therapie nicht beurteilt werden kann.

Weitere alternative therapeutische Ansätze zur Rekonstitution zellulärer Immunfunktion bei Sepsis bietet die Blockade von anti-inflammatorischen Mediatoren (IL-10), die Wiederherstellung der Antigenpräsentation dendritischer Zellen (beispielsweise mittels FLT3 [232]), die Wiederherstellung von T-Zellfunktionen [95, 233] und eine Blockade von Apoptosesignalwegen (Kaspaseinhibition, Bcl-2 Überexpression, FAS/ FasL Inhibitoren) [95, 160, 180, 202, 203]. Der Stellenwert dieser Ansätze ist derzeit unklar; randomisierte klinische Studien fehlen.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass eine Rekonstitution der mHLA-DR Expression (als Surrogatmarker für monozytäre Funktionen) sowohl mittels Immunstimulation als auch mittels extrakorporaler Reduktion inhibitorischer Substanzen erzielt werden kann. Der Einfluß einer solchen Therapiestrategie auf harte klinische Endpunkte (Mortalität) bleibt aktuell unklar und soll in größer angelegten klinischen Studien in naher Zukunft weiterführend untersucht werden.

4. Zusammenfassung

Trotz zahlreicher Fortschritte in der Behandlung von kritisch kranken Patienten ist das Krankheitsbild Sepsis durch eine steigende Morbidität und Inzidenz bei persistierend hoher Mortalitätsrate charakterisiert. Viele septische Patienten überleben heute die frühe „pro-inflammatorische“ Erkrankungsphase, welche durch akutes Organversagen gekennzeichnet ist. Viele Patienten versterben während des intensivstationären Verlaufs an sekundären/nosokomialen Infektionen [10, 128, 173].

Als Antwort auf eine initial gesteigerte Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren kommt es im Verlauf zur Induktion von negativen Feedbackmechanismen, welche eine kompensatorische „hyporesponsive“ Phase einleiten. Obwohl die kompensatorischen Effekte zunächst (organ-)protektive Eigenschaften haben können, haben sie jedoch im Verlauf der Erkrankung meist fatale Auswirkungen. Klinische und experimentelle Daten zeigen, dass Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock meist nach 3-4 Tagen kompromittierte zelluläre Immunfunktionen aufweisen [10, 18, 142, 143, 145, 146, 160, 173, 196, 234-236]. Weiterhin ist bekannt, dass die Mehrzahl (>80%) der nicht überlebenden septischen Patienten in einer späteren Phase der Erkrankung mit Zeichen der Immunsuppression versterbt. Bei überlebenden Patienten kommt es hingegen in einer Vielzahl der Fälle zu einer endogenen immunologischen Rekonstitution [127]. Obwohl die zugrundeliegenden genetischen bzw. molekularen Mechanismen der sepsis-assoziierten Immunsuppression noch nicht umfassend bekannt sind, weisen experimentelle Daten darauf hin, dass Störungen innerhalb der zellulären Immunität eine zielgerichtete Abwehr entsprechender Mikroorganismen in dieser Phase der Erkrankung verhindern [10, 80, 95, 100, 127, 142, 173, 190, 211, 236].

Marker der zellulären Immunität ermöglichen die Identifikation von Patienten mit sepsis-assoziierten Immunsuppression und werden aktuell im Rahmen der Risikostratifizierung und Verlaufsbeobachtung bei klinischen Studien eingesetzt. Aufgrund der begrenzten Evidenzlage werden die aktuell vorhandenen Biomarker derzeit nicht für den Einsatz in der klinischen Routine empfohlen. Biomarker der zellulären Immunität könnten jedoch in der Zukunft helfen innerhalb der heterogenen Gruppe der Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock jene Patienten zu identifizieren, welche von einer bestimmten interventionellen Immuntherapie profitieren [78, 85, 237-239]. Zusätzlich zu zellulären Markern kann die Messung von IL-6 die Frühdiagnose der Erkrankung unterstützen. Nach Entwicklung eines IL-6 POC Tests

haben wir die IL-6 POC Testung im Vergleich zum Goldstandard (semiautomatischer ELISA) bei septischen Patienten untersucht (Kap. 2.5). Eine signifikante Korrelation zum Goldstandard war festzustellen. Der Test könnte dazu beitragen, auch in Abwesenheit spezialisierter Labore IL-6 bei Patienten mit Sepsis zu messen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Ansätze zur Rekonstitution monozytärer Immunfunktion mittels Immunstimulation (GM-CSF) und extrakorporaler Entfernung von inhibitorischen Mediatoren (Immunadsorption) untersucht. Die Daten der von uns durchgeführten ersten immunmonitoring-basierten randomisierten placebo-kontrollierten Studie zeigen, dass Immunstimulation mit GM-CSF zu einer Wiederherstellung der mHLA-DR Expression und Zytokinfreisetzung aus entsprechenden Immunzellen führt (Kap. 2.2). GM-CSF bewirkt zudem eine verminderte Aktivität der Indoleamine-2,3-Dioxygenase (IDO) und verminderte Serumspiegel von Kynureninen. Da Kynurenine die Apoptose von Immunzellen induzieren, könnte eine GM-CSF induzierte Reduktion von Kynureninen zu einer verminderten Suszeptibilität gegenüber Infektionen beitragen (Kap. 2.3). Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Gabe von GM-CSF bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock und sepsis-assoziiertes Immunsuppression zu einer signifikanten Verkürzung der Beatmungszeit führt. Eine nicht signifikante Verkürzung der Intensivaufenthalts- und Krankenhausverweildauer septischer Patienten war zu beobachten. Wichtig scheint jedoch, dass die statistische Kraft der von uns durchgeführten GM-CSF Studie nicht ausreicht, klinische Effekte abschließend zu beurteilen. Klinische Effekte einer GM-CSF Therapie bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock und sepsis-assoziiertes Immunsuppression werden nun in einer größeren Folgestudie untersucht. In dieser Folgestudie soll untersucht werden, ob GM-CSF die hohe Sterblichkeitsrate bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock reduziert.

Unsere Daten zeigen weiterhin, dass eine Rekonstitution monozytärer Immunfunktion auch mittels extrakorporaler Reduktion von inhibitorischen Faktoren möglich ist. Die von uns durchgeführte Pilotstudie zur LPS-, IL6- und C5a- Immunadsorption bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock ist die erste Studie, welche einen selektiven antikörper-basierten extrakorporalen Ansatz bei Sepsis getestet hat. Wir konnten in dieser Pilotstudie beobachten, dass eine simultane Immunadsorption von LPS, IL-6 und C5a zu einer signifikanten Zunahme der mHLA-DR Expression führt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe wurde ein günstigerer klinischer Verlauf bei den behandelten Patienten beobachtet (Kap. 2.1).

Ob eine solche interventionelle Therapie Einfluss auf klinische Endpunkte bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock hat, soll ebenfalls in einer größer angelegten Folgestudie untersucht werden.

5. Literaturverzeichnis

1. Schottmüller H: *Verhandl dt Kongress Inn Med* 1914, 31:257-280.
2. Bone RC: Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions. *Ann Intern Med* 1991, 114(4):332-333.
3. 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* 1992, 20(6):864-874.
4. Calandra T, Cohen J: The international sepsis forum consensus conference on definitions of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2005, 33(7):1538-1548.
5. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003, 31(4):1250-1256.
6. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S *et al*: Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007, 33(4):606-618.
7. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003, 348(16):1546-1554.
8. Vincent JL: EPIC II: sepsis around the world. *Minerva Anesthesiol* 2008, 74(6):293-296.
9. Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, Wolff M, Spencer RC, Hemmer M: 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* 1995, 274(8):639-644.
10. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM: Septic shock. *Lancet* 2005, 365(9453):63-78.
11. Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B: Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 168(2):165-172.
12. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001, 29(7):1303-1310.
13. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Hwang T, Woolson RF, Wenzel RP: The dynamics of disease progression in sepsis: Markov modeling describing the natural history and the likely impact of effective antiseptics agents. *Clin Infect Dis* 1998, 27(1):185-190.
14. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulme R *et al*: Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2002, 28(2):108-121.
15. Schmid A, Burchardi H, Clouth J, Schneider H: Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. *Eur J Health Econ* 2002, 3(2):77-82.
16. Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, Schneider H, Burchardi H: Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med* 2002, 28(10):1440-1446.
17. Hubacek JA, Stuber F, Frohlich D, Book M, Wetegrove S, Ritter M, Rothe G, Schmitz G: Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med* 2001, 29(3):557-561.
18. Lin MT, Albertson TE: Genomic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Med* 2004, 32(2):569-579.

19. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helderbrand JD, Ely EW *et al*: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001, 344(10):699-709.
20. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troche G *et al*: Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002, 288(7):862-871.
21. Vincent JL: Microbial resistance: lessons from the EPIC study. European Prevalence of Infection. *Intensive Care Med* 2000, 26 Suppl 1:S3-8.
22. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP: Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 1997, 10(3):444-465.
23. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP: The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA* 1995, 273(2):117-123.
24. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R *et al*: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 2008, 36(1):296-327.
25. Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Gerlach H, Gründling M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A *et al*: Diagnose und Therapie der Sepsis. S-2 Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e. V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI): Teil 2 *Intensivmed* 2006, 43:464-475.
26. Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Gerlach H, Gründling M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A *et al*: Diagnose und Therapie der Sepsis. S-2 Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e. V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI): Teil 1. *Intensivmed* 2006, 43:369-384.
27. Brunkhorst FM, Reinhart K: [Diagnosis and causal treatment of sepsis]. *Internist (Berl)* 2009, 50(7):810-816.
28. Brunkhorst FM, Reinhart K: [Supportive and adjunctive sepsis therapy]. *Internist (Berl)* 2009, 50(7):817-824, 826-817.
29. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L *et al*: Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006, 34(6):1589-1596.
30. Barie PS, Williams MD, McCollam JS, Bates BM, Qualy RL, Lowry SF, Fry DE: Benefit/risk profile of drotrecogin alfa (activated) in surgical patients with severe sepsis. *Am J Surg* 2004, 188(3):212-220.
31. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH: Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, 49(4):1306-1311.
32. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M: Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001, 345(19):1368-1377.
33. Vincent JL: Management of sepsis in the critically ill patient: key aspects. *Expert Opin Pharmacother* 2006, 7(15):2037-2045.
34. Abraham E, Laterre PF, Garg R, Levy H, Talwar D, Trzaskoma BL, Francois B, Guy JS, Bruckmann M, Rea-Neto A *et al*: Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. *N Engl J Med* 2005, 353(13):1332-1341.

35. Vincent JL, Bernard GR, Beale R, Doig C, Putensen C, Dhainaut JF, Artigas A, Fumagalli R, Macias W, Wright T *et al*: Drotrecogin alfa (activated) treatment in severe sepsis from the global open-label trial ENHANCE: further evidence for survival and safety and implications for early treatment. *Crit Care Med* 2005, 33(10):2266-2277.
36. Nadel S, Goldstein B, Williams MD, Dalton H, Peters M, Macias WL, Abd-Allah SA, Levy H, Angle R, Wang D *et al*: Drotrecogin alfa (activated) in children with severe sepsis: a multicentre phase III randomised controlled trial. *Lancet* 2007, 369(9564):836-843.
37. Levi M, Levy M, Williams MD, Douglas I, Artigas A, Antonelli M, Wyncoll D, Janes J, Booth FV, Wang D *et al*: Prophylactic heparin in patients with severe sepsis treated with drotrecogin alfa (activated). *Am J Respir Crit Care Med* 2007, 176(5):483-490.
38. Annane D, Bellissant E, Bollaert PE, Briegel J, Confalonieri M, De Gaudio R, Keh D, Kupfer Y, Oppert M, Meduri GU: Corticosteroids in the treatment of severe sepsis and septic shock in adults: a systematic review. *JAMA* 2009, 301(22):2362-2375.
39. Chrousos GP: The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995, 332(20):1351-1362.
40. Maxime V, Lesur O, Annane D: Adrenal insufficiency in septic shock. *Clin Chest Med* 2009, 30(1):17-27, vii.
41. de Kruif MD, Lemaire LC, Giebelen IA, van Zoelen MA, Pater JM, van den Pangaart PS, Groot AP, de Vos AF, Elliott PJ, Meijers JC *et al*: Prednisolone dose-dependently influences inflammation and coagulation during human endotoxemia. *J Immunol* 2007, 178(3):1845-1851.
42. Jaattela M, Ilvesmaki V, Voutilainen R, Stenman UH, Saksela E: 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* 1991, 128(1):623-629.
43. Huang ZH, Gao H, Xu RB: Study on glucocorticoid receptors during intestinal ischemia shock and septic shock. *Circ Shock* 1987, 23(1):27-36.
44. Molijn GJ, Koper JW, van Uffelen CJ, de Jong FH, Brinkmann AO, Bruining HA, Lamberts SW: Temperature-induced down-regulation of the glucocorticoid receptor in peripheral blood mononuclear leucocyte in patients with sepsis or septic shock. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995, 43(2):197-203.
45. Annane D, Sebille V, Troche G, Raphael JC, Gajdos P, Bellissant E: A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. *JAMA* 2000, 283(8):1038-1045.
46. Fabian TC, Patterson R: Steroid therapy in septic shock. Survival studies in a laboratory model. *Am Surg* 1982, 48(12):614-617.
47. Heller AR, Heller SC, Borkenstein A, Stehr SN, Koch T: Modulation of host defense by hydrocortisone in stress doses during endotoxemia. *Intensive Care Med* 2003, 29(9):1456-1463.
48. Tsao CM, Ho ST, Chen A, Wang JJ, Li CY, Tsai SK, Wu CC: Low-dose dexamethasone ameliorates circulatory failure and renal dysfunction in conscious rats with endotoxemia. *Shock* 2004, 21(5):484-491.
49. Cronin L, Cook DJ, Carlet J, Heyland DK, King D, Lansang MA, Fisher CJ, Jr.: Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med* 1995, 23(8):1430-1439.
50. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, Weiss YG, Benbenishty J, Kalenka A, Forst H *et al*: Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med* 2008, 358(2):111-124.

51. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, Guilloux V, Tribut O, Arvieux C, Camus C, Fauchet R, Thomas R, Drenou B: Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, 169(10):1144-1151.
52. Marik PE, Pastores SM, Kavanagh BP: Corticosteroids for septic shock. *N Engl J Med* 2008, 358(19):2069-2070; author reply 2070-2061.
53. Meduri GU, Marik PE, Chrousos GP, Pastores SM, Arlt W, Beishuizen A, Bokhari F, Zaloga G, Annane D: Steroid treatment in ARDS: a critical appraisal of the ARDS network trial and the recent literature. *Intensive Care Med* 2008, 34(1):61-69.
54. Marik PE, Pastores SM, Annane D, Meduri GU, Sprung CL, Arlt W, Keh D, Briegel J, Beishuizen A, Dimopoulou I *et al*: 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* 2008, 36(6):1937-1949.
55. Inzucchi SE: Clinical practice. Management of hyperglycemia in the hospital setting. *N Engl J Med* 2006, 355(18):1903-1911.
56. Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Gerstein HC: Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview. *Lancet* 2000, 355(9206):773-778.
57. Gale SC, Sicoutris C, Reilly PM, Schwab CW, Gracias VH: Poor glycemic control is associated with increased mortality in critically ill trauma patients. *Am Surg* 2007, 73(5):454-460.
58. Krinsley JS: Association between hyperglycemia and increased hospital mortality in a heterogeneous population of critically ill patients. *Mayo Clin Proc* 2003, 78(12):1471-1478.
59. Wiener RS, Wiener DC, Larson RJ: Benefits and risks of tight glucose control in critically ill adults: a meta-analysis. *JAMA* 2008, 300(8):933-944.
60. Langley J, Adams G: Insulin-based regimens decrease mortality rates in critically ill patients: a systematic review. *Diabetes Metab Res Rev* 2007, 23(3):184-192.
61. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R: Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med* 2001, 345(19):1359-1367.
62. Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, Meersseman W, Wouters PJ, Milants I, Van Wijngaerden E, Bobbaers H, Bouillon R: Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N Engl J Med* 2006, 354(5):449-461.
63. Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, Moerer O, Gruendling M, Oppert M, Grond S *et al*: Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med* 2008, 358(2):125-139.
64. Finfer S, Chittock DR, Su SY, Blair D, Foster D, Dhingra V, Bellomo R, Cook D, Dodek P, Henderson WR *et al*: Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *N Engl J Med* 2009, 360(13):1283-1297.
65. Finfer S, Heritier S: The NICE-SUGAR (Normoglycaemia in Intensive Care Evaluation and Survival Using Glucose Algorithm Regulation) Study: statistical analysis plan. *Crit Care Resusc* 2009, 11(1):46-57.
66. Bellomo R, Egi M: Glycemic control in the intensive care unit: why we should wait for NICE-SUGAR. *Mayo Clin Proc* 2005, 80(12):1546-1548.
67. Bellomo R, Egi M: What is a NICE-SUGAR for patients in the intensive care unit? *Mayo Clin Proc* 2009, 84(5):400-402.
68. Carli P, Martin C: [Impact of Nice-Sugar: is there a need for another study on intensive glucose control in ICU?]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2009, 28(6):519-521.

69. Griesdale DE, de Souza RJ, van Dam RM, Heyland DK, Cook DJ, Malhotra A, Dhaliwal R, Henderson WR, Chittock DR, Finfer S *et al*: Intensive insulin therapy and mortality among critically ill patients: a meta-analysis including NICE-SUGAR study data. *CMAJ* 2009, 180(8):821-827.
70. Henderson WR, Finfer S: Differences in outcome between the NICE-SUGAR and Leuven trials: possible methodological explanations. *Crit Care Resusc* 2009, 11(3):175-177.
71. Myburgh JA, Chittock DR: Differences in outcome between the NICE-SUGAR and Leuven trials: biological mechanisms of intensive glucose control in critically ill patients. *Crit Care Resusc* 2009, 11(3):178-179.
72. Preiser JC: NICE-SUGAR: the end of a sweet dream? *Crit Care* 2009, 13(3):143.
73. Rabinstein AA: Hyperglycemia in critical illness: lessons from NICE-SUGAR. *Neurocrit Care* 2009, 11(1):131-132.
74. Van den Berghe G, Schetz M, Vlasselaers D, Hermans G, Wilmer A, Bouillon R, Mesotten D: Clinical review: Intensive insulin therapy in critically ill patients: NICE-SUGAR or Leuven blood glucose target? *J Clin Endocrinol Metab* 2009, 94(9):3163-3170.
75. Marshall JC, Vincent JL, Fink MP, Cook DJ, Rubenfeld G, Foster D, Fisher CJ, Jr., Faist E, Reinhart K: Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit Care Med* 2003, 31(5):1560-1567.
76. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, Vadas L, Pugin J: Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 164(3):396-402.
77. Muller B, Becker KL, Schachinger H, Rickenbacher PR, Huber PR, Zimmerli W, Ritz R: Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med* 2000, 28(4):977-983.
78. Schefold JC, Hasper D, Reinke P, Monneret G, Volk HD: Consider delayed immunosuppression into the concept of sepsis. *Crit Care Med* 2008, 36(11):3118.
79. Schefold JC, Hasper D, Volk HD, Reinke P: Sepsis: time has come to focus on the later stages. *Med Hypotheses* 2008, 71(2):203-208.
80. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H *et al*: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2009, 180(7):640-648.
81. Schefold JC, von Haehling S, Corsepilus M, Pohle C, Kruschke P, Zuckermann H, Volk HD, Reinke P: A novel selective extracorporeal intervention in sepsis: immunoadsorption of endotoxin, interleukin 6, and complement-activating product 5a. *Shock* 2007, 28(4):418-425.
82. Maruna P, Nedelnikova K, Gurlich R: Physiology and genetics of procalcitonin. *Physiol Res* 2000, 49 Suppl 1:S57-61.
83. Clec'h C, Fosse JP, Karoubi P, Vincent F, Chouahi I, Hamza L, Cupa M, Cohen Y: Differential diagnostic value of procalcitonin in surgical and medical patients with septic shock. *Crit Care Med* 2006, 34(1):102-107.
84. Monneret G, Doche C, Durand DV, Lepape A, Bienvenu J: Procalcitonin as a specific marker of bacterial infection in adults. *Clin Chem Lab Med* 1998, 36(1):67-68.
85. Brunkhorst FM: [Sepsismarker--what is useful?]. *Dtsch Med Wochenschr* 2008, 133(48):2512-2515.
86. Van Snick J: Interleukin-6: an overview. *Annu Rev Immunol* 1990, 8:253-278.

87. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL: Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med* 2000, 28(4 Suppl):N3-12.
88. Wakefield CH, Barclay GR, Fearon KC, Goldie AS, Ross JA, Grant IS, Ramsay G, Howie JC: Proinflammatory mediator activity, endogenous antagonists and the systemic inflammatory response in intra-abdominal sepsis. Scottish Sepsis Intervention Group. *Br J Surg* 1998, 85(6):818-825.
89. Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, Benjamin E: Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1996, 334(26):1697-1702.
90. Panacek EA, Marshall JC, Albertson TE, Johnson DH, Johnson S, MacArthur RD, Miller M, Barchuk WT, Fischkoff S, Kaul M *et al*: Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F(ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Crit Care Med* 2004, 32(11):2173-2182.
91. Kuster H, Weiss M, Willeitner AE, Detlefsen S, Jeremias I, Zbojan J, Geiger R, Lipowsky G, Simbruner G: Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet* 1998, 352(9136):1271-1277.
92. Bienvenu J, Monneret G, Fabien N, Revillard JP: The clinical usefulness of the measurement of cytokines. *Clin Chem Lab Med* 2000, 38(4):267-285.
93. Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ: Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science* 1990, 249(4975):1429-1431.
94. Sakr Y, Burgett U, Nacul FE, Reinhart K, Brunkhorst F: Lipopolysaccharide binding protein in a surgical intensive care unit: a marker of sepsis? *Crit Care Med* 2008, 36(7):2014-2022.
95. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A: Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med* 2008, 14(1-2):64-78.
96. Wolk K, Docke W, von Baehr V, Volk H, Sabat R: Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis. *Pathobiology* 1999, 67(5-6):253-256.
97. Pitton C, Fitting C, van Deuren M, van der Meer JW, Cavaillon JM: Different regulation of TNF alpha and IL-1ra synthesis in LPS-tolerant human monocytes. *Prog Clin Biol Res* 1995, 392:523-528.
98. Astiz M, Saha D, Lustbader D, Lin R, Rackow E: Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. *J Lab Clin Med* 1996, 128(6):594-600.
99. Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM: Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol* 2005, 5(10):793-806.
100. Pachot A, Lepape A, Vey S, Bienvenu J, Mouglin B, Monneret G: Systemic transcriptional analysis in survivor and non-survivor septic shock patients: a preliminary study. *Immunol Lett* 2006, 106(1):63-71.
101. Pachot A, Monneret G, Brion A, Venet F, Bohe J, Bienvenu J, Mouglin B, Lepape A: Messenger RNA expression of major histocompatibility complex class II genes in whole blood from septic shock patients. *Crit Care Med* 2005, 33(1):31-38; discussion 236-237.
102. Wolk K, Docke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R: Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood* 2000, 96(1):218-223.

103. Wolk K, Kunz S, Crompton NE, Volk HD, Sabat R: Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance. *J Biol Chem* 2003, 278(20):18030-18036.
104. Grutz G: New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 2005, 77(1):3-15.
105. Jung M, Sabat R, Kratzschmar J, Seidel H, Wolk K, Schonbein C, Schutt S, Friedrich M, Docke WD, Asadullah K *et al*: Expression profiling of IL-10-regulated genes in human monocytes and peripheral blood mononuclear cells from psoriatic patients during IL-10 therapy. *Eur J Immunol* 2004, 34(2):481-493.
106. Volk H, Asadullah K, Gallagher G, Sabat R, Grutz G: IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic targets. *Trends Immunol* 2001, 22(8):414-417.
107. Monneret G, Finck ME, Venet F, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A: The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. *Immunol Lett* 2004, 95(2):193-198.
108. Schwiebert LM, Schleimer RP, Radka SF, Ono SJ: Modulation of MHC class II expression in human cells by dexamethasone. *Cell Immunol* 1995, 165(1):12-19.
109. Basta PV, Moore TL, Yokota S, Ting JP: A beta-adrenergic agonist modulates DR alpha gene transcription via enhanced cAMP levels in a glioblastoma multiforme line. *J Immunol* 1989, 142(8):2895-2901.
110. Bandyopadhyay G, De A, Laudanski K, Li F, Lentz C, Bankey P, Miller-Graziano C: Negative signaling contributes to T-cell anergy in trauma patients. *Crit Care Med* 2007, 35(3):794-801.
111. Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC, Jr.: Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br J Surg* 1990, 77(2):204-207.
112. Wakefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ: Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg* 1993, 80(2):205-209.
113. Giannoudis PV, Smith RM, Perry SL, Windsor AJ, Dickson RA, Bellamy MC: Immediate IL-10 expression following major orthopaedic trauma: relationship to anti-inflammatory response and subsequent development of sepsis. *Intensive Care Med* 2000, 26(8):1076-1081.
114. Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Schiele A, Bremer F, Schywalsky M, Schuttler J: Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients. *Crit Care Med* 2002, 30(5):1015-1023.
115. Ditschkowski M, Kreuzfelder E, Rebmann V, Ferencik S, Majetschak M, Schmid EN, Obertacke U, Hirche H, Schade UF, Grosse-Wilde H: HLA-DR expression and soluble HLA-DR levels in septic patients after trauma. *Ann Surg* 1999, 229(2):246-254.
116. Walsh DS, Thavichaigarn P, Pattanapanyasat K, Siritongtaworn P, Kongcharoen P, Tongtawe P, Yongvanitchit K, Jiarakul N, Dheeradhada C, Pearce FJ *et al*: Characterization of circulating monocytes expressing HLA-DR or CD71 and related soluble factors for 2 weeks after severe, non-thermal injury. *J Surg Res* 2005, 129(2):221-230.
117. Sachse C, Prigge M, Cramer G, Pallua N, Henkel E: 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* 1999, 37(3):193-198.
118. Venet F, Tissot S, Debard AL, Faudot C, Crampe C, Pachot A, Ayala A, Monneret G: Decreased monocyte human leukocyte antigen-DR expression after severe burn injury: Correlation with severity and secondary septic shock. *Crit Care Med* 2007, 35(8):1910-1917.
 119. Strohmeyer JC, Blume C, Meisel C, Doecke WD, Hummel M, Hoeflich C, Thiele K, Unbehaun A, Hetzer R, Volk HD: Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. *Cytometry B Clin Cytom* 2003, 53(1):54-62.
 120. Satoh A, Miura T, Satoh K, Masamune A, Yamagiwa T, Sakai Y, Shibuya K, Takeda K, Kaku M, Shimosegawa T: Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral monocytes as a predictive marker of sepsis during acute pancreatitis. *Pancreas* 2002, 25(3):245-250.
 121. Richter A, Nebe T, Kattermann R, Trede M: [Immune paralysis in acute pancreatitis--HLA-DR antigen expression on CD14+DR+ monocytes]. *Langenbecks Arch Chir* 1996, 381(1):38-41.
 122. Richter A, Nebe T, Wendl K, Schuster K, Klaebisch G, Quintel M, Lorenz D, Post S, Trede M: HLA-DR expression in acute pancreatitis. *Eur J Surg* 1999, 165(10):947-951.
 123. Hoffman JA, Weinberg KI, Azen CG, Horn MV, Dukes L, Starnes VA, Woo MS: Human leukocyte antigen-DR expression on peripheral blood monocytes and the risk of pneumonia in pediatric lung transplant recipients. *Transpl Infect Dis* 2004, 6(4):147-155.
 124. Haveman JW, van den Berg AP, van den Berk JM, Mesander G, Slooff MJ, de Leij LH, The TH: Low HLA-DR expression on peripheral blood monocytes predicts bacterial sepsis after liver transplantation: relation with prednisolone intake. *Transpl Infect Dis* 1999, 1(3):146-152.
 125. Asadullah K, Woiciechowsky C, Docke WD, Egerer K, Kox WJ, Vogel S, Sterry W, Volk HD: Very low monocytic HLA-DR expression indicates high risk of infection--immunomonitoring for patients after neurosurgery and patients during high dose steroid therapy. *Eur J Emerg Med* 1995, 2(4):184-190.
 126. Asadullah K, Woiciechowsky C, Docke WD, Liebenthal C, Wauer H, Kox W, Volk HD, Vogel S, Von Baehr R: Immunodepression following neurosurgical procedures. *Crit Care Med* 1995, 23(12):1976-1983.
 127. Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P: Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 2006, 32(8):1175-1183.
 128. Landelle C, Lepape A, Vanhems P, Monneret G: Low monocyte human leukocyte antigen-DR expression is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *presented at the 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) - Helsinki, Finland* 2009.
 129. Landelle C, Lepape A, Francais A, Tognet E, Thizy H, Voirin N, Timsit JF, Monneret G, Vanhems P: Nosocomial infection after septic shock among intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008, 29(11):1054-1065.
 130. Volk HD, Lohmann T, Heym S, Golosubow A, Ruppe U, Reinke P, al. e: Decrease of the proportion of HLA-DR+ monocytes as prognostic parameter for the clinical outcome of septic disease. *In: Masihi KN, Lange W, eds Immunotherapeutic prospects of infectious diseases, Heidelberg: Springer Verlag* 1990:297-301.

131. Haveman JW, van den Berg AP, Verhoeven EL, Nijsten MW, van den Dungen JJ, The HT, Zwaveling JH: HLA-DR expression on monocytes and systemic inflammation in patients with ruptured abdominal aortic aneurysms. *Crit Care* 2006, 10(4):R119.
132. Hynninen M, Pettila V, Takkunen O, Orko R, Jansson SE, Kuusela P, Renkonen R, Valtonen M: Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. *Shock* 2003, 20(1):1-4.
133. Lekkou A, Karakantza M, Mouzaki A, Kalfarentzos F, Gogos CA: Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004, 11(1):161-167.
134. Docke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W: Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997, 3(6):678-681.
135. Saenz JJ, Izura JJ, Manrique A, Sala F, Gaminde I: Early prognosis in severe sepsis via analyzing the monocyte immunophenotype. *Intensive Care Med* 2001, 27(6):970-977.
136. Monneret G, Elmenkouri N, Bohe J, Debard AL, Gutowski MC, Bienvenu J, Lepape A: Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. *Clin Chem* 2002, 48(9):1589-1592.
137. Perry SE, Mostafa SM, Wenstone R, Shenkin A, McLaughlin PJ: Is low monocyte HLA-DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis? *Intensive Care Med* 2003, 29(8):1245-1252.
138. Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, Tervaert JW: Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med* 2000, 26(7):883-892.
139. Fumeaux T, Pugin J: Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166(11):1475-1482.
140. Docke WD, Hoflich C, Davis KA, Rottgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P *et al*: Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem* 2005, 51(12):2341-2347.
141. Nierhaus A, Montag B, Timmler N, Frings DP, Gutensohn K, Jung R, Schneider CG, Pothmann W, Brassel AK, Schulte Am Esch J: Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 2003, 29(4):646-651.
142. Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002, 420(6917):885-891.
143. Opal SM, Girard TD, Ely EW: The immunopathogenesis of sepsis in elderly patients. *Clin Infect Dis* 2005, 41 Suppl 7:S504-512.
144. Bone RC: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996, 24(7):1125-1128.
145. Volk HD, Reinke P, Docke WD: Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem Immunol* 2000, 74:162-177.
146. Volk HD, Reinke P, Krausch D, Zuckermann H, Asadullah K, Muller JM, Docke WD, Kox WJ: Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med* 1996, 22 Suppl 4:S474-481.
147. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk HD, Meisel C: Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care* 2009, 13(4):R119.

148. Monserrat J, de Pablo R, Reyes E, Diaz D, Barcenilla H, Zapata MR, De la Hera A, Prieto A, Alvarez-Mon M: Clinical relevance of the severe abnormalities of the T cell compartment in septic shock patients. *Crit Care* 2009, 13(1):R26.
149. Venet F, Bohe J, Debard AL, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G: Both percentage of gammadelta T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Crit Care Med* 2005, 33(12):2836-2840.
150. Venet F, Chung CS, Monneret G, Huang X, Horner B, Garber M, Ayala A: Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol* 2008, 83(3):523-535.
151. Meisel C, Hoflich C, Volk HD: [Immune monitoring in SIRS and sepsis based on the PIRO model]. *Dtsch Med Wochenschr* 2008, 133(45):2332-2336.
152. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Strobel M, Ziegler-Heitbrock HW: The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 1993, 82(10):3170-3176.
153. Huang X, Venet F, Chung CS, Lomas-Neira J, Ayala A: Changes in dendritic cell function in the immune response to sepsis. Cell- & tissue-based therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2007, 7(7):929-938.
154. Shortman K, Liu YJ: Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002, 2(3):151-161.
155. Efron PA, Martins A, Minnich D, Tinsley K, Ungaro R, Bahjat FR, Hotchkiss R, Clare-Salzler M, Moldawer LL: Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2004, 173(5):3035-3043.
156. Pichyangkul S, Endy TP, Kalayanarooj S, Nisalak A, Yongvanitchit K, Green S, Rothman AL, Ennis FA, Libraty DH: A blunted blood plasmacytoid dendritic cell response to an acute systemic viral infection is associated with increased disease severity. *J Immunol* 2003, 171(10):5571-5578.
157. Scumpia PO, McAuliffe PF, O'Malley KA, Ungaro R, Uchida T, Matsumoto T, Remick DG, Clare-Salzler MJ, Moldawer LL, Efron PA: CD11c+ dendritic cells are required for survival in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol* 2005, 175(5):3282-3286.
158. Hotchkiss RS, Chang KC, Grayson MH, Tinsley KW, Dunne BS, Davis CG, Osborne DF, Karl IE: Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100(11):6724-6729.
159. Tinsley KW, Grayson MH, Swanson PE, Drewry AM, Chang KC, Karl IE, Hotchkiss RS: Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. *J Immunol* 2003, 171(2):909-914.
160. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Karl IE: Role of apoptotic cell death in sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003, 35(9):585-592.
161. Guisset O, Dilhuydy MS, Thiebaut R, Lefevre J, Camou F, Sarrat A, Gabinski C, Moreau JF, Blanco P: Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med* 2007, 33(1):148-152.
162. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith C, Karl IE: Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 2002, 168(5):2493-2500.
163. Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, Buchman TG, Karl IE: Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999, 27(7):1230-1251.
164. Wysocka M, Robertson S, Riemann H, Caamano J, Hunter C, Mackiewicz A, Montaner LJ, Trinchieri G, Karp CL: IL-12 suppression during experimental

- endotoxin tolerance: dendritic cell loss and macrophage hyporesponsiveness. *J Immunol* 2001, 166(12):7504-7513.
165. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF: Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 2006, 368(9530):157-169.
 166. Simms HH, D'Amico R: Polymorphonuclear leukocyte dysregulation during the systemic inflammatory response syndrome. *Blood* 1994, 83(5):1398-1407.
 167. Ward PA: The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2004, 4(2):133-142.
 168. Guthrie LA, McPhail LC, Henson PM, Johnston RB, Jr.: Priming of neutrophils for enhanced release of oxygen metabolites by bacterial lipopolysaccharide. Evidence for increased activity of the superoxide-producing enzyme. *J Exp Med* 1984, 160(6):1656-1671.
 169. Daniels RH, Finnen MJ, Hill ME, Lackie JM: Recombinant human monocyte IL-8 primes NADPH-oxidase and phospholipase A2 activation in human neutrophils. *Immunology* 1992, 75(1):157-163.
 170. Weiss M, Elsharkawi M, Welt K, Schneider EM: Transient leukocytosis, granulocyte colony-stimulating factor plasma concentrations, and apoptosis determined by binding of annexin V by peripheral leukocytes in patients with severe sepsis. *Ann N Y Acad Sci* 2003, 1010:742-747.
 171. Sweeney JF, Nguyen PK, Omann GM, Hinshaw DB: Lipopolysaccharide protects polymorphonuclear leukocytes from apoptosis via tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *J Surg Res* 1998, 74(1):64-70.
 172. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sazzani S, Mantovani A: Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992, 80(8):2012-2020.
 173. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003, 348(2):138-150.
 174. Ochoa JB, Makarenkova V: T lymphocytes. *Crit Care Med* 2005, 33(12 Suppl):S510-513.
 175. Holub M, Kluckova Z, Beneda B, Hobstova J, Huzicka I, Prazak J, Lobovska A: Changes in lymphocyte subpopulations and CD3+/DR+ expression in sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2000, 6(12):657-660.
 176. Holub M, Kluckova Z, Helcl M, Prihodov J, Rokyta R, Beran O: Lymphocyte subset numbers depend on the bacterial origin of sepsis. *Clin Microbiol Infect* 2003, 9(3):202-211.
 177. Kabisch S, Gemar K, Krumholz W, Salomon F, Pralle H: [Lymphocyte subpopulations in patients at risk of sepsis in a surgical intensive care unit]. *Anaesthesist* 1990, 39(9):439-444.
 178. Lin RY, Astiz ME, Saxon JC, Rackow EC: Altered leukocyte immunophenotypes in septic shock. Studies of HLA-DR, CD11b, CD14, and IL-2R expression. *Chest* 1993, 104(3):847-853.
 179. Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, Tattevin P, Thomas R, Fauchet R, Drenou B: Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 2002, 18(6):487-494.
 180. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG *et al*: Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001, 166(11):6952-6963.
 181. Nishijima MK, Takezawa J, Hosotsubo KK, Takahashi H, Shimada Y, Yoshiya I: Serial changes in cellular immunity of septic patients with multiple organ-system failure. *Crit Care Med* 1986, 14(2):87-91.

182. Toti P, De Felice C, Occhini R, Schuerfeld K, Stumpo M, Epistolato MC, Vatti R, Buonocore G: Spleen depletion in neonatal sepsis and chorioamnionitis. *Am J Clin Pathol* 2004, 122(5):765-771.
183. Papathanassoglou ED, Moynihan JA, McDermott MP, Ackerman MH: Expression of Fas (CD95) and Fas ligand on peripheral blood mononuclear cells in critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival. *Crit Care Med* 2001, 29(4):709-718.
184. Ayala A, Herdon CD, Lehman DL, DeMaso CM, Ayala CA, Chaudry IH: The induction of accelerated thymic programmed cell death during polymicrobial sepsis: control by corticosteroids but not tumor necrosis factor. *Shock* 1995, 3(4):259-267.
185. Ayala A, Xin Xu Y, Ayala CA, Sonefeld DE, Karr SM, Evans TA, Chaudry IH: Increased mucosal B-lymphocyte apoptosis during polymicrobial sepsis is a Fas ligand but not an endotoxin-mediated process. *Blood* 1998, 91(4):1362-1372.
186. Bogdan I, Leib SL, Bergeron M, Chow L, Tauber MG: Tumor necrosis factor-alpha contributes to apoptosis in hippocampal neurons during experimental group B streptococcal meningitis. *J Infect Dis* 1997, 176(3):693-697.
187. Menges T, Engel J, Welters I, Wagner RM, Little S, Ruwoldt R, Wollbrueck M, Hempelmann G: Changes in blood lymphocyte populations after multiple trauma: association with posttraumatic complications. *Crit Care Med* 1999, 27(4):733-740.
188. Tang ML, Steeber DA, Zhang XQ, Tedder TF: Intrinsic differences in L-selectin expression levels affect T and B lymphocyte subset-specific recirculation pathways. *J Immunol* 1998, 160(10):5113-5121.
189. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD: Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med* 2000, 26 Suppl 1:S124-128.
190. Munford RS, Pugin J: Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive. *Am J Respir Crit Care Med* 2001, 163(2):316-321.
191. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, Shevach EM: CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 2002, 196(2):237-246.
192. Shevach EM: CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002, 2(6):389-400.
193. Sonoda KH, Exley M, Snapper S, Balk SP, Stein-Streilein J: CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J Exp Med* 1999, 190(9):1215-1226.
194. Zedler S, Bone RC, Baue AE, von Donnersmarck GH, Faist E: T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns. *Crit Care Med* 1999, 27(1):66-72.
195. Saito K, Wagatsuma T, Toyama H, Ejima Y, Hoshi K, Shibusawa M, Kato M, Kurosawa S: Sepsis is characterized by the increases in percentages of circulating CD4+CD25+ regulatory T cells and plasma levels of soluble CD25. *Tohoku J Exp Med* 2008, 216(1):61-68.
196. Kessel A, Bamberger E, Masalha M, Toubi E: The role of T regulatory cells in human sepsis. *J Autoimmun* 2009, 32(3-4):211-215.
197. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G: Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med* 2004, 32(11):2329-2331.
198. Monneret G, Debard AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, Lepape A: Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med* 2003, 31(7):2068-2071.
199. Venet F, Chung CS, Kherouf H, Geeraert A, Malcus C, Poitevin F, Bohe J, Lepape A, Ayala A, Monneret G: Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25

- (+)CD127 (-) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med* 2009, 35(4):678-686.
200. Taams LS, van Amelsfort JM, Tiemessen MM, Jacobs KM, de Jong EC, Akbar AN, Bijlsma JW, Lafeber FP: Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum Immunol* 2005, 66(3):222-230.
 201. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, Powell WS, Monneret G: Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol* 2006, 177(9):6540-6547.
 202. Parrino J, Hotchkiss RS, Bray M: Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. *Emerg Infect Dis* 2007, 13(2):191-198.
 203. Turrel F, Guignant C, Venet F, Lepape A, Monneret G: Innovative therapeutic strategies for restoring lymphocyte functions in septic patients. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2008, 7(3):181-186.
 204. la Sala A, Gadina M, Kelsall BL: 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* 2005, 175(5):2994-2999.
 205. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA: A key role of C5a/C5aR activation for the development of sepsis. *J Leukoc Biol* 2003, 74(6):966-970.
 206. Riedemann NC, Guo RF, Neff TA, Laudes IJ, Keller KA, Sarma VJ, Markiewski MM, Mastellos D, Strey CW, Pierson CL *et al*: Increased C5a receptor expression in sepsis. *J Clin Invest* 2002, 110(1):101-108.
 207. Moffett JR, Namboodiri MA: Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol* 2003, 81(4):247-265.
 208. Thackray SJ, Mowat CG, Chapman SK: Exploring the mechanism of tryptophan 2,3-dioxygenase. *Biochem Soc Trans* 2008, 36(Pt 6):1120-1123.
 209. Ploder M, Spittler A, Schroecksadel K, Neurauter G, Pelinka LE, Roth E, Fuchs D: Tryptophan degradation in multiple trauma patients: survivors compared with non-survivors. *Clin Sci (Lond)* 2009, 116(7):593-598.
 210. Huttunen R, Syrjanen J, Aittoniemi J, Oja SS, Raitala A, Laine J, Pertovaara M, Vuento R, Huhtala H, Hurme M: High activity of indoleamine 2,3 dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. *Shock* 2009.
 211. Pugin J: Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Found Symp* 2007, 280:21-27; discussion 27-36, 160-164.
 212. Hamilton JA: Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008, 8(7):533-544.
 213. Agnes A, Zippel K, Zuckermann H, Docke WD, Volk HD, Muller JM: [Immune stimulation with G-CSF (Neupogen) in septic patients with immune paralysis]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998, 115:1077-1079.
 214. Rodriguez FH, Nelson S, Kolls JK: Cytokine therapeutics for infectious diseases. *Curr Pharm Des* 2000, 6(6):665-680.
 215. Root RK, Lodato RF, Patrick W, Cade JF, Fotheringham N, Milwee S, Vincent JL, Torres A, Rello J, Nelson S: Multicenter, double-blind, placebo-controlled study of the use of filgrastim in patients hospitalized with pneumonia and severe sepsis. *Crit Care Med* 2003, 31(2):367-373.
 216. Cheng AC, Stephens DP, Currie BJ: Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) as an adjunct to antibiotics in the treatment of pneumonia in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2003(4):CD004400.
 217. Presneill JJ, Harris T, Stewart AG, Cade JF, Wilson JW: A randomized phase II trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in severe sepsis with respiratory dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2002, 166(2):138-143.

218. Cazzola M, Page CP, Matera MG: Alternative and/or integrative therapies for pneumonia under development. *Curr Opin Pulm Med* 2004, 10(3):204-210.
219. Ballinger MN, Paine R, 3rd, Serezani CH, Aronoff DM, Choi ES, Standiford TJ, Toews GB, Moore BB: Role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor during gram-negative lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006, 34(6):766-774.
220. Baleeiro CE, Christensen PJ, Morris SB, Mendez MP, Wilcoxon SE, Paine R, 3rd: GM-CSF and the impaired pulmonary innate immune response following hyperoxic stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006, 291(6):L1246-1255.
221. Lieschke GJ, Grail D, Hodgson G, Metcalf D, Stanley E, Cheers C, Fowler KJ, Basu S, Zhan YF, Dunn AR: Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 1994, 84(6):1737-1746.
222. Paine R, 3rd, Preston AM, Wilcoxon S, Jin H, Siu BB, Morris SB, Reed JA, Ross G, Whitsett JA, Beck JM: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the innate immune response to *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *J Immunol* 2000, 164(5):2602-2609.
223. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA: Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004, 75(2):163-189.
224. Nakos G, Malamou-Mitsi VD, Lachana A, Karassavoglou A, Kitsioulis E, Agnandi N, Lekka ME: Immunoparalysis in patients with severe trauma and the effect of inhaled interferon-gamma. *Crit Care Med* 2002, 30(7):1488-1494.
225. Polk HC, Jr., Cheadle WG, Livingston DH, Rodriguez JL, Starko KM, Izu AE, Jaffe HS, Sonnenfeld G: A randomized prospective clinical trial to determine the efficacy of interferon-gamma in severely injured patients. *Am J Surg* 1992, 163(2):191-196.
226. Dries DJ, Jurkovich GJ, Maier RV, Clemmer TP, Struve SN, Weigelt JA, Stanford GG, Herr DL, Champion HR, Lewis FR *et al*: Effect of interferon gamma on infection-related death in patients with severe injuries. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arch Surg* 1994, 129(10):1031-1041; discussion 1042.
227. Skerrett SJ, Martin TR: Intratracheal interferon-gamma augments pulmonary defenses in experimental legionellosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 149(1):50-58.
228. Tateda K, Matsumoto T, Ishii Y, Furuya N, Ohno A, Miyazaki S, Yamaguchi K: Serum cytokines in patients with *Legionella* pneumonia: relative predominance of Th1-type cytokines. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998, 5(3):401-403.
229. Wunderink RG: Adjunctive therapy in community-acquired pneumonia. *Semin Respir Crit Care Med* 2009, 30(2):146-153.
230. Ono S, Tsujimoto H, Matsumoto A, Ikuta S, Kinoshita M, Mochizuki H: Modulation of human leukocyte antigen-DR on monocytes and CD16 on granulocytes in patients with septic shock using hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fiber. *Am J Surg* 2004, 188(2):150-156.
231. Cruz DN, Antonelli M, Fumagalli R, Foltran F, Brienza N, Donati A, Malcangi V, Petrini F, Volta G, Bobbio Pallavicini FM *et al*: Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock: the EUPHAS randomized controlled trial. *JAMA* 2009, 301(23):2445-2452.
232. Wysocka M, Montaner LJ, Karp CL: Flt3 ligand treatment reverses endotoxin tolerance-related immunoparalysis. *J Immunol* 2005, 174(11):7398-7402.
233. Scumpia PO, Delano MJ, Kelly-Scumpia KM, Weinstein JS, Wynn JL, Winfield RD, Xia C, Chung CS, Ayala A, Atkinson MA *et al*: Treatment with GITR agonistic antibody corrects adaptive immune dysfunction in sepsis. *Blood* 2007, 110(10):3673-3681.

234. Hoflich C, Volk HD: [Immunomodulation in sepsis]. *Chirurg* 2002, 73(11):1100-1104.
235. Webster NR, Galley HF: Immunomodulation in the critically ill. *Br J Anaesth* 2009, 103(1):70-81.
236. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A: Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol* 2005, 78(2):325-337.
237. Flohe S, Scholz M: HLA-DR monitoring in the intensive care unit--more than a tool for the scientist in the laboratory? *Crit Care Med* 2009, 37(10):2849-2850.
238. Lukaszewicz AC, Griénay M, Resche-Rigon M, Pirracchio R, Faivre V, Boval B, Payen D: Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med* 2009, 37(10):2746-2752.
239. Carlet J, Cohen J, Calandra T, Opal SM, Masur H: Sepsis: time to reconsider the concept. *Crit Care Med* 2008, 36(3):964-966.

6. Danksagung

Zunächst gilt mein ganz besonderer Dank Frau Prof. Petra Reinke. Sie hat mich an die klinische Forschung und an immunologische Fragestellungen herangeführt und hat meine Begeisterung und mein Interesse stets gefördert. Ihre visionären Ideen haben mich maßgeblich beeinflusst. Sie hat nie an meinem Potential gezweifelt und mich sowohl klinisch als auch wissenschaftlich immer bestärkt und begleitet. Hierfür danke ich Ihr herzlich.

Mein besonderer Dank gilt zudem Herrn Prof. Hans-Dieter Volk. Er hat schon in der Studentenzeit mein Interesse an der Immunologie geweckt, mir immunologisches Verständnis vermittelt, und er hat mich in allen Belangen meiner wissenschaftlichen Arbeit unterstützt und gefördert. Seine Visionen haben mich geprägt.

Herrn Prof. Ulrich Frei und Herrn Prof. Dr. Achim Jörres möchte ich für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen und klinischen Tätigkeit, für viele wertvolle Anregungen und die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen danken.

Ich möchte mich bei allen Oberärzten, Ärzten, Schwestern/ Pflägern der Intensivstationen und bei allen medizinisch-technischen Assistenten für die Unterstützung bedanken. Ich danke insbesondere auch allen Ärzten, Mitarbeitern und Doktoranden unserer Arbeitsgruppe sehr herzlich. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Mein Dank gilt hier insbesondere Dietrich Hasper, Malte Corsepius und Rene Pschowski.

Schließlich möchte ich meiner ganzen Familie aus tiefstem Herzen für eine stets grenzenlose liebevolle Unterstützung in allen Lebenslagen danken.

7. Eidesstattliche Erklärung

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Datum

Unterschrift