

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss einer immunstimulatorischen Therapie mit GM-CSF auf
die T-Zell-vermittelte Immunität bei Patienten mit schwerer Sepsis
und Immunparalyse**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katrin Susann Stadler
geb. Hetzger

aus Hildburghausen

Datum der Promotion: 03.03.2023

Vorwort

“Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD. 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 Oct 1;180(7):640-8”/ Oktober 2009

Inhaltsverzeichnis

	<i>Seite</i>
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	8
Zusammenfassung	11
Abstract	12
1 Einleitung	13
1.1 Definition der Sepsis	14
1.2 Die Immunantwort im Rahmen der Sepsis	17
1.3 T-Lymphozyten im Rahmen der Sepsis	22
1.3.1 T-Zell Apoptose	22
1.3.2 T-Zell Anergie	23
1.3.3 Regulatorische T-Zellen in der Sepsis	24
1.4 Reifung von T-Lymphozyten im Thymus	26
1.5 Problemstellung	27
1.5.1 Immunstimulatorische Therapien in der Behandlung von Sepsispatienten	28
1.5.2 Immunstimulatorische Therapie mit GM-CSF	29
1.5.3 Arbeitshypothesen	31
2 Material und Methoden	32
2.1 Material	32
2.2 Methoden	36
2.2.1 Studiendesign	36
2.2.2 Applikation der Studienmedikation und Blutentnahme	36
2.2.3 Laborbestimmungen	37
2.2.4 Durchflusszytometrische Bestimmung von Oberflächenproteinen	38
2.2.5 Überprüfung der T-Lymphozytenfunktion	40
2.2.6 Statistik	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Studienpopulation	43
3.2 Entwicklung der HLA-DR Expression auf Monozyten	44
3.3 Blutbildveränderungen	46

3.4	Entwicklung der T-Lymphozyten	46
3.4.1	Entwicklung von T-Zellpopulationen	47
3.5	Zytokinkonzentrationen nach Stimulation <i>ex vivo</i>	56
3.5.1	Stimulation mit Recall-Antigengemisch	58
3.5.2	Stimulation mit PMA/Ionomycin	58
3.5.3	Stimulation mit ConcanavalinA	61
3.6	Effekt der immunstimulatorischen Therapie auf das Outcome	61
3.7	Verträglichkeit der Studienmedikation und unerwünschte Wirkungen	62
4	Diskussion	63
4.1	Einsatz von GM-CSF in der Behandlung von Sepsispatienten	64
4.2	Hochregulierung von HLA-DR durch GM-CSF	66
4.2.1	HLA-DR zur Überwachung der Immunkompetenz	67
4.3	Entwicklung der T-Lymphozyten nach Therapie mit GM-CSF	68
4.3.1	Einfluss auf die Apoptoserate von T-Lymphozyten	68
4.3.2	Einfluss von GM-CSF auf verschiedenen T-Zell Populationen	69
4.3.3	Einfluss auf die T-Lymphozyten Funktion	71
5	Konklusion und Ausblick	75
6	Referenzen	77
	Eidesstattliche Erklärung	87
	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	88
	Lebenslauf	89
	Publikationsliste	91
	Danksagung	92

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Abbildung Nr.	Titel	Seite
Abb. 1.1*	Möglicher Verlauf der Immunantwort in Sepsis-Patienten	21
Abb. 2.1	Zeitlicher Ablauf der Studie	37
Abb. 3.1	Flussdiagramm zu Einschluss und Randomisierung der Patienten	43
Abb. 3.2	Entwicklung der monozytären HLA-DR Expression	45
Abb. 3.3	Entwicklung der Gesamtzahl der T-Lymhozyten	47
Abb. 3.4	Entwicklung der CD4+ T-Helferzellen	48
Abb. 3.5	Entwicklung der CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten	49
Abb. 3.6	Entwicklung der Zellzahlen der naiven T-Lymhozyten	50
Abb. 3.7	Entwicklung der regulatorischen T-Zellen	51
Abb. 3.8	Entwicklung der RTEs	52
Abb. 3.9	Entwicklung von Aktivierungsmarkern auf CD4+ T-Lymphozyten,	53
Abb. 3.10	Entwicklung von Aktivierungsmarkern auf CD8+ T-Lymphozyten,	54
Abb. 3.11	Zytokinkonzentration nach Stimulation mit Recall Antigen-Gemisch	59
Abb. 3.12	Zytokinkonzentration nach Stimulation mit PMA/Ionomycin,	60
Abb. 4.1*	Vom SIRS/CARS Modell zum PICS Modell	74

* mit freundlicher Genehmigung der Autoren

Tabellen

Tabelle Nr.	Titel	Seite
Tab. 3.1	Basisdaten der Patienten bei Einschluss in die Studie	44
Tab. 3.2	Zellzahl verschiedener Lymphozytenpopulationen/Prozentualer Anteil verschiedener Lymphozyten-Subpopulationen an CD4+ und CD8+ T-Zellen	55
Tab. 3.3	Zytokinkonzentrationen nach Stimualtion <i>in vitro</i>	57
Tab. 3.4	Vergleich der 28-Tage-Mortalität der Patientengruppen.	61

Abkürzungsverzeichnis

AE/SAE	engl.: adverse event/(serious) adverse event
AK	Antikörper
AMI	Akuter Myokardinfarkt
APC	engl.: antigen-presenting cell
APC	Allophycocyanin
Bcl	engl.: B-cell lymphoma
CARS	engl.: compensatory anti-inflammatory response syndrome
CBA	engl.: cytometric bead array
CD	engl.: cluster of differentiation
CMV	Cytomegalovirus
ConA	Concanavalin A
CPR	engl.: cardiopulmonary resuscitation
CRP	C-reaktives Protein
CTLA	engl.: cytotoxic T lymphocyte antigen
DC	engl.: dendritic cell
DIC	engl.: disseminated intravascular coagulation
DN	Doppelt negativ
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid
ECD	Phycoerythrin-Texas Red
EDTA	engl.: ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	engl.: flow cytometry staining buffer
Fas	engl.: FS-7-associated surface antigen
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Fox	engl.: forkhead box
FSC	engl.: forward light scatter
g	Gramm
G	Gravitationskraft
G-CSF	engl.: granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	engl.: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
h	Stunde

HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA-DR	engl.: human leukocyte antigen-DR isotype
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	engl.: interferon gamma-induced protein
IP	Immunparalyse
ITS	Intensivstation
ITT	engl.: intention to treat
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LBP	engl.: LPS-binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
m	Meter
MALP	engl.: macrophage activating lipopeptides
MHC	engl.: major histocompatibility complex
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
MODS	engl.: multiple organ dysfunction syndrome
Mrd.	Milliarden
n	nano
NKT	engl.: natural killer t cell
NOD	engl.: nucleotide-binding oligomerization domain
p	pico
PaCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PAMP	engl.: pathogen associated molecular patterns
PBMC	engl.: peripheral blood mononuclear cell
PD	engl.: programmed cell death protein
PD	engl.: programmed death-ligand

PE	Phycoerythrin
PE_Cy	Phycoerythrin-Cyanin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PGRP	engl.: peptidoglycane-recognition proteins
PICS	engl.: persistent inflammation, immunosuppression and catabolism syndrome
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
PP	engl.: per protocol
qRT-PCR	engl.: quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
RANTES	engl.: regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (CCL5)
RTE	engl.: recent thymic emigrant
SD	Standardabweichung
SIRS	engl.: Systemic inflammatory response syndrome
SOFA	engl.: sequential organ failure assessment
SSC	engl.: sideward light scatter
TCR	engl.: t-cell receptor
TF	engl.: tissue factor
TGF	engl.: tumor growth factor
Th/T _H	T-Helferzelle
TLR	engl.: toll-like receptor
TLR	engl.: toll-like receptor
TNF	Tumor Nekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
TREM	engl.: triggering receptor expressed on myeloid cells
V	Visite
μ	mikro

Zusammenfassung

Trotz besseren Verständnisses der komplexen immunologischen Prozesse bei der Bekämpfung der Sepsis, ist die Mortalitätsrate betroffener Patienten noch immer sehr hoch. Neben der Verbesserung kausaler und supportiver Therapiemaßnahmen sind adjuvante immunologische Therapiemöglichkeiten in den vergangenen Jahrzehnten in den Fokus gerückt.

Der Einsatz von Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) zielt dabei auf die Umkehrung der Sepsis-induzierten Immunparalyse, eine schwere andauernde Beeinträchtigung der Immunkompetenz ab. Die durchgeführte Studie stellt die erste klinische Studie zum Einsatz von GM-CSF in Sepsispatienten unter Monitoring von deren Immundefunktion dar. Im Zeitraum von November 2005 bis Januar 2007 wurden insgesamt 38 Patienten mit Sepsis und nachgewiesener Immunparalyse im Rahmen der prospektiven, randomisierten doppelblinden Placebo-kontrollierten Studie behandelt. Es zeigt sich in der mit GM-CSF behandelten Patientengruppe ein rascher und signifikanter Anstieg der monozytären HLA-DR Konzentration als Marker der Immunkompetenz. Die vorliegende Arbeit untersucht die Auswirkungen der Therapie auf T-Lymphozytenpopulationen und deren Funktion. Es konnte ein signifikanter Anstieg der Gesamtzahl der T-Lymphozyten sowie der CD4+ T Helferzellen und CD8+ zytotoxischen T-Zellen in der mit GM-CSF behandelten Patientengruppe nachgewiesen werden. Für die regulatorischen T-Zellen und die untersuchten Differenzierungsstufen der T-Zellen sowie verschiedene Aktivierungsmarker konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zur Placebogruppe gefunden werden. Auch in Bezug auf die T-Zellfunktion, gemessen an deren Zytokinproduktion nach Stimulation *ex vivo* ließ sich kein signifikanter Effekt nachweisen. Vergleichbare Ergebnisse, vor allem in Bezug auf Zellen des angeborenen Immunsystems, konnten bereits von anderen Forschungsgruppen gezeigt werden. Aufgrund zu geringer Fallzahlen ließ sich bisher noch kein eindeutiger Nachweis einer sinkenden Mortalität erbringen. Die bisherigen Ergebnisse lassen jedoch eine Multizenterstudie zur immunstimulatorischen Therapien mit klinischen Endpunkten wie Mortalität gerechtfertigt erscheinen. Diese wäre ein wichtiger nächster Schritt hin zu einer maßgeschneiderten immunologischen Behandlung für Sepsispatienten.

Schlüsselwörter: *Sepsis – Immunparalyse – GM-CSF – T-Lymphozyten - HLA-DR*

Abstract

Despite growing knowledge of the complex immune response in sepsis the mortality remains high. In addition to improvements in causal and supportive intensive care medicine, several immunoadjuvant therapies have been tested in the last decades.

GM-CSF was used here for the first time in an immune biomarker-guided prospective, randomized, controlled, double-blind, placebo-controlled trial to reverse sepsis - induced immunoparalysis, a severe and lasting impairment of the immune response to infections. From November 2005 until January 2007, 38 patient with sepsis and immunoparalysis were included in this study.

In patients treated with GM-CSF there was an immediate and significant increase in monocytic HLA-DR expression and cytokine production as an indicator for the recovery of immune competence.

This thesis describes the effects of GM-CSF on the acquired immune system and T lymphocytes in particular. Both total T lymphocyte- as well as CD4 and CD8 positive T cell counts increased in the patients treated with GM-CSF compared to those receiving placebo. For regulatory T cells and other subgroups as well as several activation markers no differences were observed. The lymphocyte function, determined by cytokine production after *ex vivo* stimulation showed no significant differences between groups or over the course of the trial.

These results are in accordance with those of several other groups who have studied immunoadjuvant therapies in sepsis patients, most of which concentrated on examining cells of the innate immune system. Since most of these trials, this one included, lack sufficient power, no certain effect has been shown on patient survival/mortality yet. But because of their promising results multicenter trials as the next step towards an individualized immunological treatment for sepsis patients are warranted.

Keywords: *sepsis – immunoparalysis – GM-CSF - T lymphocytes – HLA-DR*

1 Einleitung

Trotz des zunehmenden Verständnisses der morphologischen, zellbiologischen, biochemischen, zirkulatorischen und nicht zuletzt immunologischen Zusammenhänge stellt die Sepsis noch immer eine der großen Herausforderungen auf dem Gebiet der Intensivmedizin dar. Auf nicht kardiologischen Intensivstationen ist sie die Haupttodesursache und bedingt auch auf die Gesamtbevölkerung bezogen etwa 10% aller Todesfälle.^[1,2,3] Die Prävalenz der Sepsis liegt in den USA bei ca. 750.000 und in Deutschland bei ca. 75.000 Erkrankungen pro Jahr, das entspricht ca. 300 bzw. 100 Fällen pro 100.000 Einwohner. Weltweit betrachtet schwankt die Inzidenz zum Teil erheblich. Für die (nach früheren Kriterien schwere) Sepsis fanden sich in einer Metaanalyse^[4] für den Zeitraum von 1979 bis 2012 Schwankungen von ca. 50 Fällen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr für Nordeuropa bis zu über 1.000 Fällen pro 100.000 in den USA. Etwa ein Drittel der Patienten auf Intensivstationen ist zum Zeitpunkt der Aufnahme an einer Sepsis erkrankt oder entwickelt diese im Rahmen seines Aufenthaltes.^[2] Dank des Einsatzes hochpotenter Antibiotika und verbesserter supportiver Therapien, wie beispielsweise Beatmungs- und Dialyseverfahren, ist die Mortalität in den letzten Jahren gesunken.^[4,5] Sie beträgt in Abhängigkeit von der Schwere der Sepsis ca. 5 - 40%. Die Inzidenz der Sepsis hat sich demgegenüber in den letzten Jahrzehnten vervielfacht.^[1,4] Dies ist einerseits auf den zunehmenden Einsatz invasiver therapeutischer Verfahren wie zum Beispiel zentraler Verweilkatheter zurückzuführen, die eine bedeutende Eintrittspforte für Erreger darstellen. Andererseits spielt auch die Zunahme der Anzahl immunsupprimierter Patienten eine entscheidende Rolle. Vor allem die steigende Anzahl von Patienten, die, zum Beispiel im Rahmen von malignen oder rheumatischen Erkrankungen oder nach Transplantationen, mit Immunsuppressiva behandelt werden, und in einigen Teilen der Welt auch die zunehmende Verbreitung von HIV, sind hierbei von Bedeutung. Des Weiteren lassen sich insbesondere nosokomial erworbene Infektionen durch die Zunahme resistenter Keime immer schwieriger beherrschen. Infektionen, Diabetes mellitus sowie andere chronische Erkrankungen, deren Überlebensraten in den letzten Jahren gestiegen sind, prädisponieren ebenfalls für die Entwicklung eines septischen Krankheitsbildes.^[1,6]

Die Ausgaben für die Behandlung der Sepsis sind aufgrund langer Liegezeiten und kostenintensiver Therapien überdurchschnittlich hoch. Die jährlichen Kosten, die durch die Versorgung dieser Patienten entstehen, werden in den USA auf ca. \$ 16,7 Mrd. und in Deutschland auf ca. 4 bis 7 Mrd. € geschätzt.^[7,8]

Einleitung

Sie stellt somit ein sowohl in gesundheitspolitischer als auch wirtschaftlicher Hinsicht wichtiges Thema dar.

1.1 Definition der Sepsis

Bereits 400 v. Chr. definierte Hippokrates die Sepsis (altgriechisch *σηψις*, „Fäulnis“) als eine Erkrankung, die nach einer Verwundung als Fieber beginnt und häufig mit dem Tod endet. Bis ins 19. Jahrhundert fand diese Definition Anwendung. Erst mit der Entdeckung von Bakterien als Erreger von Fäulnis und Verwesung wurde der Weg für eine moderne Definition bereitet. Diese formulierte Schottmüller (1867-1936) wie folgt: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem kontinuierlich oder periodisch pathogene Bakterien in den Kreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“. Durch Beobachtungen an intensivmedizinischen Patienten in den 1980er Jahren gelangte Bone (1941-1997) zu der noch heute gültigen allgemeinen 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."^[9] Er fasst hierin einige der nach damaligem Verständnis fünf Grundpfeiler des septischen Prozesses auf: (1) der septische Fokus, d.h. der Infektionsherd als Ausgangspunkt für (2) die Invasion von pathogenen Keimen und toxischen Keimprodukten und (3) die Bildung und Aktivierung von Mediatoren. Die weiteren Punkte umfassen (4) die Zellschädigung in Form von Funktionsstörungen und morphologischen Veränderungen von Zellen sowie durch Auslösung von Apoptose und (5) die Multiorgan dysfunktion bzw. das Multiorganversagen als klinischen Ausdruck und Endpunkt des septischen Prozesses.^[10]

Um eine Grundlage für die wissenschaftliche Beschäftigung mit Sepsis und vergleichbare Kriterien für den Einschluss von Patienten in klinischen Studien zu schaffen und eine frühzeitige klinische Identifizierung und damit Therapie septischer Krankheitsbilder zu ermöglichen, wurden 1991 durch Vertreter des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine im Rahmen einer Konsensuskonferenz (Northbrook, Illinois/USA, August 1991) neue Definitionen geschaffen, die seitdem allgemeine Anwendung fanden.^[11] Diese wurden 2001 im Rahmen der International Sepsis Definitions Conference in Washington D.C./USA überarbeitet und im Rahmen einer Konsensuskonferenz 2015 erneut reevaluiert und aktualisiert. Die zum Zeitpunkt der Durchführung der Studie Anwendung findenden Definitionen (Sepsis Definitions Conference,

Einleitung

Washington/D.C., 2001), sowie die aktualisierten Fassungen der Dritten Konsensuskonferenz (The Third International Consensus – Definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3)) 2016^[12] sind im Folgenden wiedergegeben.

Infektion

Ein durch Mikroorganismen hervorgerufener pathophysiologischer Prozess oder die Invasion von üblicherweise sterilem Gewebe oder Körperflüssigkeiten durch fakultativ oder obligat pathogene Keime wird als Infektion bezeichnet.^[11,13]

Systemic inflammatory response syndrome

Das „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) wurde 1991 definiert als systemische entzündliche Reaktion auf unterschiedliche Auslösefaktoren, die durch wenigstens zwei der folgenden klinischen Parameter gekennzeichnet ist:

- (1) Körpertemperatur > 38°C oder < 36°C,
- (2) Herzfrequenz > 90/min,
- (3) Atemfrequenz > 20/min oder PaCO₂ < 32 mmHg,
- (4) Leukozyten > 12.000/μl oder < 4.000/μl oder > 10% Linksverschiebung.

Diese Definition umfasst somit auch nichtinfektiöse Stimuli, die die oben erwähnten Abwehrmechanismen auslösen können. Ein dem der bakteriellen Sepsis sehr ähnliches klinisches Bild kann beispielsweise bei Patienten mit Verbrennungen und anderen schweren Traumata sowie im Rahmen einer Pankreatitis oder bei Transplantatabstoßungen beobachtet werden.^[11,13]

Sepsis

Der Begriff der Sepsis umschreibt die systemische entzündliche Reaktion auf eine Infektion.

Neben dem Vorliegen der bereits beim SIRS aufgeführten klinischen Kriterien fordert die Definition obligat den Nachweis einer Infektion.

Auch die 2001 abgehaltene internationale Sepsiskonferenz (Washington D.C., Dezember 2001), die die damals bereits zehn Jahre alten Begrifflichkeiten erneut prüfen und gegebenenfalls modifizieren sollte, hat diese Definition bestätigt. Allerdings wurden die diagnostischen Kriterien um

Einleitung

verschiedene klinische und laborchemische Parameter erweitert. Gefordert wurden nun neben dem Nachweis einer Infektion oder dem starken Verdacht auf deren Vorhandensein und dem Vorliegen von einigen der oben aufgeführten allgemeinen Charakteristika einige neu eingeführten Größen. Diese umfassen inflammatorische (z.B. Procalcitonin oder CRP) und hämodynamische Werte (z.B. arterielle Hypotension mit systolischem Druck < 90 mmHg oder mittlerer arterieller Druck < 70 mmHg) und Parameter der Organdysfunktion (z.B. akute Oligurie mit $< 0,5 \text{ ml}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) sowie der Gewebepfusion (z.B. Laktat $> 1 \text{ mmol/l}$).^[11,13,14]

Die 3. Konsensuskonferenz 2016 definiert Sepsis als lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine Dysregulation der Antwort auf eine Infektion hervorgerufen ist und unterstreicht damit die Schwere dieses immer noch häufig letalen Krankheitsbildes. Dies macht nach Ansicht der Experten den Begriff der schweren Sepsis überflüssig. Die Experten empfehlen zur Diagnose einer Sepsis, die vorher das Vorliegen von mindestens 2 SIRS Kriterien forderte, den weithin gebräuchlichen „sequential organ failure assessment“ (SOFA)- Score heranzuziehen.

Die Kriterien für das Vorliegen einer Sepsis sind in der Fassung von 2016 als: Verdacht auf/ oder Nachweis einer Infektion sowie akuter Anstieg des SOFA scores um mindestens 2 Punkte festgelegt. Um auch in Settings, in denen beispielsweise Laborparameter schwer zugänglich sind, die Identifizierung von Patienten mit einer schlechten Prognose zu erleichtern, wurde von den Experten die Anwendung eines quickSOFA(qSOFA) vorgeschlagen. Dieser stützt sich lediglich auf die drei Parameter Atemfrequenz ($\geq 22/\text{min}$), Bewusstseinsstörung (Glasgow Coma Score < 15) und systolischer Blutdruck (≤ 100 mmHg) und soll nach Hoffnung der Expertenkommission eine raschere Diagnose der Sepsis und somit auch die Möglichkeit der frühzeitigen Behandlung ermöglichen.

Schwere Sepsis

Eine schwere Sepsis besteht, wenn zusätzlich zur Sepsis Zeichen einer Organdysfunktion, einer gestörten Organperfusion oder einer Sepsis-bedingten Hypotonie vorliegen. Dies kann sich beispielsweise in Form von metabolischer Azidose, Oligurie oder in einer akuten Verschlechterung zerebraler Funktionen äußern. Eine Sepsis-bedingte Hypotonie liegt vor, wenn der systolische Blutdruck weniger als 90 mmHg beträgt oder ein Abfall von mehr als 40 mmHg vom Ausgangswert erfolgt und sich dies nicht durch andere mögliche Ursachen für eine Hypotonie erklären lässt. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Studie fand diese Definition noch Anwendung und findet sich

Einleitung

daher auch im Titel der vorliegenden Arbeit. Nach Meinung der aktuellen Konsensuskonferenz von 2016 ist der Begriff obsolet.

Septischer Schock

Der Begriff des septischen Schocks umfasst Fälle schwerer Sepsis mit trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution persistierender Hypotonie. Auch Patienten, die Zeichen gestörter Organfunktion oder –perfusion entwickeln und aufgrund einer Therapie zum Beispiel mit Vasopressoren zu diesem Zeitpunkt keine Hypotonie aufweisen, werden nach dieser Definition mit eingeschlossen. Nach der aktuellen Expertenmeinung (Konsensuskonferenz 2016) umfasst der septische Schock eine Untergruppe der Sepsispatienten, bei der die zellulären und/oder metabolischen Veränderungen so schwerwiegend sind, dass sie zu einem deutlichen Anstieg der Mortalität führen.

Multiple organ dysfunction syndrome

Das „*multiple organ dysfunction syndrome*“ (MODS) wurde 1991 durch die amerikanische Konsensuskonferenz (Northbrook, Illinois/USA, August 1991) definiert als Versagen der Organfunktionen in dem Sinne, dass die Homöostase nur noch durch Interventionen aufrechterhalten werden kann. Es stellt jedoch keinen statischen Zustand dar, sondern vielmehr einen dynamischen, sich stetig ändernden Prozess. Organfunktionsstörungen, die bereits in frühen Stadien einer Sepsis auftreten, können mit Progression der Erkrankung bis zum MODS voranschreiten. Dieser fließende pathophysiologische Prozess erschwert das frühzeitige Erkennen dieses schweren Krankheitsbildes, für das auch im Rahmen der Konsensuskonferenzen keine festen Diagnosekriterien festgelegt wurden.^[10,11,13] Allerdings stellt das Versagen von Organsystemen einen wichtigen prognostischen Faktor für Sepsispatienten dar. Mit jedem zusätzlich eintretenden Organversagen steigt die Letalität um bis zu 15-20%.^[15]

1.2 Die Immunantwort im Rahmen der Sepsis

Die häufigsten primären Infektionsorte bei Sepsispatienten sind der Respirations- und Urogenitaltrakt gefolgt von Wundinfektionen.^[16] Eindringene Bakterien bzw. Erreger werden im

Einleitung

betroffenen Gewebe zunächst anhand von sogenannten PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) auf der Zelloberfläche erkannt. Bei gramnegativen Bakterien spielt hierbei Lipopolysaccharid (LPS) die Hauptrolle, das durch das in Hepatozyten gebildete LPS *binding protein* (LBP) gebunden und danach von Makrophagen erkannt werden kann. Hierbei wirkt membrangebundenes mCD14 (*cluster of differentiation*) als Co-Rezeptor, welches auf der Zelloberfläche hauptsächlich von Makrophagen, aber auch Monozyten, dendritischen Zellen und in geringerer Konzentration auf neutrophilen Granulozyten vorhanden ist. Aufgrund der fehlenden intrazellulären Komponente des Komplexes aus LPS/LBP und CD14 sind für eine Signaltransduktion nach Bindung von LPS weitere Rezeptoren bzw. Oberflächenmoleküle vonnöten. Diese stammen aus der Klasse der *Toll like receptors* (TLRs), wobei TLR4 bei Kontakt mit LPS bedeutsam ist. Über die intrazelluläre Komponente der TLRs erfolgt die weitere Signaltransduktion, die letztendlich in der Aktivierung von Zytokin-Genen und damit der Bildung von Zytokinen mündet. Daneben existieren weitere Wege zur Erkennung von Bakterien: *peptidoglycane-recognition proteins* (PGRPs), *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD1 and NOD2), *triggering receptor expressed on myeloid cells* (TREM-1).^[17,18] Bei grampositiven Erregern fehlt das als Endotoxin wirksame LPS. Stattdessen verfügt die überwiegende Mehrheit der grampositiven Erreger über Exotoxine, die als Superantigen fungieren. Diese sind in der Lage, direkt an *major histocompatibility complex* MHC II-Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen, sowie auch direkt an T-Zellrezeptoren (TCR) zu binden. Dies ruft eine kräftige, oftmals fulminante Entzündungsreaktion mit massiver Stimulation der T-Zell-Antwort hervor.^[19] Anstelle von LPS finden sich in den Zellmembranen von grampositiven Bakterien verschiedene Lipopeptide wie beispielsweise *macrophage activating lipopeptides* (MALPs), die je nach ihrem Acetylierungsgrad, ebenfalls von *toll-like receptors*, in diesem Fall TLR2 in Zusammenspiel mit TLR 1 oder TLR6 erkannt werden.^[20]

Über diese, auch synergistisch wirkenden, Wege kommt es nach Eindringen von Erregern zur Aktivierung von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Insbesondere mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) kommt dabei eine Schlüsselrolle zu. Diese tragen durch die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, v.a. Interleukin-1 (IL-1), IL-6 und Tumor Nekrosefaktor (TNF)- α zum sogenannten Zytokinsturm („*cytokine storm*“) in frühen Phasen der Sepsis bei. Neben diesen vorrangigen Zytokinen sind u.a. auch IL-12, IL-15 und IL-18 von Bedeutung, über die ein komplexes Netzwerk sekundärer Immunantworten geregelt wird. So induzieren IL-12 und IL-18 beispielsweise die Synthese von

Einleitung

Interferon (IFN)- γ , welches neben zahlreichen anderen Effekten unter anderem der Herunterregulierung von TLR4 auf Zellmembranen entgegenwirkt, zur Hochregulierung von MHC II beiträgt, die Mikrobozidie von Phagozyten verbessert, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) aktiviert und somit wesentlich zur Eliminierung des eingedrungenen Erregers beiträgt.^[17,18]

Diese Prozesse setzen sehr rasch nach Antigenkontakt ein, und bereits 30-90 Minuten nach Kontakt mit LPS lässt sich eine Ausschüttung von IL-1 und TNF- α , als Prototypen der proinflammatorischen Zytokine, nachweisen. Sie aktivieren weitere Schritte der inflammatorischen Kaskade, mit Ausschüttung von Zytokinen, Lipidmediatoren und Sauerstoffradikalen, was unter anderem zu einer verbesserten Zelladhäsion intravasal führt und damit die Migration von Abwehrzellen ins Gewebe des Infektionsherdes erleichtert.

Neben immunologischen Effekten wirken pro-inflammatorische Zytokine auch auf das Gerinnungssystem ein, was bei ca 35% der Sepsis-Patienten zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) führt, die ein wesentlicher Faktor für das Entstehen von Organversagen ist, einem entscheidenden Faktor für die hohe Mortalität in späten Phasen der Sepsis.^[21] Hervorgerufen wird die DIC einerseits über eine Hochregulierung von prothrombotischen Faktoren, v.a. von *tissue factor* (TF), der von aktivierten Monozyten/Makrophagen gebildet wird. Darüber hinaus kommt es zu einer Herunterregulierung von antikoagulatorischen Proteinen (Antithrombin, Protein C und *tissue factor pathway inhibitor*), und zur Unterdrückung von Fibrinolyse, was hauptsächlich auf einer Beeinträchtigung der Funktion von Endothelzellen beruht. Hierdurch wird die Entstehung von Mikrothromben in kleinen Gefäßen gefördert. Neben der Entstehung von Mikrothromben einerseits, ist die DIC auf der anderen Seite durch das Auftreten von Blutungen charakterisiert, die v.a. durch den erhöhten Verbrauch von Gerinnungsfaktoren entstehen.^[22]

Die Thrombosierung kleiner Gefäße begünstigt eine Gewebshypoxie und -unterversorgung und trägt damit in weiterer Konsequenz zum Organversagen bei. Das Versagen von Organen wird außerdem durch ein Gewebsödem begünstigt, welches aufgrund kapillärer Leckage durch eine durch Sauerstoffradikale hervorgerufene erhöhte Gefäßinstabilität hervorgerufen wird. Daneben spielen die Ausschüttung von Prostaglandinen und Histamin, Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und direkte Gewebszerstörung durch lysosomale Enzyme und Sauerstoffradikale eine Rolle. Neben dem Auftreten von Sekundärinfektionen wird der Krankheitsverlauf bei vielen Patienten durch das Auftreten eines oder mehrerer Organversagen erschwert, und bei Betroffenen mit vier oder fünf versagenden Organsystemen liegt die Sterblichkeit bei bis zu 90 %.^[15]

Einleitung

Optimalerweise werden eingedrungene Erreger durch die oben beschriebenen Mechanismen durch eine lokale Entzündungsreaktion am Infektionsort bekämpft und eliminiert. Zur Vermeidung einer überschießenden Reaktion stehen dem Körper dafür eine Reihe von gegenregulatorischen Massnahmen zur Verfügung. Neben antiinflammatorischen Zytokinen, der Prototyp hierfür ist IL-10, handelt es sich hierbei z.B. auch um direkt antagonistisch wirkende Moleküle, wie beispielsweise löslichen TNF-Rezeptor, IL-1 Rezeptor Antagonist, aber auch falsche („*decoy*“) Rezeptoren, wie z.B. IL-1 Rezeptor Typ II. Kommt es zu einem Überschießen dieser antiinflammatorischen Prozesse oder dauern diese zu lange an, kann dies zu einer andauernden schwerwiegenden Beeinträchtigung des Immunsystems, der sogenannten „Immunparalyse“ führen. Diese kann für Tage bis Wochen nach Einsetzen der ursprünglichen Infektion anhalten und birgt eine hohe Gefahr für Sekundärinfektionen, die wesentlich zur Sterblichkeit in späten Phasen der Sepsis beitragen. Dabei scheint nicht das Vorhandensein von immunosuppressiven Prozessen an sich, sondern die fehlende Erholung des Immunsystems von Bedeutung zu sein.^[23] Der Anteil der Patienten, die innerhalb der ersten vier Tage an einer Sepsis versterben, liegt bei etwa 25%. Von den Überlebenden entwickeln etwa 60% eine Immunparalyse und die dadurch bedingte Mortalität macht 65% der Sepsis-Todesfälle aus^[24]. Die überwiegende Mehrheit der Sepsispatienten verstirbt also nicht in der initialen Phase, die oftmals durch eine Hyperinflammation gekennzeichnet ist. Vielmehr führt die Immunparalyse zu einer erhöhten Anfälligkeit für Sekundärinfektionen sowie zur Reaktivierung lateraler Infektionen (z.B. Herpes simplex) oder Erkrankung an opportunistischen Infektionen (z.B. durch *Candida albicans*) und bedingt dadurch die Mehrzahl der Sepsis-assoziierten Todesfälle.^[25]

Mögliche Szenarien^[23] für das (Ungleich)gewicht von pro- und anti-inflammatorischen Prozessen im Verlauf der Sepsis sind in **Abbildung 1.1** dargestellt. Der Ausschlag der gegensätzlichen Immunprozesse ist variabel und hängt von einer Vielzahl von Faktoren, wie z.B. der Art des Erregers, Vorerkrankungen, genetischer Prädisposition ab.

Einleitung

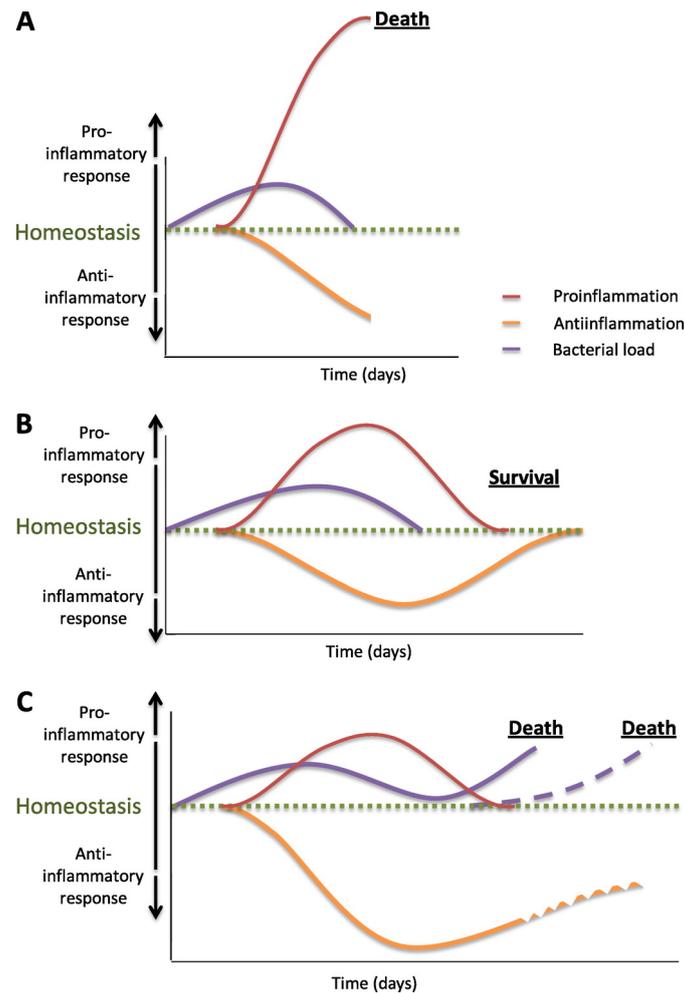


Abb. 1.1: Möglicher Verlauf der Immunantwort in Sepsis-Patienten. A) Eine überschießende proinflammatorische Immunantwort (rot) sorgt für eine Eliminierung des Erregers (violett), führt über Gewebserstörung und Multiorganversagen aber zum Tod des Patienten. **B)** Eine adäquate proinflammatorische Immunantwort (rot) führt zur Eliminierung des Erregers (violett). Eine angemessene Antiinflammation (orange) begrenzt die Immunantwort und Gewebsschädigung, der Patient erholt sich. **C)** Proinflammation (rot) und überschießende/andauernde Antiinflammation (orange), die zur Immunparalyse führt, bedingt die Unfähigkeit zur Eliminierung des Erregers (violett) und/oder Sekundärinfektionen (violett gestrichelt) und führt zum Tod des Patienten. Aus [23]

Für die Untersuchung des Effektes einer immunstimulatorischen Therapie ist es essentiell, die Patienten zu identifizieren, die eine Sepsis-induzierte Immunparalyse aufweisen. Bislang wird hierfür v.a. die monozytäre HLA-DR Expression herangezogen, die auch in dieser Studie zur Identifikation von potentiellen Studienteilnehmern gemessen wurde.

1.3 T-Lymphozyten im Rahmen der Sepsis

T-Lymphozyten spielen eine zentrale Rolle in der Elimination von Erregern. Erregerantigene, die auf *Major histocompatibility complex* (MHC II)-Molekülen auf APCs präsentiert werden, werden durch spezifische T-Zellrezeptoren auf CD4⁺ T-Helferzellen erkannt. Zur Aktivierung der T-Helferzellen kommt es beim Vorliegen weiterer stimulatorischer Signale durch Bindung von CD80/CD86 auf APCs an CD28 auf T-Zellen. Durch die gleichzeitige Ausschüttung von Zytokinen wird eine Differenzierung zu Effektorzellen (z.B. Th1, Th2, Treg) hervorgerufen. Aktivierte T-Helferzellen sezernieren Zytokine, die zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und Makrophagen beitragen und die Reifung von B-Lymphozyten begünstigen. Zytotoxische T-Lymphozyten (CD8⁺) sind nach Aktivierung in der Lage, Zielzellen durch die Ausschüttung von zytolytischen Mediatoren (Perforin, Granzym, Granulysin) oder mittels Expression von FasL abzutöten. Über beide Wege kommt es zur Induktion von Apoptose in der Zielzelle und im Falle einer Infektion zur Eliminierung des (intrazellulären) Erregers.^[26]

Im Verlauf der Sepsis kommt es neben einer durch Apoptose und Abwanderung in das infizierte Gewebe bedingten Lymphozytopenie auch zu einer verminderten Proliferation von T-Zellen und einer Anergie der verbleibenden Lymphozyten, die durch eine gestörte Zytokinproduktion nach Stimulation gekennzeichnet ist. Darüber hinaus wirken CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen im Rahmen gegenregulatorischer Maßnahmen negativ auf die initiale pro-inflammatorische Immunantwort ein und tragen dadurch zur Immunparalyse bei.

1.3.1 T-Zell-Apoptose

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Sepsisdiagnose kommt es zu einer ausgeprägten Lymphozytopenie, die zum einen durch den Übergang von T-Zellen aus dem Blut ins entzündete Gewebe und zum anderen durch programmierten Zelltod von CD4 und CD8 Zellen im Blut bedingt ist.^[18,27,28] Apoptose kann, stark verallgemeinert gesprochen, über einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg eingeleitet werden, deren Signalkaskaden sich an zahlreichen Punkten überschneiden.

Der extrinsische Weg wird durch Bindung von auslösenden Signalen an Oberflächenrezeptoren (z.B. Fas) und im weiteren durch Aktivierung von Kaspase 8 eingeleitet. Der intrinsische Weg, auch mitochondrialer Weg, wird durch eine Störung des Gleichgewichts pro- und antiapoptotischer Genprodukte vorwiegend aus der Familie der B-cell lymphoma (Bcl)-2 Gene oder durch

Einleitung

stressinduzierte Stimuli hervorgerufen, die im weiteren Verlauf zur Aktivierung von Kaspase-9 führen.

Beide Wege münden in einer gemeinsamen Endstrecke mit Aktivierung von Kaspase-3 und in weiterer Konsequenz in der Fragmentierung von Zell-DNA. Zwischen diesen Wegen existieren zahlreiche Überschneidungen und beide sind in die T-Zell Apoptose bei Sepsis involviert. An wie vielen Stellen der Signalkaskaden und wie genau es im Rahmen einer Sepsis zum Eingriff kommt ist nicht vollständig geklärt. Es gibt Forschungsergebnisse, die auf das Vorhandensein mehrerer löslicher Apoptose-induzierender Faktoren hinweisen^[27]. Beispielhaft sei hier das im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchte CD28 erwähnt, das auf T-Lymphozyten von Sepsispatienten vermindert exprimiert wird. CD28 ist ein co-stimulatorisches Molekül, das nach Kontakt mit Antigen-präsentierenden Zellen eine entscheidende Rolle für die Ausschüttung von IL-2 und Bcl-X_L spielt, beides Faktoren, die für das Überleben von T-Zellen wichtig sind. Letztendlich ist es ein Ungleichgewicht von pro- und antiapoptotischen Faktoren, welches den Zelltod herbeiführt.

1.3.2 T-Zell Anergie

Im Rahmen einer Sepsis findet sich üblicherweise ein schrittweiser Abfall der T-Zellfunktion trotz hoher Antigenpräsenz. Die Sekretion von TNF- α , IL-2 und IFN- γ durch erschöpfte T-Zellen ist vermindert und ihre Proliferation bei Antigenkontakt ist herabgesetzt.

Durchflusszytometrisch lässt sich typischerweise eine hohe Expression von u.a. CD69 (früher Aktivierungsmarker) und *Programmed cell death protein 1* (PD-1) nachweisen, einem Rezeptor auf aktivierten Lymphozyten, der bei Ligandenkontakt Zellproliferation und -funktion hemmt. Die Hochregulierung der Rezeptoren erfolgt innerhalb der ersten Tage nach Auftreten der Sepsis (verzögertes Eintreten der Immunsuppression). Im Gegensatz dazu findet sich für CD127 (α -Untereinheit des IL-7 Rezeptors) eine verminderte Expression, ebenfalls charakteristisch für erschöpfte Lymphozyten.^[28]

Neben der Akkumulation inhibitorischer Rezeptoren im Verlauf der Sepsis, kommt es auch zu einer hohen Sekretion inhibitorischer Liganden auf Monozyten/Makrophagen, was wiederum zur Herabsetzung der Funktionsfähigkeit der T-Zellen beiträgt.^[18, 28]

Hohe Konzentrationen von IL-10, einem antiinflammatorischen Zytokin das vor allem von Makrophagen z.B. in der Leber, aber auch von regulatorischen T-Zellen und Th2 Zellen produziert

Einleitung

wird, finden sich relativ früh in der Sepsis. Es unterdrückt die Th1 Antwort und trägt somit seinerseits zur Verstärkung des antiinflammatorischen Status in den späteren Phasen der Sepsis bei. In späteren Phasen der Sepsis lässt sich eine verminderte Sekretion von sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Zytokinen im Blut nachweisen. Auch nach Stimulation mit LPS persistiert diese verminderte Zytokinsekretion, was auf einen Defekt sowohl des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems schließen lässt.^[28, 29]

1.3.3 Regulatorische T-Zellen in der Sepsis

Mehrere Subklassen von T-Lymphozyten sind in der Lage, T-Zell Proliferation und Zytokinsekretion zu hemmen und T-Zell Apoptose induzieren. Diese werden als regulatorische T-Zellen (Treg) bezeichnet.^[30]

Regulatorische T-Zellen entfalten ihre Wirkung zum einen über direkten Zell-Zell-Kontakt mittels Rezeptoren, zum anderen durch Freisetzung von Zytokinen, beispielsweise IL-10, *tumor growth factor* (TGF)- β , IL-4, and IFN- γ . Darüber hinaus sind sie in der Lage, den Tryptophan-Stoffwechsel der Zielzelle zu beeinflussen und Apoptose zu induzieren.

Die genauen pathophysiologischen Mechanismen im Rahmen von Infektionen sind noch nicht abschließend geklärt, wahrscheinlich ist jedoch eine Aktivierung durch LPS über den *toll-like receptor* (TLR). Entscheidend dafür, ob die Aktivität der Tregs nützlich (Aufrechterhalten des immunologischen Äquilibrium) oder schädlich (Immunparalyse) für den Organismus ist, scheint das Verhältnis von Tregs zu Effektorzellen zu sein.^[30]

In Patienten mit septischem Schock konnte ein erhöhter Prozentsatz von zirkulierenden regulatorischen T-Zellen direkt nach Diagnosestellung nachgewiesen werden. Diese Verschiebung des Verhältnisses von Tregs zu Effektorzellen blieb bei Patienten bestehen, die im weiteren Verlauf der Sepsis verstarben^[31]. Die Ursache für eine Verschiebung des Verhältnisses könnte ein vermindertes Ansprechen der regulatorischen Zellen auf Apoptose-auslösende Signale sein. Eine Resistenz von Tregs konnte bereits *in vitro* nachgewiesen werden, ein Nachweis *in vivo* steht derzeit jedoch noch aus. Zusätzlich scheinen die suppressiven Eigenschaften der regulatorischen Zellpopulationen durch die Sepsis verstärkt zu werden.^[32-34]

Innate-like T-Zellen umfassen $\gamma\delta$ T Zellen und NKT Zellen, die nicht durch die klassischen MHC-I und MHC-II Moleküle, sondern durch ein eigenes nicht-klassisches MHC Molekül oder unspezifisch im Rahmen von inflammatorischen Prozessen aktiviert werden können^[30]. Sie finden

Einleitung

sich typischerweise in Geweben und weniger in lymphoiden Organen oder dem Blut. Aufgrund des schnellen Aktivierung ihres TCR werden sie als Teil der raschen Immunantwort aktiv, und üben sowohl regulatorische als auch Effektorfunktionen aus.

$\gamma\delta$ T Zellen kommen v.a. in epithelhaltigen Organen wie der Haut, Lungen und dem Intestinaltrakt vor und sind damit strategisch günstig zur Erregererkennung und Abwehr platziert. Sie erkennen Erregerantigene über nicht-klassische MHC-Moleküle, sind aber auch zur Erkennung von z.B. PAMPs oder Superantigenen fähig und werden daher zur Linie der unspezifischen („*innate*“) Immunantwort gerechnet. Sowohl über die Ausschüttung von Zytokinen (IFN- γ und TNF- α), als auch über zytotoxische Effektormechanismen sind sie in der Lage, eingedrungene Erreger abzuwehren. Darüber hinaus besitzen sie aber auch regulatorische Fähigkeiten, indem sie z.B. die Aktivität von Makrophagen über das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 hemmen und auch ein Effekt auf die TNF- α Produktion von Monozyten nach LPS Stimulation *in vitro* konnte nachgewiesen werden. Ihre genaue Rolle ist nach wie vor unklar, aber eine gewebsabhängige und möglicherweise auch eine unterschiedliche Rolle in Abhängigkeit von der Phase der Infektion scheint wahrscheinlich.^[30]

Natural killer T-Zellen (NKT) interagieren nach Antigenpräsentation auf nicht-klassischen MHC-Molekülen, wie $\gamma\delta$ T Zellen, und sind damit in der Lage, Antigene zu erkennen, die klassischen Effektor-T Zellen entgehen. Auch ohne Antigenpräsentation können NKT Zellen durch IL-12 oder IL18 aktiviert werden. Sie sind damit in der Lage, rasch auf eindringende Erreger zu reagieren. Nach Aktivierung differenzieren sie zu IL-4 produzierenden (fördert die T_H2 -Antwort) oder IFN- γ produzierenden Zellen abhängig vom Antigen und den einwirkenden Zytokinen. Dies hat einen Einfluss auf das T_H1 zu T_H2 Verhältnis in der akuten Phase der Infektion. Über diesen Weg und auch über eine direkte zytotoxische Wirkung, sowie über die Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine im Rahmen einer Infektion sind NKT Zellen in der Lage, regulatorisch in das Immunsystem einzugreifen. Auch hier sind genaue Mechanismen und die Rolle im Rahmen einer Sepsis noch nicht abschließend erforscht.^[30]

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Immunsystem in Rahmen einer Sepsis schwerwiegende Änderungen durchläuft, die durch den Verlust von zirkulierenden Immunzellen, sowohl des angeborenen, als auch des erworbenen Immunsystems und eine gestörte Sekretion von IFN- γ charakterisiert sind. In den ersten Tagen nach Einsetzen der Sepsis kommt es zu einer Hochregulierung von inhibitorischen Rezeptoren und ihrer Liganden auf der Oberfläche von

Einleitung

Lymphozyten (und DCs), zur verringerten Expression von IL7-Rezeptor und einer Zunahme von regulatorischen T-Zellen. Dieser Zustand der Erschöpfung von immunologischen Funktionen, die Immunparalyse, spielt eine wichtige Rolle beim Auftreten nosokomialer Infektionen und begünstigt ein schlechtes Outcome für die betroffenen Patienten.

1.4 Reifung von T-Lymphozyten im Thymus

Nach ihrer Bildung im Knochenmark reifen T-Zellen im Thymus über Differenzierung, sowie positive und negative Selektion zu immunkompetenten naiven T-Lymphozyten heran. Diese Prozesse sollen sicherstellen, dass T-Zellen in der Lage sind, Pathogene zu bekämpfen ohne gegen Zellen des eigenen Körpers vorzugehen, also Autoimmunität vorbeugen.

Während des Reifungsprozesses durchwandern die Thymozyten das Organ von der Rinde in Richtung Stroma. Diese Prozesse finden früh in der embryonalen Entwicklung statt und setzen sich in etwa bis zur Pubertät fort. In späteren Phasen des Lebens kommt es zu einer Schrumpfung des Thymus und in Erwachsenen führt eine Entfernung des Thymus nicht mehr zu einer merkbaren Beeinträchtigung der T-Zell Funktion.^[35]

Nach dem Eindringen der frühen Vorläuferzellen in den Thymus exprimieren diese zunächst lediglich CD2, sind also auch für das T-Lymphozyten kennzeichnende CD3 negativ und doppelt negativ für CD4 und CD8. Diese doppelt negativen Zellen (DN) werden je nach ihrer Expression von CD44 und CD25 weiter unterteilt. DN1 Zellen (CD44+CD25-) sind noch in der Lage, sich zu $\alpha\beta$ T-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen, NK-Zellen, dendritischen Zellen Makrophagen und B-Lymphozyten zu entwickeln, wobei die Expression von CD117 der stärkste Marker für die Entwicklung entlang der T-Zelllinie ist. Ca. 20% der DN-Zellen entwickeln sich zu $\gamma\delta$ T-Zellen, 60% zu reifen $\alpha\beta$ T-Zellen. Die sich zu $\alpha\beta$ T-Lymphozyten entwickelnden Zellen (DN2; CD44+, CD25+) durchlaufen nun eine Phase, in der ihre TCR-Gene angeschaltet werden und zu einer Neuordnung insbesondere der β -Kette des Rezeptors führen. Diese wird auf der Zellmembran exprimiert, zusammen mit CD3 und einer vorläufigen α -Kette, was neben einer Blockade von Apoptose zur Proliferation dieser Zelle und weiteren Differenzierung entlang der $\alpha\beta$ -Linie führt. Darüber hinaus führt die Festlegung auf eine β -Kette zur Herunterregulierung von CD25, was den Übergang zur DN4-Population (CD44-CD25-) markiert. In diesen findet eine Hochregulierung von CD4 und CD8 statt, die entstandenen Zellen sind somit zunächst CD4+CD8+ doppelt-positiv (DP).

Einleitung

DP $\alpha\beta$ TCR tragende Zellen durchlaufen nun eine Reihe von positiven und negativen Selektionsschritten bevor sie den Thymus verlassen können. Positive Selektion erfolgt durch schwache Bindung an Komplexe von MHC I oder MHC II Moleküle und körpereigenen Peptiden auf Thymus Epithelzellen. Findet keine solche Bindung innerhalb einer gewissen Zeit (ca 3-4 Tage) statt, stirbt die Zelle durch Apoptose ab. Während dieses positiven Selektionsschrittes erfolgt auch die Festlegung auf entweder einen CD4⁺ T Helferzelltyp (bei Erkennung von MHC II) oder einen CD8⁺ Killerzelltyp (bei Erkennung von MHC I).^[35-37]

Nach diesem Schritt wandern die „halbreifen“ Zellen von der Thymusrinde in das Mark. Hier findet die negative Selektion von autoreaktiven T-Zellen statt. Zellen, die hochaffin an Eigenpeptid/MHC-Komplexe binden werden durch Apoptose entfernt. Nach einer abschließenden Reifung im Thymusmark für ca 4-5 Tage verlassen die T-Lymphozyten den Thymus über Blutgefäße, um in der Peripherie zu zirkulieren.^[36] In diesem Stadium werden sie als *recent thymic emigrants* (RTEs) bezeichnet. Die RTEs durchlaufen einen ca 3 Wochen dauernden Reifungsprozess in den peripheren Lymphknoten, während dessen die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle reguliert wird. So wird beispielsweise die Expression von CD31 (auf CD4 RTEs) herunterreguliert, anhand dessen diese Zellpopulation in der vorliegenden Studie identifiziert wurden.^[38] RTEs unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Respons auf Antigenkontakt von reifen naiven T-Lymphozyten, die per definition ebenfalls noch keinen Kontakt zu Pathogenen im peripheren Blut/Organen gehabt haben. Insbesondere die Fähigkeit zur IL-2 Produktion nach Aktivierung ist in RTEs gegenüber reifen naiven T-Zellen herabgesetzt.^[39]

Die ebenfalls im Thymus gebildeten $\gamma\delta$ T-Zellen durchlaufen viele der oben aufgeführten Stadien der Reifung nicht, ihr Phänotyp wird zum größten Teil durch die Stärke des von ihnen exprimierten $\gamma\delta$ TCR bestimmt, der damit ein viel breiteres Spektrum an Antigenen binden kann.^[37]

1.5 Problemstellung

Die Therapie der Sepsis gründet sich auf drei Prinzipien (kausale Therapie, supportive Maßnahmen, adjuvante Behandlung), wobei die kausalen und supportiven Therapiemaßnahmen im Vordergrund stehen. Zu erstgenannten gehören beispielsweise Antibiotikatherapie, aber auch invasive Verfahren wie die chirurgische Herdsanierung bei vorwiegend lokalen Infektionen. Die supportiven Therapieverfahren umfassen neben Organersatzverfahren wie maschineller Beatmung und

Einleitung

Nierenersatzverfahren, auch Maßnahmen zur hämodynamischen Stabilisierung (z.B. mit Katecholaminen) und die enterale oder parenterale Ernährung des Patienten.

Der Versuch, den wissenschaftlichen Fortschritt auf dem Gebiet der Sepsisforschung therapeutisch zu nutzen, spiegelt sich in einer Vielzahl klinischer Studien zu immunmodulierenden adjuvanten Therapien wieder. Nach Wissen der Autorin konnte bisher für keine dieser Therapien eine signifikante Reduktion der Sepsis-Mortalität nachgewiesen werden. In Anbetracht der weltweit hohen Fallzahlen und weiterhin beträchtlichen Sterblichkeit scheint der Bedarf nach einer wirkungsvollen immunologischen Therapie jedoch nach wie vor sehr hoch. Basierend auf der Annahme, dass die hohe Sepsismortalität vor allem auf eine unkontrollierte, überschüssige pro-inflammatorische Immunantwort zurückzuführen sei, wurden ab den 1970er Jahren zunächst zahlreiche Studien zum Einsatz anti-inflammatorischer Therapeutika (u.a. TLR-Rezeptor Antagonist, Anti-TNF- α , hochdosierte Corticosteroide) durchgeführt. Ein Nutzen im Sinne einer signifikanten Reduktion der Mortalität konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Mit zunehmender Einsicht, dass die Mehrzahl der Patienten nicht in einer Phase der Hyperinflammation, sondern vielmehr an den Folgen einer andauernden Unterfunktion des Immunsystems, der Sepsis- induzierten Immunparalyse verstorbt, wurden gegen Ende der 1990er Jahre erste Versuche mit pro-inflammatorischem Ansatz bei Patienten mit Sepsis und Immunparalyse unternommen. Der Auswahl dieser Patienten, also der zuverlässigen Identifizierung der Sepsispatienten, die sich in einem Zustand der schwerwiegenden Beeinträchtigung des Immunsystems befinden, sollte dabei Rechnung getragen werden. Allerdings lassen viele der bisher durchgeführten Studien ein konsequentes Monitoring der Immunfunktion für die Studiendauer vermissen.

1.5.1 Immunstimulatorische Therapien in der Behandlung von Sepsispatienten

In den letzten Jahr(zehnt)en hat sich der Fokus also vor allem auf immunstimulatorische adjuvante Behandlungsmethoden verlagert. In einer ersten Pilotstudie^[40] an Sepsispatienten mit Immundepression (charakterisiert durch <30% HLA-DR positive Monozyten für mindestens 48 Stunden) konnte gezeigt werden, dass eine immunstimulatorische Therapie mit IFN- γ zu einem unmittelbaren Anstieg der monozytären HLA-DR Expression führt. Diese war assoziiert mit einer Verbesserung klinischer Parameter. Acht der neun eingeschlossenen Patienten erholten sich kurze Zeit nach der Therapie mit IFN- γ von ihrer Sepsis. Der gleiche Ansatz ist auch in jüngerer Zeit bei

Einleitung

Patienten mit schweren invasiven Pilzinfektionen erneut zum Einsatz gekommen. Dabei konnte wiederum eine teilweise Wiederherstellung der Immunfunktion nach Gabe von Interferon- γ nachgewiesen werden.^[41] Insbesondere kam es zum Anstieg der HLA-DR Expression in Patienten mit stark herabgesetzter Ausgangskonzentration auf unter 50% des Normwertes. Darüber hinaus konnte eine erhöhte Produktion von IL-17 und IL-22, proinflammatorische Zytokine, die insbesondere in der Bekämpfung fungaler Infektionen eine Rolle spielen, gezeigt werden.

In einer 2015 veröffentlichten Studie wurden IL-7 und *anti-programmed death-ligand 1* (Anti-PD-1) im Mausmodell getestet,^[42, 43] die beide bereits in Patienten mit schweren viralen Infekten und Krebs erfolgreich zu einer Stimulation des Immunsystems eingesetzt worden waren. Die Autoren konnten dabei unterschiedliche Mechanismen der beiden eingesetzten Immunstimulantien in verschiedenen Geweben (Lymphknoten, Milz, peripheres Blut) nachweisen, was beispielsweise für die Wahl des Therapeutikums in Abhängigkeit vom Infektionsherd von Bedeutung sein könnte. Bei Untersuchung einer Kombinationsbehandlung mit IL-7 und Anti-PD-1 zeigten sich additive Effekte auf die CD28 Expression, Lymphozytenproliferation und IFN- γ Sekretion in der Milz. Die Kombinationsbehandlung zeigte sich überlegen im Vergleich zur Monotherapie im Hinblick auf oben genannte Faktoren. Die Autoren postulieren, dass in Zukunft eben solche Kombinationstherapien in der Behandlung von Sepsispatienten Einsatz finden und sehen dabei eine zentrale Rolle in der Kombination von beispielsweise den untersuchten IL-7 und Anti-PD-1, bei deren Einsatz in Krebspatienten und bei Viruserkrankungen bereits eine Reduktion von Mortalitätsrate und ein verbessertes Outcome gezeigt werden konnte. Eine klinische Studie zum Einsatz einer immunstimulatorischen Therapie mit IL-7, (Anti-PD-L1) und OX-40L (CD134) konnte für die Patientengruppe mit durch multiresistente Erreger bedingte Sepsis ein Anstieg der IFN- γ Produktion durch T-Zellen gezeigt werden.^[44]

1.5.2 Immunstimulatorische Therapie mit GM-CSF

Ein signifikanter und persistierender Anstieg der monozytären HLA-DR Konzentration fand sich auch in einer Studie an Patienten mit schwerer Sepsis und Immunparalyse,^[45] die mit rekombinantem humanen GM-CSF (rhGM-CSF) in einer Dosis von 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht für drei Tage behandelt wurden. In einer 2001 veröffentlichten Studie an sechzig Neugeborenen mit Sepsis und Neutropenie,^[46] die mit rhGM-CSF behandelt wurden, konnte darüber hinaus eine signifikante

Einleitung

Reduzierung der Mortalitätsrate von 10% in der mit GM-CSF behandelten Patientengruppe im Vergleich zu 30% in der Kontrollgruppe gezeigt werden.

GM-CSF ist ein Wachstumsfaktor aus der Gruppe der Kolonie-stimulierenden Faktoren, die die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen anregen, also myeloproliferativ wirken. Es wird als körpereigenes Zytokin physiologischerweise durch eine Vielzahl von Zellen produziert, darunter auch von T_H-Zellen, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen, in geringem Umfang auch von Monozyten/Makrophagen. Das glykosylierte Polypeptid entfaltet seine Wirkung durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf den Zielzellen. Zu diesen gehören neben granulozytären und monozytären Vorläuferzellen unter anderem auch reife neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten. Es stimuliert dadurch nicht nur die Bildung neuer Immunzellen, sondern fördert auch die Abwehrfunktionen bereits ausgereifter Zellen. Es unterstützt die Proliferation, Reifung und Einwanderung von dendritischen Zellen, die durch ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation eine bedeutende Aufgabe in der Induktion einer spezifischen T-Zellantwort spielen. Diese wird beispielsweise durch die gesteigerte Expression von MHC Klasse II-Molekülen ermöglicht, die durch GM-CSF angeregt wird. So kann das Antigen von CD4⁺ T-Zellen erkannt werden, die ihrerseits die Aktivierung der B-Lymphozyten und CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen unterstützen. Diese wird weiterhin durch eine gesteigerte Bildung co-stimulatorischer Moleküle gefördert, die für die Interaktion von APC und T-Zellen nötig sind. Des Weiteren regt GM-CSF auch die Produktion von Zytokinen wie IL-12 durch phagozytierende Zellen an, das eine zentrale Rolle in der Aktivierung der T_H1-vermittelten Immunantwort spielt.^[47,48]

In Deutschland werden insbesondere G-CSF, aber auch GM-CSF bereits eingesetzt, um das Infektionsrisiko im Rahmen der Neutropenie bei Patienten mit myelosuppressiver Chemotherapie zu reduzieren. Die Applikation in dieser Patientengruppe konnte zeigen, dass die Nebenwirkungen der immunstimulatorischen Therapie mit Kolonie-stimulierenden Faktoren im Allgemeinen gering sind. Zu den beobachteten Nebenwirkungen gehören grippeähnliche Symptome mit Fieber, Müdigkeit, Gliederschmerzen und Übelkeit. Darüber hinaus sind Schwitzen, Schwindel, Juckreiz, Parästhesien, Stomatitis, Dyspnoe und unspezifische Schmerzen des Thorax, sowie periphere Ödeme beschrieben worden. In seltenen Fällen kam es unter der Anwendung zu Anaphylaxie, Quincke-Ödemen, Bronchospasmus, Herzinsuffizienz, Stevens-Johnson-Syndrom, intrakraniellen Durchblutungsstörungen mit Verwirrtheit, Konvulsionen und Anstieg des intrakraniellen Drucks. Auch ein *Capillary leak-Syndrom*, Pleura- und Perikardergüsse, Lungenödem, Perikarditis und Synkopen traten in seltenen Fällen auf.^[49]

Einleitung

Die vorliegende Arbeit behandelt den Effekt einer immunstimulatorischen Therapie mit rekombinantem humanen Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (rhGM-CSF) als adjuvante Therapie bei schwerer Sepsis und septischem Schock im Rahmen einer randomisierten, Placebo-kontrollierten, doppelblinden Studie mit insgesamt 38 Patienten. Teildaten der Studie, insbesondere zu Frequenz und Funktion von Zellen des angeborenen Immunsystems, sowie klinischen Parameteren wie intensivmedizinischen Scores, Beatmungsdauer und Verweildauer auf Intensivstation sind Bestandteil anderer Dissertationen und werden hier daher nicht näher beleuchtet. Einige dieser Resultate sind darüber hinaus bereits publiziert, siehe Meisel C, Schefold JC, Pschowski Rbaumann T, **Hetzger K**, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD: 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 Oct 1;180(7):640-8.

In der vorliegenden Arbeit sind die Ergebnisse einer Substudie wiedergegeben, die den Effekt auf T-Lymphozyten untersucht:

1.5.3 Arbeitshypothesen

In der vorliegenden Arbeit sollen folgende Hypothesen untersucht werden, die auch Teil der Studienhypothese waren:

Primärhypothese

- Die Therapie mit GM-CSF führt zu einer dauerhaften Normalisierung der monozytären Immunkompetenz. Diese wird mittels Messung der monozytären HLA-DR Expression erfasst.

Sekundärhypothesen

- Es kommt zu einer Erholung des erworbenen Immunsystems, gemessen an der Frequenz verschiedener Lymphozytenpopulationen sowie deren Fähigkeit zur Zytokinproduktion nach Stimulation.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Studienmedikation

Name		Konzentration	Hersteller
GM-CSF	Leukine Liquid Sargramostim	500 mg/ml 2,8·10 ⁶ IU/ml	Berlex, Richmond/USA
NaCl- Lösung		9 mg/ml	Charité Apotheke, Berlin

Blutentnahme

Name	Zusatz	Inhalt	Hersteller
S-Monovette	Lithium Heparin	9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
	Kalium-EDTA	2,7 ml	Sarstedt, Nümbrecht
	Citrat	5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Multi-Adapter für S-Monovette			Sarstedt, Nümbrecht
PAXgene Blood RNA Tube	Stabilisierungs- lösung	6,9 ml Lösung 2,5 ml Blut	PreAnalytix Hombrechtikon/ Schweiz
Vacutainer Direct Draw Adapter			Becton Dickinson, Heidelberg

Vollblut-Stimulation

Name		Stock	Endkonz.	Hersteller
Tetanus	Impfstoff Merieux	80IE/ml		Aventis Pasteur, Leimen
Influenza	Spaltimpfstoff Begrivac			Chiron-Behring, Marburg
PPD	Säugertuberkulin			Impfstoffwerk Dessau
CMV-AG	Cytomegalievirus AxSYM System			Abbott, Wiesbaden
Candida albicans	Alyostal Pricktest	100RI		Stallergenes, Rheinberg
PMA	Phorbol 12-myristat 13- acetat gelöst in DMSO	1 mg/ml	10 ng/ml	Sigma-Aldrich, München
Ionomycin	Ca-Salz von Streptomyces conglobatus gelöst in Ethanol	1 mg/ml	2 µg/ml	Sigma-Aldrich, München

Material und Methoden

Con A	Concanavalin A Aus Canavalia ensiformis	1 mg/ml	100 µg/ml Sigma-Aldrich, München
-------	--	---------	----------------------------------

Medium	Hersteller
RPMI 1640	Kulturmedium mit 2,0 g/l NaHCO ₃ ohne Glutamin very low endotoxine

Durchflusszytometrie

Name	Hersteller
Anti-Mouse Ig,κ	Compensation beads Becton Dickinson, Heidelberg
Negative control (FBS)	Compensation beads Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Lyse	FACS lysing solution BD, Heidelberg
FACS-Puffer	Falk-Lösung 1 g Na-Acid 20 ml FCS, endotoxinfrei Biochrom AG, Berlin
Aqua dest.	Ampuwa für Spülzwecke Fresenius Kabi Bad Homburg v.d.H
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Clean	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton Dickinson, Heidelberg

Antikörper

Antikörper	Farbstoff/Emissionsmax.	Vol./Färbung	Hersteller
CD 25	PE / 575 nm	10µl	Becton Dickinson, Heidelberg
CD 62L	ECD / 610 nm	4 µl	Beckman Coulter, Krefeld
CD 45RA	APC / 660 nm	4 µl	Caltag, Hamburg
CD 31	FITC / 520 nm	15 µl	Immunotech, Hamburg
CD 27	APC_Cy7 / 765 nm	7 µl	Caltag, Hamburg
CD 3	Pac. Blue / 455 nm	8 µl	Becton Dickinson, Heidelberg
CD 4	PerCP / 670 nm	12 µl	Becton Dickinson, Heidelberg
CD 38	PE_Cy7 / 750-810 nm	5 µl	Becton Dickinson, Heidelberg
CD 11a	FITC / 520 nm	100 µl*	Dako, Waldbronn
CD 28	PE / 575 nm	100 µl*	Dako, Waldbronn
CD 57	FITC / 520 nm	300 µl*	Immunotech, Hamburg
HLA-DR	PerCP / 670 nm	10µl	Becton Dickinson, Heidelberg

*Messung erfolgte durch das Labor des Instituts für medizinische Immunologie, Berlin

Material und Methoden

Test-/ Reaktions-Kits

Name	Hersteller	Nachweisgrenze
ex vivo LPS-Stimulation Kit	Milenia, Bad Nauheim	
QuantiBRITE PE-Beads	Becton Dickinson, Heidelberg	
QualiBRITE –Beads	Becton Dickinson, Heidelberg	
IMMULITE IL-6/ IL-10/ TNF- α /	DPC Biermann, Bad Nauheim	
Quantikine Human GM-CSF ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden	
Cytometric Bead Array Human Soluble Protein Master Buffer Kit	Becton Dickinson, Heidelberg	
Human IL-2 Flex Set	Becton Dickinson, Heidelberg	11,2 pg/ml
Human IL-5 Flex Set	Becton Dickinson, Heidelberg	1,1 pg/ml
Human IP-10 Flex Set	Becton Dickinson, Heidelberg	0,5 pg/ml
Human IFN- γ Flex Set	Becton Dickinson, Heidelberg	1,8 pg/ml
Human RANTES Flex Set	Becton Dickinson, Heidelberg	0,002 pg/ml

Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Bechergläser 50, 250 ml	Simax, Czech Republic
Messzylinder Duran 100 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Falcon Röhrchen 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten 5, 10, 25 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Reagiergefäße 0,5 ;1,5 ;2 ml Safe seal	Eppendorf, Hamburg
Multi-Reaktionsgefäße 0,65 ml DNAse-/RNAse frei	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 10; 200; 1000 μ l	Sarstedt, Nümbrecht
LPS-freie Pipettenspitzen 200 μ l	Eppendorf, Hamburg

Material und Methoden

Geräte

Name		Hersteller
Pipetten	Pipette 10, 50, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Pipetus Standard	Hirschmann, Heilbronn
Zentrifugen	Kühlzentrifuge CR 422	Jouan, Saint-Herblain/Frankreich
	Tischzentrifuge Hermle Z160M	Neolab, Heidelberg
Sterilbank	Hera Safe, Heraeus	Kendro Laboratory Products, München
Brutschrank	CO ₂ -Inkubator Heraeus 37,0 °C 5,0 % CO ₂	Kendro Laboratory Products, München
Tiefkühler	Hera Freeze Heraeus - 80 °C	Kendro Laboratory Products, München
Durchfluss- zytometer	LSR II	Becton Dickinson, Heidelberg
	FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
IMMULITE-Mess- System		DPC Biermann, Bad Nauheim
CBA/ ELISA Mess- System	FACS-Array Bioanalyzer	Becton Dickinson, Heidelberg
Rüttler	Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia/USA

Software

Name	Hersteller
CellQuest	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Diva	Becton Dickinson, Heidelberg
SPSS 16.0	SPSS Inc., Chicago/USA
MS Office 2003	Microsoft, Redmont, USA
FCAP Array Software	Becton Dickinson, Heidelberg
FlowJo 8.6.3	Treestar, Ashland/USA
Patientendatenmanagementsystem COPRA	COPRA System GmbH, Sasbachwalden
Origin SR7	OriginLab Corporation, Northampton/USA

2.2 Methoden

2.2.1 Studiendesign

Es handelt sich um eine prospektive, randomisierte, doppelblinde Placebo-kontrollierte Studie. Diese wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt. Von November 2005 bis Januar 2007 wurden insgesamt 38 Patienten in die Studie eingeschlossen. Bei den teilnehmenden Stationen handelt es sich um Intensivstationen der Standorte Campus Virchow-Klinikum und Campus Charité Mitte der Charité Universitätsmedizin Berlin. Einschlusskriterien waren ein Patientenalter von mindestens 18 Jahren, Diagnose schwere Sepsis und/ oder septischer Schock, Immunparalyse mit einer monozytären HLA-DR-Expression von < 8000 Molekülen/ Zelle an mindestens zwei aufeinander folgenden Tagen und das Vorliegen des schriftlichen Einverständnisses. In Fällen, in denen der Patient selbst nicht zur Äußerung seines Willens fähig war, konnte die Abgabe des Einverständnisses durch einen vom zuständigen Amtsgericht bestellten Vertreter erfolgen. Der Ausschluss erfolgte bei Vorliegen eines der folgenden Kriterien: bekannte Überempfindlichkeit gegen GM-CSF oder Hilfsstoffe des Verumpräparates, Schwangerschaft oder Stillzeit, moribunde Patienten mit einer Lebenserwartung < 24 h, Dauertherapie mit systemischen Glucocorticoiden für > 6 Monate, hämatologische Systemerkrankung, HIV Infektion, akuter Herzinfarkt oder akute Lungenarterienembolie, akute Pankreatitis, kardiopulmonale Reanimation in den letzten 72 h oder Patienten, bei denen eine Reanimation oder erweiterte lebenserhaltende Maßnahmen nicht indiziert sind, Teilnahme an einer anderen experimentellen Studie mit Medikamenten oder Intensivaufenthalt für mehr als zwei Monate vor Beginn der Studie.

Die Entnahme von 2,7 ml EDTA-Blut für die Durchführung der Screening-Untersuchung auf HLA-DR (Moleküle/Zelle) zu den Visiten (V) 0 und -1 , d.h. an den beiden Tagen vor Beginn der Applikation der Studienmedikation erfolgte nach Abgabe des mündlichen Einverständnisses der Patienten.

2.2.2 Applikation der Studienmedikation und Blutentnahme

Die Studienmedikation (Verum und Placebo) wurden von der Apotheke des Charité Campus Virchow-Klinikum bereitgestellt, die auch die Randomisierung der Patienten und die Verblindung vornahm. Die Gabe des Verumpräparates erfolgte in einer Dosierung von $4\mu\text{g}/\text{kg KG}$ täglich an den

Material und Methoden

Visiten V1-V5. Die Studienmedikation wurde durch geschultes medizinisches Personal der beteiligten Intensivstationen jeweils nach erfolgter Blutentnahme subkutan verabreicht. An V6 erfolgte eine Anpassung der Dosierung. Zeigten die Patienten an V5 einen Anstieg der monozytären HLA-DR-Expression auf über 15.000 Moleküle/Zelle, so wurde weiterhin eine Dosis von 4µg/kg KG verabreicht, wurde dieser Grenzwert nicht erreicht, so erfolgte eine Dosisescalation auf 8µg/kg KG von V6 bis einschließlich V8. An V9 erfolgte morgens eine abschließende Blutentnahme. Die entnommenen Blutproben wurden anschließend bei +4°C aufbewahrt und zum Transport ins Labor auf Eis gelagert. In **Abbildung 2.1** ist der zeitliche Ablauf der Studie in Bezug auf durchgeführte Messungen und Medikamentenapplikation dargestellt.

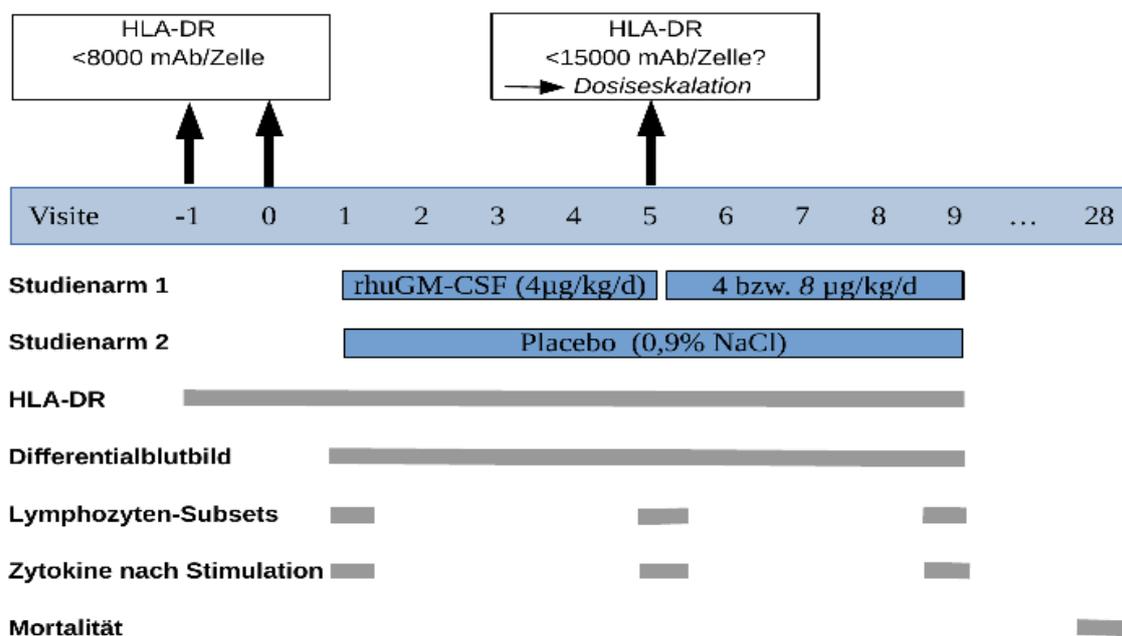


Abb. 2.1: Zeitlicher Ablauf der Studie, in Bezug auf durchgeführten Messungen und Applikation der Studienmedikation. Nach Meisel et al. 2009^[50]

2.2.3 Laborbestimmungen

Täglich wurde die monozytäre HLA-DR-Expression bestimmt sowie ein Differentialblutbild angefertigt und die Leukozytenzahl gemessen. Diese Untersuchungen erfolgten im Routinelabor des Instituts für Medizinische Immunologie.

2.2.4 Durchflusszytometrische Bestimmung von Oberflächenproteinen

Prinzip

Die Durchflusszytometrie ermöglicht neben der Zählung von Zellen und anderen Partikeln des Blutes auch deren Charakterisierung anhand von Größe, Granularität und Fluoreszenzeigenschaften nach Kopplung an mit Farbstoffen beladene Antikörper gegen zelleigene Strukturen. Mithilfe dieser Methode können neben quantitativen auch qualitative Aussagen zu Zellen und Zellpopulationen getroffen werden. Die zu untersuchenden Zellen werden hierbei in einer Kapillare in einem Flüssigkeitsstrom beschleunigt, so dass sie einzeln an einem Sensor vorbeigeleitet werden. Dieses Prinzip nennt man hydrodynamische Fokussierung. Diese ermöglicht die Erfassung von Eigenschaften auf Einzelzellebene. Im Bereich des Analysepunktes trifft monochromatisches Licht (Laser), auf die Zelle. Jeder Zelltyp streut dieses Licht entsprechend der Größe, der Struktur der Zellmembran und Art der intrazellulären Bestandteile in spezifischer Weise. Der größte Anteil des Lichtes wird vorwärts gestreut, so dass das Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*, FSC) ein Maß für die Größe der Zelle darstellt. Der im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Anteil wird als Seitwärtsstreulicht (*sideward light scatter*, SSC) bezeichnet und charakterisiert die Granularität der Zelle. Aussagen über weitere Oberflächen- sowie intrazelluläre Strukturen können durch Markierung mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierter Antikörper getroffen werden. Hierbei absorbiert der Farbstoff Licht einer bestimmten Wellenlänge, wodurch er angeregt wird und seinerseits Licht eines spezifischen Wellenlängenbereiches emittiert, das durch Detektoren erfasst wird. Dies erlaubt die simultane Messung verschiedener Parameter. Das verwendete LSR II-Gerät der Firma BD verfügt über vier verschiedene Laser der Wellenlängen 488 nm, 633 nm, 355 nm und 405 nm, so dass die gleichzeitige Analyse von acht Signalen zur Charakterisierung von T-Zell-Populationen möglich ist. Diese können mit Hilfe der Auswertungssoftware dargestellt und mittels Mutiparameteranalyse identifiziert werden. Da sich die Lichtemissionen eines Fluoreszenzfarbstoffes über einen größeren Wellenlängenbereich erstrecken und sich die Spektren einiger Farbstoffe überlappen, können die Emissionen eines Farbstoffes auch von anderen als dem zugeordneten Detektor erfasst werden. Um dieses Problem zu beheben, erfolgt eine elektronische Kompensation.

Durchführung

Die durchflusszytometrische Untersuchung wurde an den Visiten 1, 5 und 9 durchgeführt. Für die Färbung wurden 100 µl EDTA-Vollblut verwendet, das bis zur Analyse auf Eis gelagert wurde. Für jeden Patienten wurde an V1 ein Antikörper (AK)-Mix jeweils für alle drei Visiten hergestellt, der dem Vollblut zugegeben wurde. Bis zur Verwendung an V5 und V9 wurde dieser im Kühlraum lichtgeschützt bei +4°C gelagert. Nach Zugabe der Antikörper zum Vollblut wurde dieses bei +4°C für 30 Minuten inkubiert. Der Ansatz wurde mittels Vortexer bei geringer Geschwindigkeit durchmischt, um eine bessere Verteilung der Antikörper an den sich absetzenden Zellen zu erreichen und so die Färbung zu verbessern. Dieser Schritt wurde nach erfolgter Inkubation wiederholt. Um die Erythrozyten zu lysieren wurden anschließend 2 ml BD-Lyse hinzugegeben und die Probe für 10 Minuten dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Durchmischung wurde die Probe bei +4°C und 400 G für 8 Minuten zentrifugiert. Der Flüssigkeitsüberstand über dem sich absetzenden Zellpellet wurde verworfen und das verbleibende Pellet resuspendiert. Es wurden 2 ml FACS-Puffer zugesetzt und erneut bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen. Nach Zufügen von 100 µl FACS-Puffer wurden die Proben bis zur Messung am LSR II kühl und dunkel gelagert. Die Messung erfolgte jeweils am Tag der Blutentnahme.

Analyse und Auswertung der Proben

Die Analyse der gefärbten Proben erfolgte am Durchflusszytometer LSR II der Firma BD. Das Gerät wurde mit den durch den Hersteller empfohlenen Lösungen betrieben und nach jeder Benutzung sorgfältig gereinigt.

Die für alle Studienteilnehmer angewendete Kompensation wurde mit dem BD CompBeads Compensation Particles Set durchgeführt. Hierfür wurde je ein Tropfen des Anti-Mouse Ig mit den verschiedenen Antikörpern der T-Zell-Färbung versetzt. Die weitere Behandlung entsprach dem obenstehenden Protokoll, ebenso das eingesetzte Volumen der Antikörper. Die Negativkontrolle wurde nicht gefärbt, sonst aber gleich behandelt. Die Messung erfolgte am gleichen Gerät wie die Analyse der gefärbten Patientenproben. Nach Messung der einzelnen Kompensationsansätze und der Negativkontrolle erfolgte die Anpassung der Detektorspannungen mit Hilfe der FACS Diva-Software, um die Überstrahlung des Emissionssignals eines Farbstoffes in einen anderen zu

Material und Methoden

minimieren. Die ermittelten Detektorspannungen wurden für alle Patienten der Studie übernommen. Im Rahmen der Auswertung der Ergebnisse mit Hilfe der FlowJo-Software erfolgten bei Bedarf einzelne Korrekturen der Kompensation.

2.2.5 Überprüfung der T-Lymphozytenfunktion

Vollblutstimulationen

Zur Stimulation der T-Lymphozytenfunktion wurden verschiedene Mitogene eingesetzt, die zur Aktivierung von T-Zellen und damit zur Steigerung der Zytokinproduktion führen. Die Veränderung der Zytokinlevel im Verlauf können nachfolgend mittels quantitativer Analyseverfahren erfasst werden. Verwendet wurden neben Concanavalin A, einem Lektin aus der Jackbohne (*Canavalia ensiformis*), eine Kombination von PMA und Ionomycin, um die mitogene Potenz durch Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege noch zu steigern. PMA [Phorbol 12-myristate 13-acetate ($C_{36}H_{56}O_8$)] ist eine von Croton-Öl abgeleitete Substanz, die insbesondere durch eine Aktivierung des Ras/MAPKinase-pathways zur konzentrations-abhängigen Stimulation von peripheren T-Lymphozyten führt. Ionomycin ($C_{41}H_{70}O_9Ca$) ist ein durch *Streptomyces globatus* produziertes Polyether-Antibiotikum und fungiert als mobiler Transporter für Ca^{2+} -Ionen. Der resultierende Ca-Strom führt unter anderem zu einer Hochregulierung von CD7 in T-Zellen (Zeichen für Aktivierung) und zur Aktivierung der Proteinkinase C. In einem weiteren Ansatz erfolgte die Stimulation mit einem Gemisch verschiedener Recall-Antigene, einer Mischung aus bakteriellen und viralen Antigenen, die bei einem Großteil der Menschen eine zelluläre (T-Zell-vermittelte) Immunreaktion hervorrufen. In der Studie wurde eine Mischung aus *Candida albicans*-, Tetanus-, Tuberkulose-, Influenza- und CMV-Antigenen verwendet.

Durchführung

Der Ansatz der Vollblutstimulationen an den Studientagen V1, V5 und V9 erfolgte unter sterilen Kautelen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Zunächst wurde Medium in die Gefäße vorgelegt und dann das Stimulans hinzugefügt. Dann folgte die Zugabe von Heparin-Vollblut und die sanfte Durchmischung der Probe. Die Stimulantien waren bis zu ihrer Verwendung bei $-80^{\circ}C$ gelagert.

Material und Methoden

PMA wurde vor dem Einsetzen zunächst mit Medium verdünnt. Die Stimulationen wurden nach folgendem Schema angesetzt:

	Concanavalin A	PMA/Ionomycin	Recall-Antigene
Medium	750 µl	500 µl	200 µl
Stimulans	50 µl	5 µl PMA, verdünnt	50 µl
Verdünnung		5 µl PMA	
Vollblut	200 µl	500 µl	250 µl

Die Ansätze wurden anschließend für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben zunächst sanft resuspendiert und anschließend für 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden in Reaktionsgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

Cytometric Bead Array (CBA) zur Bestimmung löslicher Zytokine im Überstand

CBA ist ein quantitatives Verfahren, um lösliche Produkte, wie z.B. Zytokine im Überstand nach Stimulation oder auch direkt im Serum zu bestimmen. Das Prinzip entspricht dem eines Sandwich-ELISA, bei dem der Capture-AK jedoch nicht an eine Platte, sondern an Beads (kleine Polymerkügelchen) gekoppelt ist. Diese tragen zusätzlich Fluoreszenzmoleküle, die bei der gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Zytokine eine eindeutige Zuordnung anhand von Größe und Fluoreszenzeigenschaften der Bead-Population erlauben. Im nächsten Schritt bindet der spezifische Detektions-AK, der in einer anderen Fluoreszenz eingesetzt wird, an den Komplex aus Capture-Bead und Zytokin. Die Messung erfolgt anschließend am Durchflusszytometer. Durch die Erstellung einer Standardkurve mit definierten Zytokinkonzentrationen lassen sich Aussagen zur Konzentration des betreffenden Zytokins treffen.

Durchführung

Die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen im Überstand nach Vollblutstimulation erfolgte durch eine staatlich anerkannte Biologisch-Technische Angestellte des Instituts für Medizinische Immunologie. Verwendet wurde der Human Soluble Protein Master Buffer Kit der Firma Becton Dickinson, Heidelberg. Für die Analyse der einzelnen Zytokine wurden die von Becton Dickinson empfohlenen ergänzenden Flex Sets für IL-2, IL-5, IP-10, IFN- γ und RANTES verwendet.

Nachweisgrenzen für die jeweiligen Zytokine können der Tabelle Test-/Reaktionskits entnommen werden.

2.2.6 Statistik

Zur statistischen Berechnung wurde sowohl SPSS (Version 16.0) und Origin® (SR 7) verwendet. Für die erfassten Daten wurde mittels Shapiro-Wilkins-Test ermittelt, ob die erfassten Daten eine Normalverteilung aufweisen.

Im Falle des Vorliegens einer Normalverteilung wurde für die Verlaufsbeobachtung innerhalb eines Studienarmes ein gepaarter Student-t-Test von Werten zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten durchgeführt. Für den Vergleich zwischen den beiden Patientengruppen wurde der ungepaarte Student-t-Test verwendet. Bei normalverteilten Daten erfolgte die Testung mittels Origin®-Software.

Bei fehlender Normalverteilung der Daten erfolgte die Testung mittels SPSS-Software. Für Vergleiche innerhalb einer Gruppe und zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten wurde hierbei der Wilcoxon-Test und für Vergleiche zwischen den Gruppen der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Die hier wiedergegebenen Ergebnisse beziehen sich auf die *intention-to-treat* (ITT)-Population und sind, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben. Ein p-Wert <0.05 wurde als signifikant gewertet

3 Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

Im Zeitraum von November 2005 bis Januar 2007 wurden insgesamt 38 Patienten in die Studie eingeschlossen. Ein Patient des Placebo-Armes wurde an V3 wegen des Auftretens einer akuten Linksherzinsuffizienz unter der Vermutung des Vorliegens eines SAE (*serious adverse event*) aus der Studie ausgeschlossen. Einem weiteren Patienten der Placebogruppe wurde ab V6 wegen der akuten Verlegung auf eine andere Station keine Studienmedikation mehr verabreicht (Protokollverletzung). Ein Patient der GM-CSF Gruppe verstarb an V8. Damit verringerte sich die Patientenzahl von 38 in der ITT-Population (*intention to treat*) auf 35 in der PP-Population (*per protocol*) (**Abbildung 3.1**).

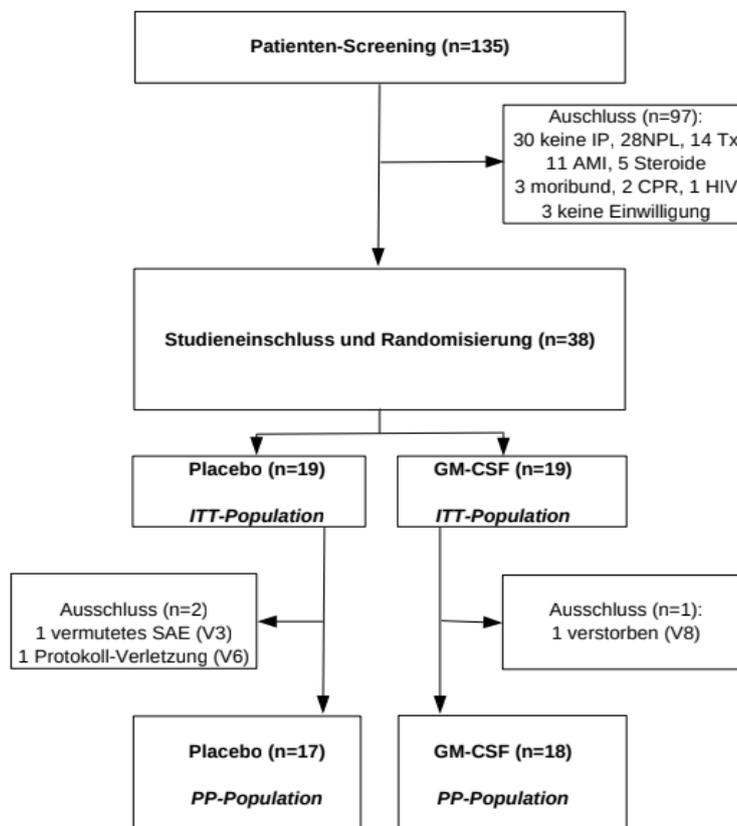


Abb. 3.1: Flussdiagramm zu Einschluss und Randomisierung der Patienten.

IP = Immunparalyse, AMI = akuter Myokardinfarkts, tx = Transplantation, CPR = Cardiopulmonale Reanimation, ITT = intention to treat, PP = per protocol. Nach: Meisel et al 2009^[50]

Ergebnisse

Zwischen den Studienarmen finden sich keine weiteren signifikanten Unterschiede bezüglich Alter, Geschlecht, Verweildauer auf ITS vor Einschluss, Aufnahmegrund oder Infektionsort. Die Patientengruppen unterscheiden sich lediglich hinsichtlich eines signifikant häufigeren Nachweises Gram-negativer Erreger in der Placebo-Gruppe ($p=0,042$), Tabelle 3.1

Parameter	Placebo	GM-CSF	p-Wert
	n = 19	n = 19	
Alter, Jahre #	64 ($\pm 13,6$)	63,3 ($\pm 14,2$)	ns
Geschlecht, weiblich/männlich	4/15	3/16	ns
Septischer Schock bei Einschluss (%)	10/19 (53)	11/19 (58)	ns
Aufenthalt auf ITS bis Einschluss (d)	8,47 ($\pm 8,9$)	6,0 ($\pm 3,3$)	ns
Pathogen:			
Gram-negativ	7	1	$p=0,042$
Gram-positiv	5	9	ns
Mischinfektion	4	9	ns
Pilze	2	1	ns
Kein Erregernachweis	1	0	ns

Tab. 3.1: Basisdaten der Patienten bei Einschluss in die Studie; + Mean \pm Standardabweichung (SD), # Median (Variationsbreite). In der GM-CSF Gruppe zeigt sich ein signifikant niedrigeres Vorkommen von gram-negativen Keimen, $p=0,042$. Ansonsten konnten keine signifikanten Unterschiede (ns) zwischen den Patienten der beiden Studienarme nachgewiesen werden.^[50]

3.2 Entwicklung der HLA-DR Expression auf Monozyten

Der Einschluss der Patienten in die Studie erfolgte bei einem HLA-DR von < 8000 Molekülen/Zelle an mindestens zwei aufeinander folgenden Tagen. Mit Beginn der Medikation lässt sich ein signifikanter Anstieg der HLA-DR Expression in der Verumgruppe verzeichnen ($p<0,001$). (**Abbildung 3.2**) Dieser bleibt in der Placebo-Gruppe aus. Der Anstieg hält für die gesamte Dauer der Applikation bis einschließlich V9 an.

Ergebnisse

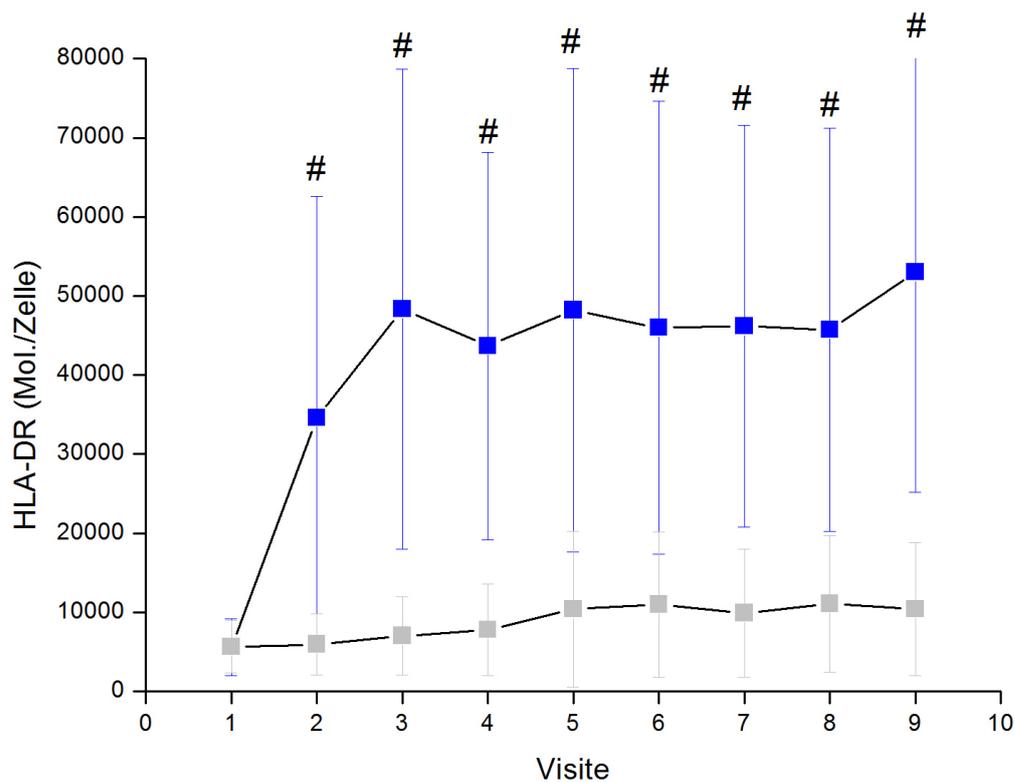


Abb. 3.2: Entwicklung der monozytären HLA-DR Expression, in Molekülen/Zelle. Referenzwert: >15000. In der GM-CSF Gruppe zeigt sich ab V2 ein signifikanter Anstieg im Vergleich zu Studienbeginn ($p < 0,05$). Dieser bleibt in der Placebogruppe hingegen aus. Vor Beginn der Behandlung lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Studienarmen nachweisen. Ab V2 findet sich ein signifikanter Unterschied (#, $p < 0,05$) zugunsten der GM-CSF Gruppe, der für die gesamte Studiendauer anhält (■ GM-CSF, ■ Placebo), publiziert in: Meisel et al. 2009.^[50]

Bei zwei Patienten der GM-CSF-Gruppe fand sich an V5 keine Zunahme der monozytären HLA-DR Expression auf über 15.000 Moleküle/Zelle, einer der betreffenden Patienten verstarb an V8. In der Placebo-Gruppe lagen 16 der Patienten an V5 unter diesem Wert ($p=0,001$). Patienten mit ausbleibendem Anstieg der monozytären HLA-DR Expression auf über 15000 Moleküle/Zelle erfuhren eine Dosisescalation der Studienmedikation auf 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG, sodass an V9 alle verbleibenden Patienten der GM-CSF-Gruppe ein HLA-DR von > 15000 Moleküle/Zelle erreichten, in der Placebo-Gruppe lagen 14 Patienten weiterhin unter diesem Wert ($p=0,001$), wobei bei fünf dieser Patienten weniger als 5000 HLA-DR Moleküle pro Zelle nachgewiesen werden konnten. Bei diesen Patienten ließ sich also auch nach Abschluss der Studie weiterhin eine Immunparalyse nachweisen.

3.3 Blutbildveränderungen

Nach Beginn der Therapie lassen sich im Differentialblutbild der Patienten der zwei Studienarme deutlich unterschiedliche Entwicklungen der Zellzahlen erkennen. Diese sind insbesondere für neutrophile Granulozyten und auch im monozytären Bereich sehr ausgeprägt. Unter GM-CSF Therapie steigt die Zahl der neutrophilen Granulozyten im Mittel auf $21,4 \times 10^9$ Zellen/l (*standard deviation* SD $\pm 8,4 \times 10^9$) an V5 und auf $22,8 \times 10^9$ Zellen/l (SD $\pm 9,7 \times 10^9$) an V9, Referenzwert $1,5-7,7 \times 10^9$ /l. Bei Patienten, die mit Placebo behandelt wurden, befanden sich die Zellzahlen im Mittelwert bei $11,1 \times 10^9$ Zellen/l (SD $\pm 3,6 \times 10^9$) an V5 und $10,5 \times 10^9$ Zellen/l (SD $\pm 4,7 \times 10^9$) an V9. Die Unterschiede zwischen den beiden Therapiegruppen sind an allen Behandlungstagen statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$ ab V2).

Auch die Monozytenkonzentration steigt in der GM-CSF Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant an. An V5 liegt der Mittelwert der Monozytenzahl in der GM-CSF Gruppe bei $1,4 \times 10^9$ Zellen/l (SD $\pm 0,7 \times 10^9$), in der Placebogruppe bei $0,7 \times 10^9$ Zellen/l (SD $\pm 0,3 \times 10^9$), Referenzwert $0,0-0,5 \times 10^9$ /l. An V9 lässt sich ein Anstieg auf $1,6 \times 10^9$ Zellen/l (SD $\pm 1,1 \times 10^9$) in der Verumgruppe verzeichnen, in der Placebogruppe liegt die Monozytenkonzentration im Mittel bei $0,7 \times 10^9$ Zellen/l (SD $\pm 0,5 \times 10^9$). Eine weitergehende Untersuchung bezüglich Subpopulationen und Funktion dieser Zellreihen erfolgte im Rahmen einer weiteren Arbeit innerhalb derselben Arbeitsgruppe und ist nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Auf eine Darstellung wird aus diesem Grund verzichtet. Die Daten sollen lediglich verdeutlichen, dass sich sehr wohl eine zelluläre Response auf Seiten der unspezifischen Immunantwort nachweisen lässt. Die Voraussetzungen für eine nachfolgende Aktivierung der T-Zell bedingten spezifischen Immunantwort sollte also durchaus gegeben sein.

3.4 Entwicklung der T-Lymphozyten

Im Laufe der Behandlung zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Zahl der T-Lymphozyten für die Patienten der GM-CSF Gruppe, während die Zahl in der Placebogruppe nahezu konstant bleibt (**Abbildung 3.3**). Die Zahl der T-Lymphozyten liegt in der GM-CSF Gruppe ab V5 (ausgenommen an V7) signifikant höher als in der Placebogruppe. Die Gesamtzahl der T-Lymphozyten erreicht in der Verumgruppe an V9 einen Mittelwert von $0,95 \times 10^9$ Zellen/l (SD $\pm 0,71 \times 10^9$), liegt somit

Ergebnisse

innerhalb des physiologischen Normbereiches ($0,9-2,2 \times 10^9/l$), während dieser in der Placebogruppe $0,52 \times 10^9$ Zellen/l (SD $\pm 0,31 \times 10^9$) beträgt.

Sofern nicht anders in den Abbildungen angegeben, liegen für alle Patienten Messwerte (n=19) vor und sind dargestellt.

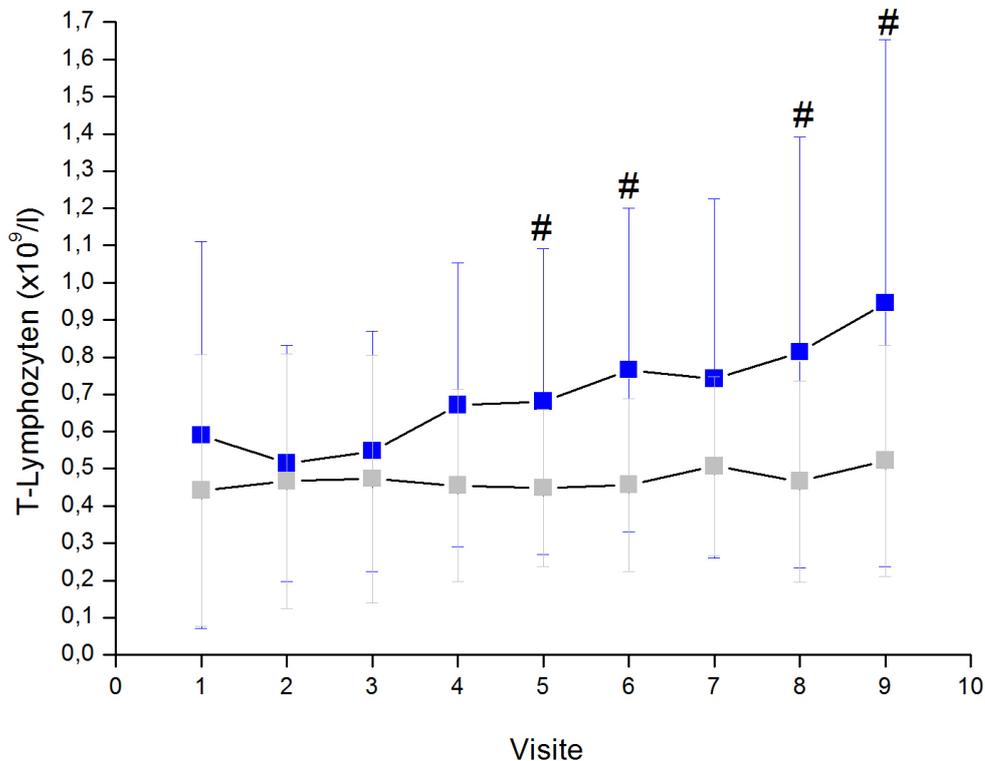


Abb. 3.3: Entwicklung der Gesamtzahl der T-Lymphozyten, Mittelwerte in $\times 10^9$ Zellen/l. Es lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen ab V5 zugunsten der mit GM-CSF behandelten Patienten, ausgenommen an V7 nachweisen (#, $p < 0,05$) (■ GM-CSF, ■ Placebo).

3.4.1 Entwicklung von T-Zellpopulationen

Wie bereits für die Gesamtzahl der T-Lymphozyten findet sich auch für CD4⁺ T-Zellen eine signifikante Zunahme der absoluten Zellzahl im Differentialblutbild bei den Patienten der Verumgruppe (**Abbildung 3.4**). Der Mittelwert für CD4⁺ T-Lymphozyten erreicht in der GM-CSF Gruppe einen niedrig-normalen Wert von $0,65 \times 10^9$ Zellen/l (SD $\pm 0,54 \times 10^9$). Ab V6 ist der Anstieg im Vergleich zur Zellzahl an V1 signifikant. Die Zellzahl der CD4⁺ Lymphozyten in der

Ergebnisse

Placebogruppe steigt im Vergleich dazu deutlich geringer, im Mittel von $0,27 \times 10^9$ Zellen/l ($SD \pm 0,20 \times 10^9$) auf $0,34 \times 10^9$ Zellen/l ($SD \pm 0,22 \times 10^9$) an und verbleibt somit auch zum Ende des Beobachtungszeitraumes unter dem Normwertbereich ($0,5-1,2 \times 10^9/l$). Lediglich an V7 zeigt sich ein statistisch signifikanter Anstieg im Vergleich zu V1.

An V6, V7 und V9 findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsarmen zugunsten der GM-CSF Gruppe .

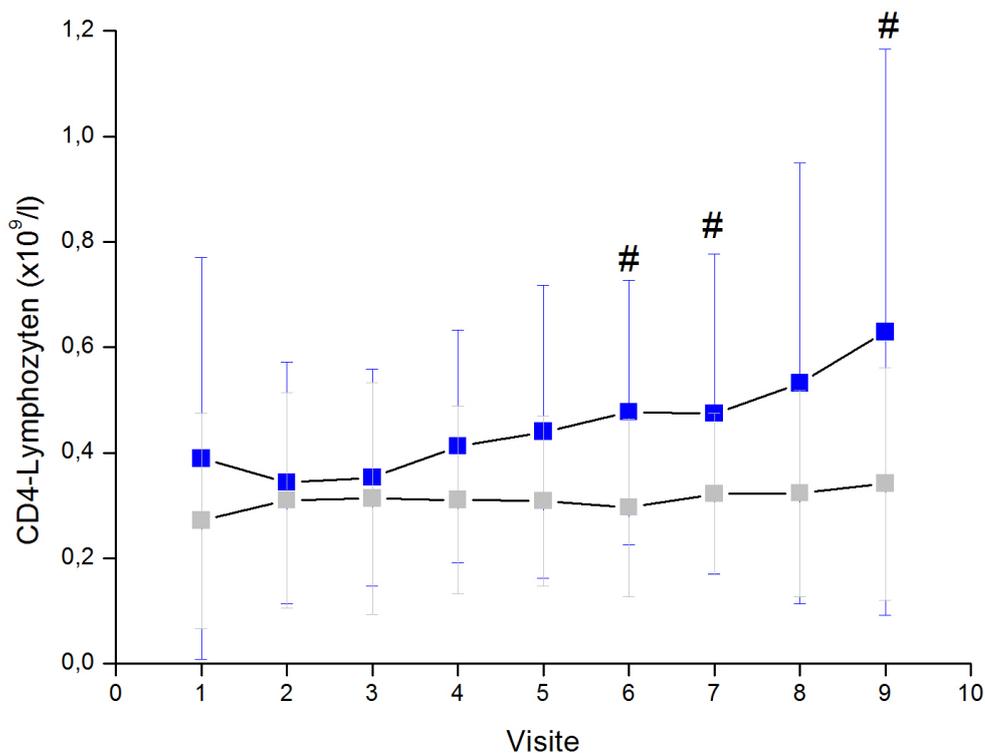


Abb. 3.4: Entwicklung der CD4+ T-Helferzellen, Mittelwerte in $\times 10^9$ Zellen/l. Es findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen an den Visiten V6, V7 und V9 zugunsten der mit GM-CSF behandelten Patienten (#, $p < 0,05$) (■ GM-CSF, ■ Placebo). Publiziert in: Meisel et al. 2009^[50]

Im Bereich der CD8+ Zellen weisen die Mittelwerte in der Verumgruppe einen Anstieg von $0,17 \times 10^9$ Zellen/l ($SD \pm 0,17 \times 10^9$) auf $0,26 \times 10^9$ Zellen/l ($SD \pm 0,18 \times 10^9$) an V6 und auf $0,28 \times 10^9$ Zellen/l ($SD \pm 0,21 \times 10^9$) an V9 auf (**Abbildung 3.5**), Referenzbereich $0,3-0,8 \times 10^9/l$. Für die Visiten V6 und V9 ist der Anstieg gegenüber V1 signifikant. Die Werte in der Placebogruppe weisen keine signifikanten Änderungen auf. An V1 liegt die Zahl der CD8+ T-Zellen in der Placebogruppe bei $0,15 \times 10^9$ Zellen/l ($SD \pm 0,17 \times 10^9$). An V9 finden sich $0,15 \times 10^9$ Zellen/l ($SD \pm 0,10 \times 10^9$), es findet

Ergebnisse

sich kein signifikanter Unterschied im Laufe der Behandlung. Ab V4 findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen, zugunsten der mit GM-CSF behandelten Patienten.

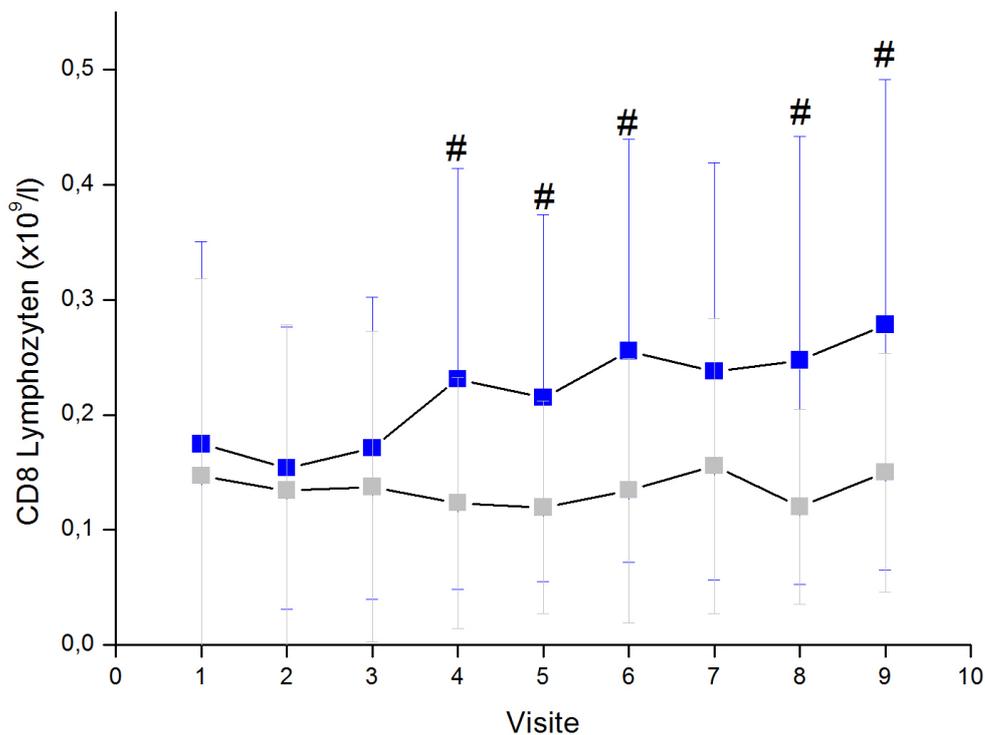


Abb. 3.5: Entwicklung der CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten, Mittelwerte in $\times 10^9$ Zellen/l. Es findet sich ein Anstieg der CD8+ Lymphozyten in der GM-CSF-Gruppe, signifikant an V6 und V9 verglichen mit V1 ($p < 0,05$). Demgegenüber findet sich nahezu keine Änderung in der Placebogruppe. Es lässt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen ab Visite V4 zugunsten der mit GM-CSF behandelten Patienten nachweisen (#, $p < 0,05$) (■ GM-CSF, ■ Placebo), ausgenommen an V7. Publiziert in: Meisel et al. 2009^[50]

Die im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Werte wurden vom Routinelabor des Institutes für medizinische Immunologie der Charité für alle Visiten erfasst. Zu den Visiten V1, V5 und V9 erfolgte darüber hinaus die weitere Differenzierung verschiedener T-Zellsubtypen mittels Durchflusszytometrie durch die Autorin. Dies erlaubt die Untersuchung von Subpopulationen von T-Lymphozyten, die nicht routinemäßig untersucht werden. Dies ist vor allem im Hinblick auf den Ausreifungsgrad der Lymphozyten von Interesse (**Tabelle 3.2**).

Ergebnisse

Für naive CD4+CD45RA+ T-Zellen findet sich in der GM-CSF Gruppe ein nahezu stabiler Anteil an der Gesamtzahl der CD4+ T Lymphozyten (**Abbildung 3.6**). An V1 liegt dieser bei 39,4% (SD \pm 12,9%), an V5 bei 40% (SD \pm 14,1%) und zu V9 bei 39,4% (SD \pm 13,8%), Referenzbereich 16,4-63,2%. In der Placebogruppe findet sich ein leichter Abfall des Anteils von CD4+CD45RA+ Zellen im Verlauf der Studie, mit Änderung des Mittelwertes von 38,6% (SD \pm 15,6%) an V1 zu 34,0% (SD \pm 13,1%) an V5 und 35,9% (SD \pm 15,6%) an V9. Es ergeben sich keine signifikanten Änderungen im Zeitverlauf innerhalb der Studienarme oder zwischen den Patientengruppen.

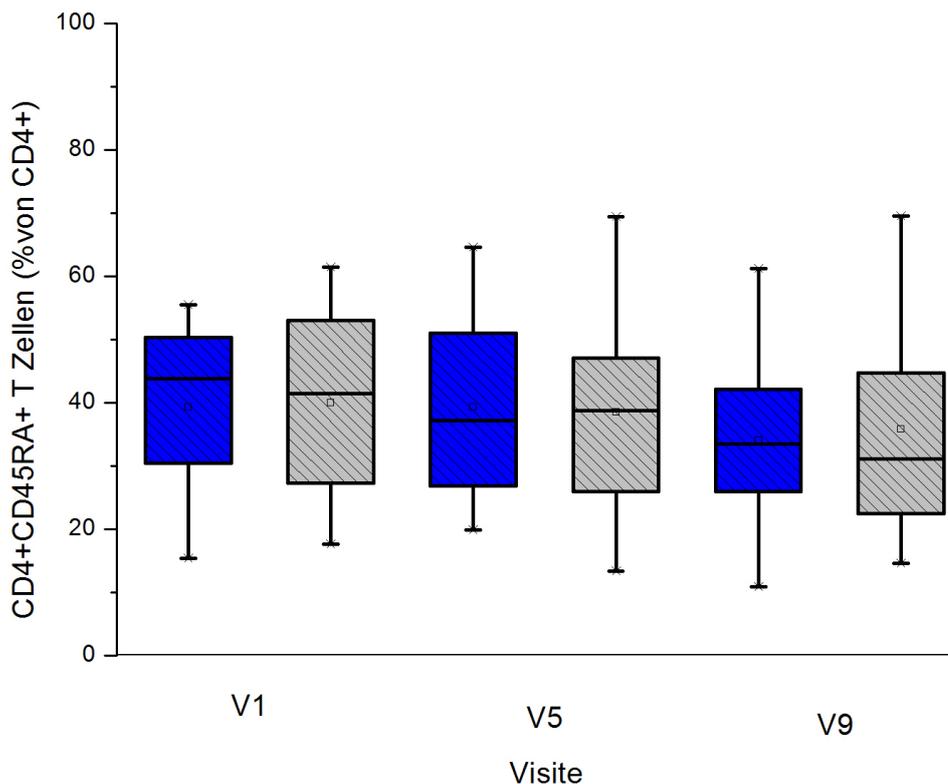


Abb. 3.6: Entwicklung der Zellzahlen der naiven T-Lymphozyten, in % von CD4+. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Studienarme oder zwischen den Behandlungsgruppen. (■ GM-CSF, ■ Placebo)

Insbesondere mit Hinblick auf gegenregulatorische Prozesse auf eine in der Frühphase der Sepsis überschießende Immunantwort kommt regulatorischen Zellen eine wichtige Funktion zu. Diese wurden anhand eines Expressionsmusters von CD4+ CD62L+ CD25++ identifiziert und ihr prozentualer Anteil von CD4+ T-Lymphozyten ausgewertet. Dieser liegt in der GM-CSF Gruppe an V1 im Mittel bei 8,7% (SD \pm 4,3%), fällt an V5 auf 7,7% (SD \pm 4,0%) ab und steigt an V9 auf 11,1% (SD \pm 12,6%) an (**Abbildung 3.7**), Referenzbereich 4,98-9,52%. Es findet sich kein

Ergebnisse

signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungszeitpunkten. In der Placebogruppe zeigt sich eine gegenläufige Entwicklung mit kurzzeitigem Anstieg von V1 mit 9,1% (SD \pm 5,4%) zu V5 mit 9,5% (SD \pm 5,5%) und anschließendem Abfall zu V9 mit 6,6% (SD \pm 3,5%). Diese Verringerung des Anteiles der Treg an V9 ist gegenüber V5 signifikant. Im Zwischengruppenvergleich zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zu den drei Untersuchungszeitpunkten.

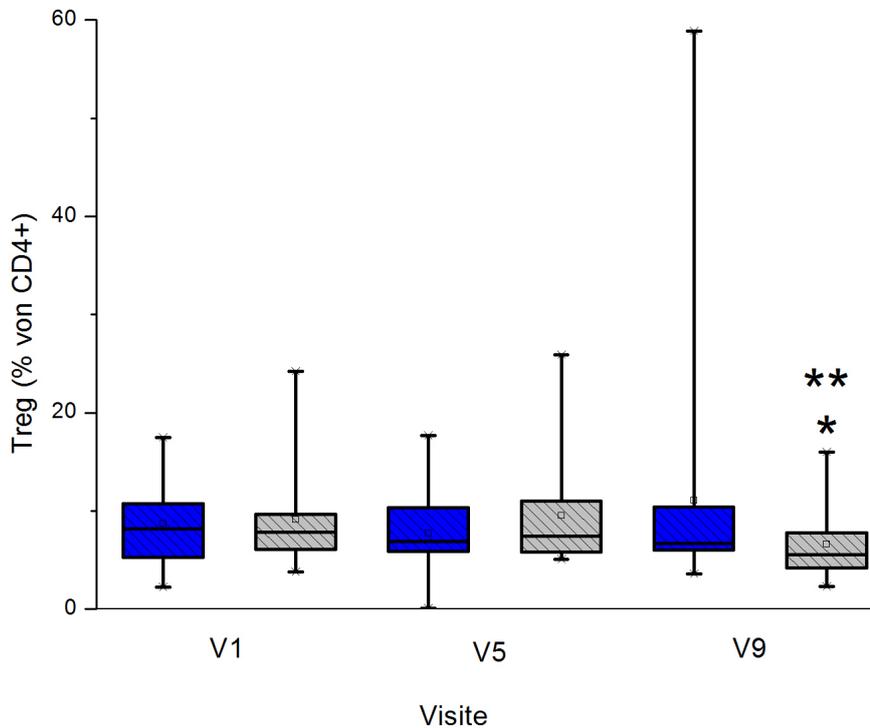


Abb. 3.7: Entwicklung der regulatorischen T-Zellen, in % der CD4+ T-Lymphozyten. Es findet sich ein signifikanter Abfall in der Placebogruppe von V5 zu V9 (*, $p < 0,05$). (■ GM-CSF, ■ Placebo)

Auch der Anteil der RTEs (*recent thymic emigrants*) an CD4+ T-Lymphozyten wurde mittels Durchflusszytometrie erfasst. Für die GM-CSF Gruppe zeigt sich ein stabiler Anteil, V1 im Mittel 13,5% (SD \pm 8,6%) zu V9 im Mittel 13,5% (SD \pm 8,5%) mit einem leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg zu V5 mit einem Mittelwert von 15,2% (SD \pm 7,5%) (**Abbildung 3.8**), Referenzbereich 6,4-27,7%. Der Anteil liegt in der Placebogruppe zu allen drei Untersuchungszeitpunkten höher mit im Mittel 14,6% (SD \pm 8,2%) an V1 und einem Anstieg auf jeweils 15,7% (SD \pm 7,5%) an V5 und 16,2% (SD \pm 7,8%) an V9. Der Anstieg zu V9 ist im Vergleich zu den Visiten 1 und 5 jeweils signifikant. Es finden sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der beiden Studienarme.

Ergebnisse

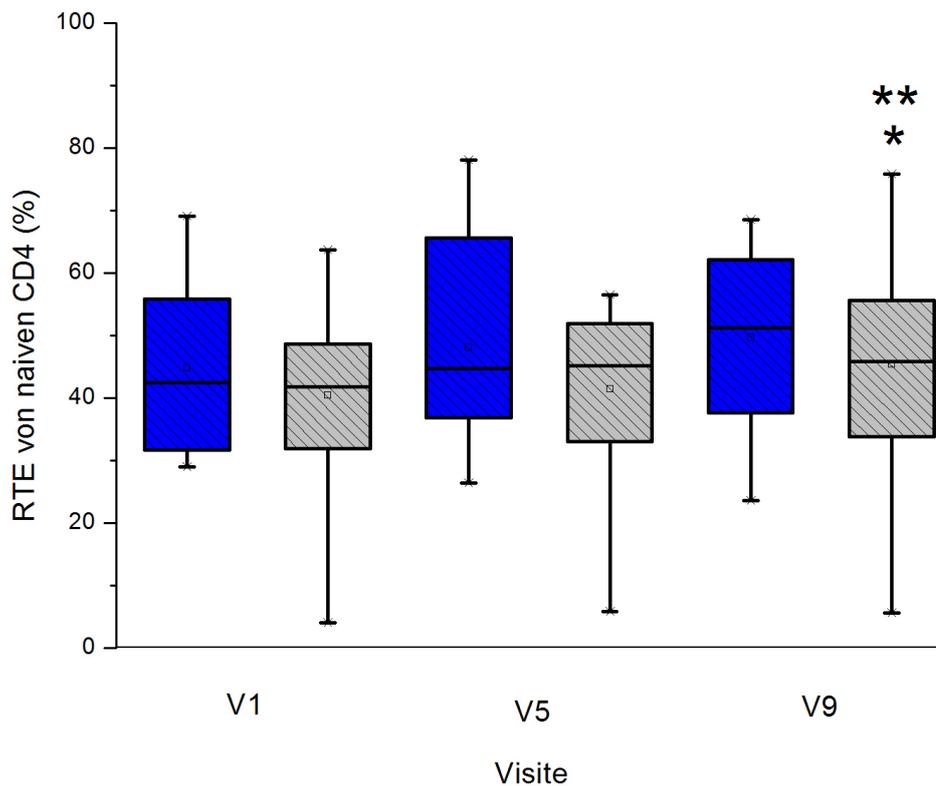


Abb. 3.8: Entwicklung der RTEs, in % der CD4+ T-Lymphozyten. Es finden sich keine signifikanten Änderungen in der mit GM-CSF behandelten Patientengruppe. Für mit Placebo behandelte Patienten findet sich ein signifikanter Anstieg an V9, sowohl im Vergleich zum Ausgangswert an V1 (*, $p < 0,05$), als auch zu V5 (**, $p < 0,05$) (■ GM-CSF, ■ Placebo).

Zur Bestimmung des Differenzierungsgrades von T-Lymphozyten wurden weitere Oberflächenmarker hinzugezogen. Es wurden die Frequenz der CD11a-positiven Zellen sowie HLA-DR positiven Zellen (als Maß für eine frühe Aktivierung) an CD4+ und CD8+ Lymphozyten bestimmt. In gleicher Weise wurden auch Werte für die chronischen Aktivierungsmarker CD28 und CD57 ermittelt.

Lediglich für HLA-DR auf zytotoxischen CD8+ T-Zellen findet sich in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg von V1 zu V5 und V9. Der Anstieg von V5 zu V9 ist in beiden Studienarmen nicht signifikant. Es findet sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Studienarme miteinander. Die Entwicklungen der Frequenzen der für CD11a, CD28 und CD57 positiven Zellen, sowohl für CD4+, als auch CD8+ Lymphozyten ist nicht signifikant. Es finden sich keine

Ergebnisse

signifikanten Unterschiede im Vergleich der beiden Studienarme (**Abbildung 3.9** und **Abbildung 3.10**, **Tabelle 3.2**).

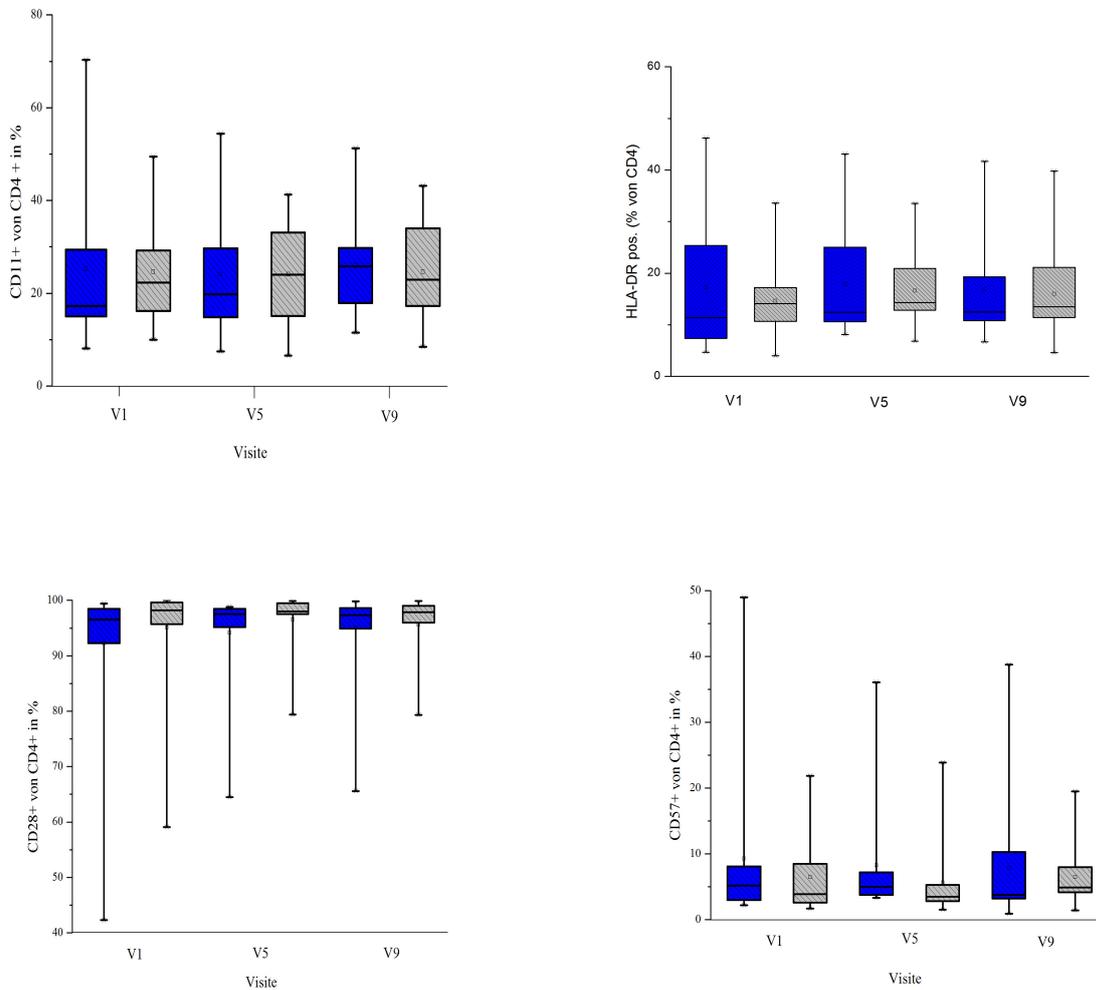


Abbildung 3.9: Entwicklung von Aktivierungsmarkern auf CD4+T-Lymphozyten (in % von CD4+). Für CD11a, HLA-DR, CD28 und CD 57 finden sich keine signifikanten Unterschiede im Studienverlauf innerhalb und zwischen den Studienarmen (■ GM-CSF, ■ Placebo).

Ergebnisse

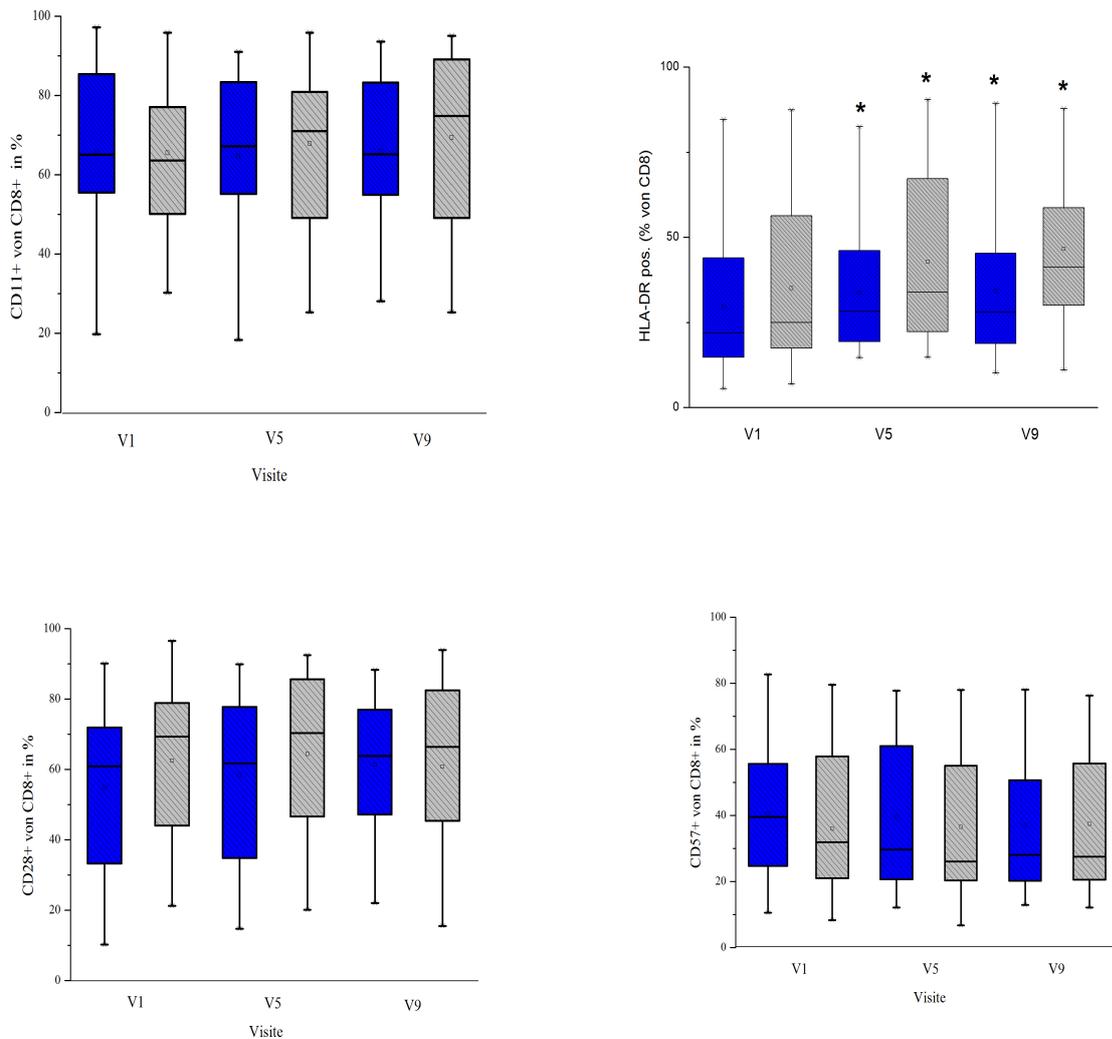


Abbildung 3.10: Entwicklung von Aktivierungsmarkern auf CD8+ T-Lymphozyten (in % von CD8+). Für CD11a, CD28 und CD 57 finden sich keine signifikanten Unterschiede im Studienverlauf innerhalb und zwischen den Studienarmen. Für HLA-DR findet sich ein signifikanter Anstieg (*) an V5 und V9 im Vergleich zum Ausgangswert an V1 in beiden Patientengruppen ($p < 0,05$). Kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studienarmen, (■ GM-CSF, ■ Placebo). Referenzbereich: HLA-DR $< 30\%$, CD57+ $< 30\%$, CD28+ $> 60\%$ der CD8+

Lymphozyten- Population	Zellzahl	Mittelwert ±Standardabweichung			Zwischengruppen p-Wert			Innergruppen p-Wert		
		V1	V5	V9	V1	V5	V9	V1 vs V5	V5 vs V9	V1 vs V9
Naive CD4					ns	ns	ns			
	Placebo (% von CD4)	38,6±15,6	0	35,9±15,6				ns	ns	ns
	GM-CSF (% von CD4)	39,4±12,9	0	39,4±13,8				ns	ns	ns
Treg					ns	ns	ns			
	Placebo (% von CD4)	9,1±5,4	9,5±5,5	6,6±3,5				ns	0,02	ns
	GM-CSF (% von CD4)	8,7±4,3	0	11,1±12,6				ns	ns	ns
RTE					ns	ns	ns			
	Placebo (% von CD4)	0	0	45,4±16,9				ns	0,047	0,026
	GM-CSF (% von CD4)	43,7±13,8	44,8±15,8	47,1±14,8				ns	ns	ns
CD11a+T-Zellen					ns	ns	ns			
	Placebo (% von CD4)	24,5±10,4	24,2±10,6	24,7±10,5				ns	ns	ns
	GM-CSF (% von CD4)	25,3±17,0	24,1±13,4	26,1±11,7				ns	ns	ns
					ns	ns	ns			
	Placebo (% von CD8)	64,5±20,1	67,9±21,5	69,4±22,9				ns	ns	ns
	GM-CSF (% von CD8)	65,6±22,6	64,8±23,1	65,8±20,0				ns	ns	ns
HLA-DR+T-Z.					ns	ns	ns			
	Placebo (% von CD4)	14,9±6,3	16,6±6,4	16,0±8,4				ns	ns	ns
	GM-CSF (% von CD4)	17,2±12,8	17,9±9,9	16,9±9,9				ns	ns	ns
					ns	ns	ns			
	Placebo (% von CD8)	35,6±23,6	42,8±25,2	46,7±23,7				0,003	ns	0,002
	GM-CSF (% von CD8)	29,5±20,8	33,8±18,0	34,2±21,2				0,03	ns	0,007
CD28+T-Zellen					ns	ns	ns			
	Placebo (% von CD4)	95,2±9,3	96,5±5,1	95,7±5,9				ns	ns	ns
	GM-CSF (% von CD4)	92,3±13,4	94,2±8,6	95,1±7,8				ns	ns	ns
					ns	ns	ns			
	Placebo (% von CD8)	63,7±23,2	64,4±24,4	60,8±25,7				ns	ns	ns
	GM-CSF (% von CD8)	54,9±24,1	58,4±24,9	61,4±20,8				ns	ns	ns
CD57+T-Zellen					ns	ns	ns			
	Placebo (% von CD4)	6,4±5,5	5,6±5,5	6,5±4,7				ns	ns	ns
	GM-CSF (% von CD4)	9,3±11,5	8,3±8,4	7,3±8,6				ns	ns	ns
					ns	ns	ns			
	Placebo (% von CD8)	34,7±21,2	36,5±22,8	37,4±20,5				ns	ns	ns
	GM-CSF (% von CD8)	40,5±21,6	39,6±22,8	36,9±20,2				ns	ns	ns

Tabelle 3.2.: Zellzahl verschiedener Lymphozytenpopulationen /Prozentualer Anteil verschiedener Lymphozyten-Subpopulationen an CD4+ und CD8+ T-Zellen. Im Placeboarm findet sich eine signifikante Abnahme von Treg an V9 und ein Anstieg von RTEs zu V9, für beide Populationen sowohl im Vergleich zum Ausgangswert an V1, als auch im Vergleich zu V5. Im Zwischengruppen Vergleich finden sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede. Außer für HLA-DR mit signifikantem Anstieg von V1 zu V5 und V9 lassen sich keine signifikanten Änderungen in den Behandlungsgruppen nachweisen. Im Zwischengruppen Vergleich finden sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt signifikante Unterschiede.

3.5 Zytokinkonzentrationen nach Stimulation *ex vivo*

Um Aussagen über die T-Lymphozytenfunktion treffen zu können, wurden verschiedene Mitogene bzw. Antigene zur Stimulation der T-Zellen in Vollblut eingesetzt. Die Stimulation erfolgte für 24 Stunden. Im Anschluss wurden die Konzentration verschiedener von T-Zellen produzierter Zytokine im Überstand gemessen und die zeitlichen Veränderungen in beiden Patientengruppen erfasst. Stimulationsansätze wurden jeweils für die Visiten V1, V5 und V9 angefertigt (**Tabelle 3.3**).

Stimulanz/ Zytokine	Moleküle/Zelle			Zwischengruppen p-Wert			Innergruppen p-Wert				
	Mittelw. ± SD (Anzahl Pat.)			V1	V5	V9	V1 vs V5	V5 vs V9	V1 vs V9		
			V1 (n)	V5 (n)	V9 (n)						
<u>Recall</u>	IL-2	Placebo	7,8±9,8	8,7±11,4	25,1±40,8	ns	ns	ns	ns	ns	
		GM-CSF	4,5±8,4	7,4±10,4	10,7±16,7				ns	ns	
	IL-5	Placebo	1,6±3,8	0,8±1,1	1,4±2,2	ns	ns	ns	ns	ns	
		GM-CSF	0,4±0,8	0,7±0,9	0,8±1,0				ns	ns	
	IP-10	Placebo	6720±13336	6582±6322	7834±9838	ns	ns	ns	ns	ns	
		GM-CSF	5901±11817	4425±3817	3819±2342				ns	ns	
	RANTES	Placebo	5982±3804	7383±5010	7409±5103	ns	ns	ns	ns	ns	
		GM-CSF	7405±4161	7502±3822	8035±4268				ns	ns	
	IFN-γ	Placebo	20,7±26,7	29,2±47,0	51,1±71,5	ns	ns	ns	ns	ns	
		GM-CSF	9,3±16,3	15,1±27,2	22,2±38,1				ns	ns	
<u>PMA/Iono</u>	IL-2	Placebo	4747±3513	4179±2823	6980±4580	ns	ns	0,046	ns	ns	0,03
		GM-CSF	3613±3323	2967±2458	4118±3657				ns	ns	
	IL-5	Placebo	67,0±90,7	119,3±176,1	158,5±250,9	ns	ns	ns	ns	ns	
		GM-CSF	76,6±127,9	66,3±107,0	88,5±127,3				ns	ns	
	IP-10	Placebo	7466±10390	6673±5957	55879±204898	ns	ns	ns	ns	ns	
		GM-CSF	4472±6857	3445±3607	3410±2430				ns	ns	
	RANTES	Placebo	8113±3669	6926±4235	7684±3947	ns	ns	ns	ns	ns	
		GM-CSF	7627±4318	7848±3831	7557±4234				ns	ns	
	IFN-γ	Placebo	8207±8029	7283±7806	10107±7575	ns	ns	0,03	ns	ns	
		GM-CSF	5206±4822	4176±5567	5065±5411				ns	ns	
<u>ConA</u>	IL-2	Placebo	3,9±16,9 (1)	5,7±14,5 (4)	30,9±67,9(6)	ns	ns	ns	ns	ns	
		GM-CSF	2,8±8,1 (3)	3,1±9,7 (2)	2,5±10,7 (1)				ns	ns	
	IL-5	Placebo	0,25±0,76 (2)	0,17±0,68 (1)	0,67±1,73 (3)	ns	ns	ns	ns	ns	
		GM-CSF	0,24±0,73 (2)	0,10±0,44 (1)	0,08±0,35 (1)				ns	ns	
	IP-10	Placebo	7699±13788	6148±7403	11609±22900	ns	ns	ns	ns	ns	
		GM-CSF	5466±6358	8766±22764	110370±451441				ns	ns	
	RANTES	Placebo	1194±1142	1665±1360	1969±1725	ns	ns	ns	ns	ns	
		GM-CSF	1627±1397	1664±1332	1579±1069				ns	ns	
	IFN-γ	Placebo	42,8±130,0 (3)	32,3±87,1 (4)	63,2±116,0 (7)	ns	ns	ns	ns	ns	
		GM-CSF	32,8±123,6 (3)	29,5±128,4 (1)	50,2±189,2 (2)				ns	ns	

Tabelle 3.3: Zytokinkonzentration nach Stimulation *in vitro*: Es zeigen sich lediglich für IL-2 nach Stimulation mit PMA/Ionomycin ein signifikanter Anstieg von V1 zu V9. Für die mit GM-CSF behandelten Patienten findet sich keine signifikante Änderung der Zytokinproduktion im Studienverlauf. Nach Stimulation mit PMA/Ionomycin findet sich an V9 eine signifikant höhere IL2 und IFN-γ Konzentration in der Placebogruppe. Für die Stimulation mit ConcanavalinA fanden sich teilweise lediglich für einige wenige Patienten messbare Zytokinwerte. Für diese ist die Anzahl der Patienten in Klammern angegeben (n).

3.5.1 Stimulation mit Recall-Antigengemisch

Das eingesetzte Gemisch aus bakteriellen und viralen Antigenen führt zur Induktion einer T-Zell-vermittelten Immunantwort *ex vivo*. Bei einer Stimulation der erworbenen Immunantwort durch die im Rahmen der Studie applizierte Medikation ließe sich ein Anstieg der Zytokinkonzentrationen als Maß für deren Funktion vermuten. In beiden Patientengruppe finden sich keine signifikanten Änderungen der Zytokinproduktion nach Stimulation von V1 zu V9 (**Abbildung 3.11**). Im Vergleich der Patientengruppen miteinander zeigt sich im gesamten Studienverlauf kein signifikanter Unterschied.

3.5.2 Stimulation mit PMA/Ionomycin

PMA, ein Diacylglycerol-Analog aktiviert neben anderen Signalwegen v.a. Proteinkinase C (PKC). Durch eine durch Ionomycin geförderte Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen wird die Aktivierung von PKC potenziert, wodurch es über verschiedene intrazelluläre Signalwege zu einer Aktivierung von T-Zellen und gesteigerter Zytokinproduktion kommt. Die Kombination von PMA und Ionomycin führt *ex vivo* zu einer starken Aktivierung von T-Lymphozyten und resultiert bei intakter T-Zell Funktion in einer gesteigerten Zytokinproduktion. In der Verlaufsbeobachtung zeigen sich für Patienten der GM-CSF Gruppe keine signifikanten Unterschiede zu Beginn und bei Abschluss der Studie (**Abbildung 3.12**). Für die Placebogruppe zeigt sich lediglich für IL-2 eine Zunahme der Zytokinproduktion im Studienverlauf (von V1 zu V7). Im Vergleich der beiden Studienarme zeigt sich ein signifikanter Unterschied für IFN- γ und IL-2, mit Nachweis höherer Konzentrationen in der Placebogruppe an V9.

Ergebnisse

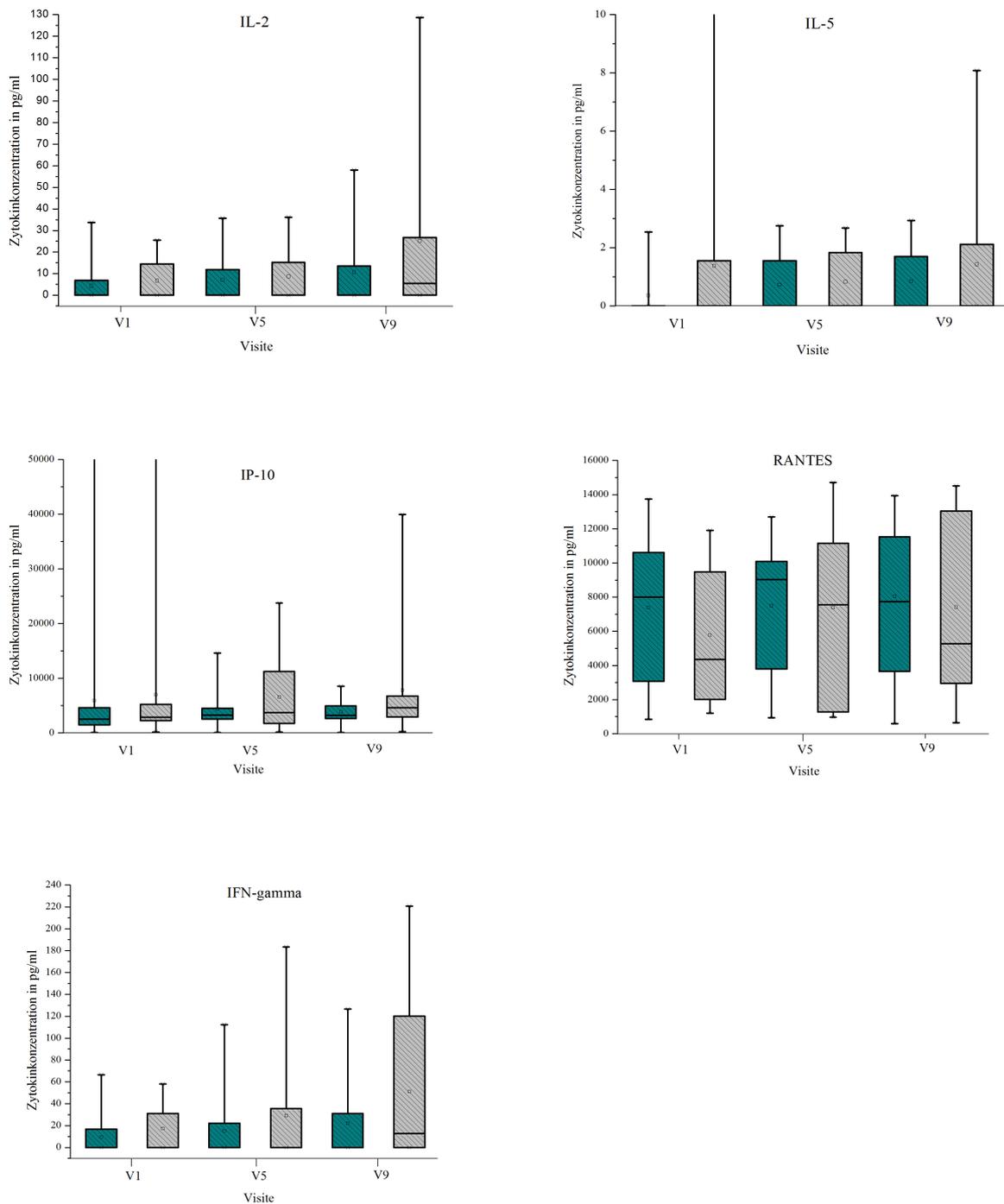


Abb. 3.11: Zytokinkonzentration nach Stimulation mit Recall Antigen-Gemisch, in pg/ml. Es sind keine signifikanten Änderungen nachweisbar, im Vergleich der beiden Studienarmen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. (■ GM-CSF, ■ Placebo)

Ergebnisse

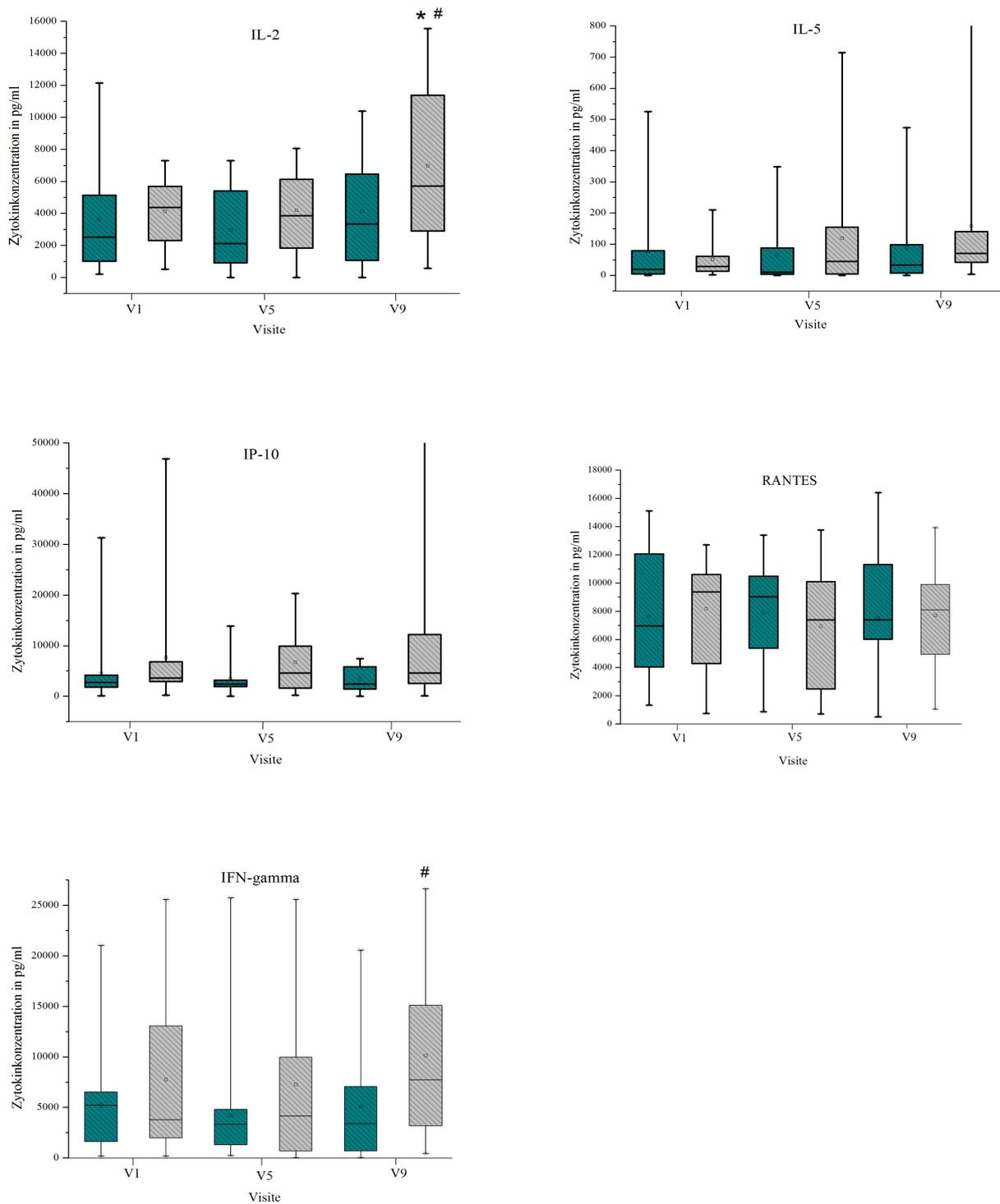


Abb. 3.12: Zytokinkonzentration nach Stimulation mit PMA/Ionomycin, in pg/ml. Es findet sich ein signifikanter Anstieg von IL-2 von V1 zu V9 in der Placebogruppe (*), $p < 0,05$, ansonsten ist keine signifikante Änderung innerhalb der Gruppen nachweisbar. Im Vergleich der Studienarme zieht sich eine signifikant höhere Konzentration von IL-2 und IFN- γ in der Placebogruppe an V9 (#), $p < 0,05$. (■ GM-CSF, ■ Placebo)

3.5.3 Stimulation mit Concanavalin A

Nach Stimulation mit ConcanavalinA (ConA) finden sich bei einer Vielzahl der Patienten keine messbaren Zytokinkonzentrationen im Überstand (**Tabelle 3.3**). Dies trifft insbesondere für die Zytokine IL-2, IL-5 und IFN- γ zu. Auf die detaillierte Analyse und graphische Darstellung wird daher aufgrund des Mangels an Daten verzichtet.

3.6 Effekt der immunstimulatorischen Therapie auf das Outcome

Um Aussagen über den klinischen Effekt der Therapie mit GM-CSF zu treffen, wurde unter anderem die Verweildauer auf der Intensivstation ab V0 als Maß für die Erholung der Patienten herangezogen. Die mittlere Verweildauer lag dabei in der Placebogruppe bei 53 Tagen. Für Patienten, die mit GM-CSF behandelt wurden, lag diese durchschnittlich bei 38,6 Tagen. Die Liegedauer auf Intensivstation betrug somit für die Patienten der Verumgruppe durchschnittlich ca. 2 Wochen weniger als für Studienteilnehmer der Placebogruppe. Im statistischen Vergleich ist diese sich abzeichnende Tendenz jedoch nicht signifikant.

Darüber hinaus wurde die Mortalität der Studienteilnehmer an V28 erfasst (**Tabelle 3.3**). Ein Patient unter GM-CSF Therapie verstarb an V8, im Rahmen der durchgeführten Obduktion wurde ein ursächlicher Zusammenhang mit der Teilnahme an der durchgeführten Studie ausgeschlossen. Der Tod wurde auf ein Fortschreiten der Grunderkrankung des Patienten zurückgeführt. Sechs weitere Patienten verstarben nach V9, nach Abschluss der Therapie mit GM-CSF oder Placebo. Es ergibt sich kein signifikanter Unterschied der Mortalität zwischen den beiden Patientengruppen.

	verstorben
Placebo	4/19
GM-CSF	3/19
Gesamt	7/38

Tab. 3.4: Vergleich der 28-Tage-Mortalität der Patientengruppen. Im Placeboarm waren 21% der Patienten verstorben (alle nach V9), in der Gruppe unter GM-CSF Therapie 16% (ein Patient an V8, zwei nach V9). Es findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Studienarmen hinsichtlich der 28 Tage Mortalität ($p=0,69$).

3.7 Verträglichkeit der Studienmedikation und unerwünschte Wirkungen

Bei einer Patientin der Placebogruppe trat an V3 eine akute Insuffizienz des linken Ventrikels auf, die medikamentös behandelt werden musste. Die Teilnahme an der Studie wurde zu diesem Zeitpunkt abgebrochen. Ein SAE-Bericht wurde erstellt und sowohl an die zuständige Ethikkommission als auch an das Safety Monitoring Board gesandt. Als SAE im Rahmen der Studie war jedes medizinische Ereignis definiert, das Dosis-unabhängig entweder zum Tode führt, lebensbedrohlich ist, eine verlängerte stationäre Behandlung des Studienteilnehmers nötig macht oder zu bleibenden oder signifikanten Schäden oder Behinderungen führt. Nach Entblindung zeigte sich, dass die Patientin Placebo erhalten hatte.

Ein Patient, der mit GM-CSF behandelt wurde, verstarb an V8. Die durchgeführte Sektion ergab ein Fortschreiten der Grunderkrankung als Todesursache. Ein ursächlicher Zusammenhang zwischen SAE und der Gabe der Studienmedikation wurde ausgeschlossen.

Bei den weiteren Studienteilnehmern zeigte sich eine sehr gute Verträglichkeit der Medikation ohne Auftreten von AE oder SAE.

4 Diskussion

Trotz besseren Verständnisses des komplexen Zusammenspiels unterschiedlicher Immunzellen bei der Bekämpfung von Sepsis und septischem Schock liegt die Mortalitätsrate betroffener Patienten noch immer bei bis zu 40% (siehe Abschnitt 1.1). Neben Verbesserung der kausalen Therapie und verbesserten stabilisierenden Therapiemaßnahmen, ist insbesondere die Untersuchung neuer immunologischer Therapiemöglichkeiten in den vergangenen Jahr(zehnt)en immer mehr in den Fokus gerückt.

Der in der hier präsentierten Studie gewählte Therapieansatz zielt dabei auf die Umkehrung der Sepsis-induzierten Immunparalyse, einer schwere andauernde Beeinträchtigung der Immunkompetenz ab. Diese begünstigt das Auftreten von Sekundärinfektionen und trägt damit wesentlich zur hohen Mortalitätsrate der Sepsis bei. In Pilotstudien zur immunstimulatorischen Therapie für Sepsispatienten mit Immunparalyse konnte bereits gezeigt werden, dass diese in der Lage sind, einzelne immunologische Parameter zu verbessern. Zum sicheren Nachweis einer reduzierten Mortalität waren diese aufgrund der niedrigen Patientenzahlen nicht geeignet.^[21,45,51,52]

Aufbauend darauf untersucht die vorliegende Studie den Effekt einer adjuvanten Behandlung von intensivmedizinischen Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock mit Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF). Dabei wurden insgesamt 38 Patienten (1:1 auf Verumgruppe und Placebogruppe verteilt) im Rahmen der randomisierten doppelblinden Immunmonitoring-basierten Studie behandelt. Wie in der Primärhypothese postuliert, zeigt sich in der Verumgruppe nach Beginn der Therapie ein rascher signifikanter Anstieg der monozytären HLA-DR Konzentration, die als Marker für die Beurteilung der Immunfunktion herangezogen wurde.

Darüber hinaus kam es zu einer Wiederherstellung der monozytären Zytokinproduktion nach *ex vivo* Stimulation. Auch für die Liegedauer auf Intensivstation und die Beatmungsdauer ließ sich eine Reduktion für die Verumgruppe nachweisen (publiziert in Meisel et al. 2009).^[50] Hierbei sei jedoch auf die geringe Patientenzahl hingewiesen.

Die vorliegende Dissertationschrift stellt die Ergebnisse einer Substudie dar, die die Auswirkungen der Therapie auf T-Lymphozyten untersucht. Die Sekundärhypothese postuliert eine Auswirkung der monozytären Veränderungen auf das erworbene Immunsystem, welche durch Bestimmung von T-Lymphozyten-Populationen und Zytokinmessungen nach Stimulation *ex vivo* erfasst wird.

Diskussion

Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Gesamtzahl der T-Lymphozyten sowie der CD4+ T Helferzellen und CD8+ zytotoxischen T-Zellen in der mit GM-CSF behandelten Patientengruppe. Für die ebenfalls untersuchten Subgruppen der regulatorischen T-Zellen und die untersuchten Differenzierungsstufen der T-Zellen sowie verschiedene Oberflächenmarker fällt dieser Effekt größtenteils nicht signifikant aus. Auch in Bezug auf die T-Zellfunktion, gemessen an deren Zytokinproduktion nach Stimulation *ex vivo* findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen und im Studienverlauf. Teilweise lagen die gemessenen Zytokinkonzentrationen auch so niedrig, dass sich keine Aussagen zum Effekt der Behandlung treffen lassen.

Die im Rahmen der Studie durchgeführten Untersuchungen der monozytären HLA-DR Expression sowie von Zellzahlen und Zytokinen, die sich dem angeborenen Immunsystem zuordnen lassen, sind, zusammen mit der Erhebung verschiedener klinischer Parameter wie z.B. intensivmedizinische Scores und Beatmungsdauer, bereits veröffentlicht worden (Meisel et al. 2009)^[50] und werden hier daher nur kurz umrissen.

4.1 Einsatz von GM-CSF in der Behandlung von Sepsispatienten

Sowohl Patienten nach akzidentellem Trauma, großen operativen Eingriffen, als auch mit Verbrennungen sind einem deutlich erhöhten Risiko für die Entwicklung septischer Komplikationen (Sekundärinfektionen, Organversagen) ausgesetzt.^[53] Es findet sich auch in diesen Patienten eine deutliche Beeinträchtigung der zellvermittelten Immunität. In diesem Zusammenhang konnte im Mausmodell nach Trauma ein protektiver Effekt nach intraperitonealer Gabe von GM-CSF nachgewiesen werden. Die Sterblichkeitsrate in unbehandelten Mäusen, die eine Sepsis entwickelten, lag in dieser Studie bei 95%. In der mit GM-CSF behandelten Gruppe sank die Gesamtsterblichkeit auf 60%.

In der hier präsentierten Studie wurde GM-CSF als immunstimulatorische Therapie bei Nachweis einer Immunparalyse, also einer schwerwiegenden globalen Beeinträchtigung des Immunsystems in Sepsispatienten eingesetzt. Die erwähnte Arbeit postuliert hingegen die Möglichkeit des prophylaktischen Einsatzes bereits vor Auftreten septischer Komplikationen nach größeren Traumata zur Wiederherstellung der Zellvermittelten Immunität.^[53]

Diskussion

Ähnliche Ergebnisse fanden sich auch in Intensivpatienten nach großen Operationen.^[80] Diese wurden bei Nachweis einer Immunsuppression postoperativ, gemessen an monozytärer HLA-DR Expression, mit GM-CSF oder Influenza-Impfung oder Placebo behandelt. In der GM-CSF behandelten Gruppe kam es zu einem raschen Anstieg der monozytären HLA-DR Expression und einer verringerten Infektionsdauer gegenüber beiden anderen Patientengruppen.

Auch in anderen Patientengruppen sind aussichtsreiche Studien zum Einsatz von GM-CSF, zum Teil in Kombination mit anderen Therapeutika, durchgeführt wurden. Auch wenn bisher ein Nachweis zur Reduktion der Mortalität nicht erbracht werden konnten, konnte beispielsweise bereits eine raschere Erholung der mit GM-CSF behandelten Patienten von ihrer Infektion nachgewiesen werden.^[54] Auch für unsere Patienten zeichnet sich eine raschere Erholung der mit GM-CSF behandelten Patienten, gemessen an einer kürzeren Verweildauer auf der Intensivstation und im Krankenhaus ab. Diese waren jedoch nicht signifikant, wobei auf die geringe Fallzahl zum Ende des Beobachtungszeitraums an V28 hinzuweisen ist (7 Patienten GM-CSF-, 6 Patienten Placebogruppe).

Für Sepsispatienten mit dem Vorliegen einer respiratorischen Dysfunktion^[51] konnte eine niedrig dosierte Gabe von GM-CSF (3 µg/kg KG für 5 Tage) die Oxygenierung in der Behandlungsgruppe signifikant verbessern. Darüber hinaus zeigte sich eine Reduktion des Auftretens eines ARDS (*acute respiratory distress syndrome*), die zugrundeliegenden Mechanismen sind dabei noch nicht abschließend geklärt. Auch für unsere Patienten wurden Analysen in Bezug auf Oxygenierung und Respirator-Verweildauer durchgeführt. Es zeigt sich eine signifikant kürzere Beatmungsdauer in der Verumgruppe.^[50] Für eine weitere Patientengruppe, mit nicht-traumatischer abdomineller Sepsis^[55] konnte in der Behandlungsgruppe (GM-CSF 3 µg/kg KG für 4 Tage) eine Verringerung der Zeit bis zur klinischen Erholung, der Verweildauer auf der Intensivstation, sowie der Dauer der Antibiose sowie ein geringeres Auftreten von infektiösen Komplikationen nachgewiesen werden. Es zeigte sich jedoch kein Einfluss auf die Mortalitätsrate.

Und nicht zuletzt ist GM-CSF auch als unterstützende Therapie in Neugeborenen mit Sepsis und Neutropenie untersucht worden. In einer 2001 veröffentlichten Studie mit 60 Patienten (1:1 auf GM-CSF und Placeboarm verteilt) erfolgte die Behandlung mit GM-CSF an 7 konsekutiven Tagen mit 5 µg/kg KG. In der Verumgruppe ließ sich eine kürzere Hospitalisierungsdauer sowie eine Reduktion der Mortalität nachweisen. GM-CSF wurde auch in dieser Patientengruppe gut toleriert, es wurden keine SAEs rapportiert.^[56]

Diskussion

In einer Cochrane-Review wurde der Einsatz von koloniestimulierenden Faktoren, sowohl G-CSF, als auch GM-CSF zur Behandlung (sieben Studien) oder Prophylaxe (drei Studien) von neonatalen Infektionen beleuchtet. Beim prophylaktischen Einsatz der Kolonie-stimulierenden Faktoren fand sich kein Einfluss auf die Mortalität. In Studien allerdings, bei denen CSF zur Behandlung von Infektionen eingesetzt wurden, zeigte sich in der Patientengruppe mit zuvor nachgewiesener Neutropenie eine verringerte Mortalität nach 2 Wochen. Allerdings ist auf die geringen Fallzahlen der hier herangezogenen Studien hinzuweisen. Eine offizielle Therapieempfehlung zur Anwendung bei Neugeborenen wurde daher nicht ausgesprochen. Allerdings wurden ausdrücklich größer angelegte Studien zur Untersuchung dieser Therapieoption angeregt. In allen inkludierten Studien wurde die Behandlung gut toleriert.^[57]

Die vorliegende Studie stellt nach Wissen der Autorin die erste prospektive, randomisierte Placebo-kontrollierte, doppelblinde klinische Studie dar, die sich auf den Ansatz der Immunparalyse bei Einschluss der Patienten konzentriert. Sowohl der Effekt auf das angeborene, als auch das erworbene Immunsystem stellten Gegenstand der Untersuchung dar. Die Ergebnisse sind in Teilen bereits veröffentlicht,^[50] die vorliegende Arbeit gibt die Ergebnisse einer Substudie zum Effekt der GM-CSF Behandlung auf T-Lymphozyten wieder. Gerade zur Einwirkung immunstimulatorischer Therapien auf das adaptive Immunsystem liegt bisher deutlich weniger Studienmaterial vor.

4.2 Hochregulierung von HLA-DR durch GM-CSF

Die späte Phase der Sepsis ist häufig durch eine Immunsuppression charakterisiert, die sich sowohl auf Seiten des angeborenen, als auch erworbenen Immunsystems bemerkbar macht. Von der hiesigen Arbeitsgruppe ist für den Zustand der globalen, persistierenden Schwäche des Immunsystems der Begriff der „Immunparalyse“ vorgeschlagen worden.^[58]

Zur Identifizierung der Patienten mit Immunparalyse wurde in der durchgeführten Studie die HLA-DR Expression auf Monozyten im peripheren Blut untersucht. Der Einschluss erfolgte ab einem Wert von <8000 Molekülen/Zelle an zwei aufeinander folgenden Tagen. Bereits ab dem ersten Tag nach Beginn der Therapie mit GM-CSF 4 µg/kg KG fand sich in der durchgeführten Studie ein deutlicher Anstieg der HLA-DR Expression auf Monozyten. Die Werte stiegen rasch auf ein weit im Normbereich liegendes Niveau, während ein entsprechender Anstieg in der Gruppe unter Placebo ausblieb. Lediglich bei zwei Patienten der GM-CSF Gruppe blieb ein Anstieg über die untere

Diskussion

Normwertgrenze von 15000 Moleküle/Zelle innerhalb der ersten fünf Behandlungstage aus. Für diese beiden Patienten erfolgte eine Dosisescalation auf GM-CSF 8µg/kg KG, nach der sich die monozytäre HLA-DR Expression normalisierte.

Dies könnte auf einen ca. 10%igen Anteil an Patienten (2/19 Patienten) hindeuten, die bei der gewählten Dosis von 4 µg/kg KG GM-CSF pro Tag als Non-Responder zu werten sind. Die beiden Patienten zeigten einen raschen Anstieg der monozytären HLA-DR Expression nach Dosisescalation. Die gewählte Dosis lag dabei etwas höher als in den oben erwähnten Studien zum Einsatz in Sepsispatienten,^[51,54-57] jedoch geringfügig unter der Empfehlung des Herstellers (6,25 µg/kg KG/d).^[49] Dabei ist zu berücksichtigen ist, dass diese für andere Indikationen/Patientengruppen angegeben wurden.

In der Placebogruppe zeigte sich bei einem Großteil der Patienten (17/19) auch bei Abschluss der Studie kein Anstieg über die untere Normwertgrenze von 15.000 Molekülen/Zelle.

4.2.1 HLA-DR zur Überwachung der Immunkompetenz

HLA-DR Moleküle werden auf der Zelloberfläche von u.a. Antigen-präsentierenden Zellen (insbesondere auf Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen) exprimiert. Durch ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation und der dadurch hervorgerufenen Aktivierung von T-Zellen stellen sie ein essenzielles Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar. Eine verminderte monozytäre HLA-DR Expression korreliert dabei mit einer herabgesetzten Fähigkeit zur Antigenpräsentation und verminderter Zytokinsekretion und eignet sich daher gut als Marker für Monozytenfunktion.^[58] Eine stark reduzierte HLA-DR Expression bei Patienten mit dem Krankheitsbild einer Sepsis ist bereits mehrfach beschrieben worden.^[3,40,59] Auch eine Assoziation von persistierend niedriger monozytärer HLA-DR Expression mit einer signifikant erhöhten Mortalitätsrate konnte gezeigt werden.^[60] Neben einer diagnostischen Bedeutung zur Erfassung von für die immunstimulatorische Behandlung geeigneten Patienten lässt sich der monozytären HLA-DR Expression also auch ein prognostischer Wert zuschreiben. Einen, nach dem Immunstatus der Patienten gesteuerten, Behandlungsansatz für immunstimulatorische Therapien bei der Sepsis ließen die meisten vorherigen Arbeiten auf diesem Gebiet vermissen.^[61] In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie konnte für Sepsispatienten mit nachgewiesener Immunparalyse nach Behandlung mit 5 µg/kg KG rhGM-CSF für drei Tage^[45] ein signifikanter Anstieg der monozytären HLA-DR Expression gezeigt werden. Darüber hinaus kam es zu einer

Diskussion

Erholung der Monozytenfunktion, gemessen an einer gesteigerten TNF- α Produktion nach *ex vivo* Stimulation mit LPS.

Ein Vorteil eines HLA-DR basierten Monitorings der Immunkompetenz besteht darin, dass von der hiesigen Arbeitsgruppe vor einigen Jahren ein standardisiertes Verfahren zu dessen Bestimmung entwickelt wurde,^[62] das einen verlässlichen Vergleich der Ergebnisse verschiedener Zentren zulässt. Im Hinblick auf mögliche zukünftige Multizenterstudien zur weiteren Erforschung immunmodulierender Therapien bei Sepsis könnte dies ein entscheidender Vorteil sein. Darüber hinaus sind alternative Verfahren in Entwicklung, die nicht auf Durchflusszytometrie basieren, und die Zugänglichkeit einer Analysemethode verbessern sollen. Insbesondere die HLA-DR Bestimmung mittels *quantitative reverse transcription polymerase chain reaction* (qRT-PCR)^[63] könnte Untersuchungen zukünftig nahezu rund um die Uhr und auch in kleineren Kliniken ermöglichen. Im Gegensatz zur durchflusszytometrischen Messung, die ausschliesslich monozytäre HLA-DR Expression erfasst, wird bei diesem Verfahren jedoch auch HLA-DR auf anderen Leukozyten-Subpopulationen (s.o.) nachgewiesen, was den Einsatz derzeit noch begrenzt, da nicht ausreichend Erkenntnisse vorliegen, ob diese damit in gleichem Maße zum Monitoring der Immunfunktion eingesetzt werden kann.

4.3 Entwicklung der T-Lymphozyten nach Therapie mit GM-CSF

4.3.1. Einfluss auf die Apoptoserate von T-Lymphozyten

Bisher konzentrierte sich die Forschung zu immunstimulatorischen Therapien bei Sepsis vordergründig auf Effekte im Bereich des angeborenen Immunsystems. Ein wesentlicher Grund hierfür scheint der bisher angenommene Zeitrahmen zu sein, in dem angeborenes und erworbenes Immunsystem eingreifen und wirken. Während die klassische APC-abhängige Aktivierung und klonale Expansion der im Blut vorherrschenden $\alpha\beta$ T-Lymphozyten mehrere Tage benötigt, können andere T-Zell-Subpopulationen, wie beispielsweise Natürliche Killerzellen und $\gamma\delta$ T-Zellen direkt durch eine Vielzahl von mikrobiellen Liganden und/oder Zytokine aktiviert werden. Innerhalb von Stunden können so Zytokine, zytolytische Moleküle und Wachstumsfaktoren ausgeschüttet werden, die zur Eindämmung einer Infektion beitragen.^[64] Im Mausmodell der Sepsis konnte gezeigt werden, dass ein Großteil des apoptotischen Zelluntergangs von Lymphozyten bereits innerhalb von 24 Stunden nach Einsetzen der Sepsis eintritt.^[65] Dies legt eine frühzeitigere Beteiligung des

Diskussion

adaptiven Immunsystems als bisher angenommen nahe und sollte die genauere Untersuchung von Pathomechanismen und verschiedenen Zellpopulationen sowie deren Funktion im Verlauf nach Stimulation rechtfertigen.

Ein wichtiger Mechanismus in Sepsispatienten ist das Auftreten von Apoptose in der Mehrzahl der Lymphozytenpopulationen. Es konnte eine positive Korrelation zwischen der Apoptoserate zirkulierender Lymphozyten und dem Schweregrad der Sepsis gezeigt werden.^[66] T-Zell Apoptose ihrerseits beeinflusst das angeborene Immunsystem durch direkte und indirekte Wirkung auf Makrophagen und neutrophile Granulozyten. In Abhängigkeit vom Schweregrad der Sepsis und Apoptoserate sind dabei verschiedene Effekte möglich.^[65] Bei niedriger Apoptoserate führt die Phagozytose der T-Lymphozyten durch Makrophagen zu einem Anstieg der TNF- α und IL-12 Produktion sowie zur Hochregulierung von MHC-II Molekülen, was zu einer weiteren Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, vermehrter Inflammation und Eliminierung des Erregers beiträgt. Bei sehr hoher Apoptoserate hingegen zieht sich ein gegensätzlicher Effekt mit verminderter Produktion proinflammatorischer Zytokine sowie Sekretion von TGF- β und IL-10, was zu einer Antiinflammation beiträgt. Dadurch wird die Fähigkeit zur Eindämmung bakterieller Infektionen verringert, was zu einem schlechteren Outcome führen kann. Immunstimulatorische Therapien mit dem Ziel der Verhinderung von T-Lymphozyten Apoptose könnten somit in der Lage sein, die Immunantwort und somit das Outcome von Sepsispatienten zu verbessern. Im Tiermodell konnte bereits eine reduzierte Mortalitätsrate nach Einsatz von Caspaseinhibitoren zur Verhinderung von Apoptose in Lymphozyten nachgewiesen werden.^[66,67]

Die Apoptoserate variiert jedoch stark abhängig vom T-Zell Subtyp. Regulatorische T-Zellen (Treg) scheinen nahezu resistent zu sein. Im Mausmodell der Sepsis konnte beispielsweise ein Ansteigen des relativen Anteils der Tregs an CD4⁺Lymphozyten von 5-10% auf über 30 % gezeigt werden.^[65] Die zugrundeliegenden Mechanismen sind hierbei noch nicht vollständig verstanden. Sicher scheint eine Involvierung sowohl intrinsischer, als auch extrinsischer Signalwege zur Apoptosevermittlung, was mehrere mögliche Angriffspunkte für künftige Behandlungen zulässt.

4.3.2 Einfluss von GM-CSF auf verschiedene T-Zell Populationen

In der vorliegenden Studie wurde ein Therapieansatz gewählt, der primär auf der Stimulation von Zellen des angeborenen Immunsystems beruht. Das eingesetzte rekombinante humane GM-CSF fördert die Expansion und Ausreifung hämatopoetischer Vorläuferzellen. Es regt die Teilung und

Diskussion

Differenzierung entlang der Granulozyten-Makrophagen Achse des angeborenen Immunsystems an, die neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und myeloide dendritische Zellen umfasst. Darüber hinaus ist GM-CSF in der Lage, ausgereifte Granulozyten und Makrophagen zu aktivieren.

^[49] Eine direkte Wirkung auf T-Lymphozyten findet sich jedoch aufgrund der fehlenden Rezeptorexpression nicht. Mit verbesserter Antigenpräsentation und Zytokinsekretion durch Zellen der angeborenen Immunantwort als Voraussetzung einer T-Lymphozytenaktivierung lässt sich jedoch, zur wirkungsvolleren Elimination der Infektion, eine sekundäre Zunahme der Zellzahl und -funktion auch von Lymphozyten postulieren. Es erfolgte daher, im Gegensatz zu den meisten bisher veröffentlichten immunstimulatorischen Studien bei Sepsispatienten, auch die Untersuchung von T-Zellpopulationen und deren Funktion.

So zeigt sich im Behandlungsverlauf ein deutlicher Anstieg der Gesamtzahl der T-Lymphozyten im Differentialblutbild der Patienten der GM-CSF Gruppe, während deren Zahl in der Placebogruppe nahezu konstant bleibt. Die Zahl der T-Lymphozyten liegt in der GM-CSF Gruppe zu den Visiten V5, V6, V8 und V9 signifikant höher als in der Placebogruppe und erreicht lediglich in der Verumgruppe am neunten Beobachtungstag Werte innerhalb des physiologischen Bereiches. Auch für CD4⁺ T-Helferzellen konnte eine signifikante Zunahme der absoluten Zellzahl im Differentialblutbild bei den Patienten der Verumgruppe gemessen werden. Dieser erreicht an den letzten Untersuchungstagen niedrig physiologische Werte. In der Placebogruppe findet sich ein deutlich geringerer Anstieg, und ihre Zahl verbleibt auch zum Ende des Beobachtungszeitraumes unter dem Normwertbereich. Im Bereich der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen konnte ein geringerer Anstieg für beide Studienarme nachgewiesen werden, im Verlauf findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen ab V4 (mit Ausnahme von V7), zugunsten der mit GM-CSF behandelten Patienten.

Untersucht wurden auch regulatorische T-Zellen (Treg), denen im Rahmen einer Sepsis eine wichtige Rolle in der Eindämmung der Immunantwort zugeordnet wird. Für beide Behandlungsgruppen fand sich in unserer Studie ein leichter, nicht signifikanter Abfall des prozentualen Anteils von Tregs an der Gesamtzahl der CD4⁺ Lymphozyten. Im Vergleich zur Placebogruppe zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Dies steht im Gegensatz zu einer vorangegangenen Arbeit,^[68] die im Verlauf der Sepsis eine Zunahme des Anteils von Treg zeigen konnte. Dies scheint auf einer gewissen Resistenz der regulatorischen Zellpopulation gegenüber apoptotischen Signalen zu bestehen, was zu einem relativen Anstieg der regulatorischen T-Zellen an der Gesamtpopulation der CD4⁺ Zellen führt. Ein

Diskussion

Anstieg der regulatorischen T Zellen liess sich sowohl bei Sepsispatienten, sowie auch im Mausmodell nachweisen. Eine gleichzeitig nachgewiesene Anergie im Bereich anderer T-Zell Subklassen wurde auf deren gesteigerten Einfluss zurückgeführt. Auch eine mögliche Induktion von Treg durch TNF- α und IL-2 konnte im Mausmodell gezeigt werden.^[69]

Zu bemerken sind dabei Unterschiede in der Identifikation von Tregs. Diese wurden anhand der Expression von CD4+, CD25+, CD127- und *forkhead box P3* (FoxP3) charakterisiert, während unsere Studie CD4+, CD25++ und CD62L+ zur Bestimmung heranzieht. CD4+CD25+ Expression findet sich jedoch auch in aktivierten T Effektor-Zellen, und auch wenn die verwendete Gating-Strategie in Bezug auf regulatorische T-Zellen nach wie vor überwiegend akzeptiert ist, scheint eine Überprüfung der Methodik für eventuelle zukünftige Studien angebracht.

4.3.3 Einfluss auf die T-Lymphozyten Funktion

Trotz eines Anstiegs der Gesamtzahl von CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten unter GM-CSF Therapie und darüber hinaus fehlenden Anstiegs des prozentualen Anteils von regulatorischen T-Zellen fanden sich in der durchgeführten Studie niedrige lymphozytäre Zytokinwerte, die trotz andauernder immunstimulatorischer Behandlung keinen signifikanten Anstieg erfuhren. Dies ist mit einer persistierenden Anergie der T-Lymphozyten für die Dauer der Studie vereinbar. Eine hochgradig verminderte Fähigkeit der erschöpften T-Lymphozyten zur Zytokinproduktion nach *in vitro* Stimulation konnte auch von anderen Arbeitsgruppen bereits gezeigt werden.^[28,70] Von derselben Arbeitsgruppe^[28] wurden auch Oberflächenrezeptoren untersucht (u.a. CD69, *cytotoxic T lymphocyte antigen-4* (CTLA-4) und PD-1), die mit einer Erschöpfung der Lymphozyten vereinbar sind. Eine Verbesserung der Immunzellfunktion von Sepsispatienten durch Blockade von PD-1 und dessen Liganden *in vitro* konnte bereits gezeigt werden und stimmt mit Resultaten aus vorhergehenden Versuchen im Mausmodell überein.^[70] Eine Blockade des Rezeptors, möglicherweise auch ergänzend zu anderen immunstimulatorischen Therapien könnte in der Lage sein, die Lymphozytenfunktion zu verbessern und somit zu einem Anstieg der Zytokinproduktion führen. Erste Studien in Sepsispatienten konnten bereits eine Verbesserung der Lymphozytenfunktion, gemessen an einer Zunahme der IFN- γ -Produktion zeigen. In Patienten mit fehlendem Anstieg der IFN- γ Produktion zeigte sich ein Trend zu einer erhöhten Mortalität.^[44]

Diskussion

Eine Zunahme der Lymphozytenfunktion, wie sie bei einer immunstimulatorischen Therapie zu erwarten wäre, setzt eine Aktivierung und Proliferation von Lymphozytenpopulationen voraus. Die in der Studie verwendete Stimulation mit Recall-Antigenen, die das Eindringen pathogener Keime in einen Organismus relativ physiologisch imitiert, setzt ebenfalls ein Zusammenspiel von PBMCs und T-Zellen voraus. Eben diese Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Interaktion zwischen Zellen der angeborenen und erworbenen Immunantwort ist jedoch im Rahmen einer Sepsis beeinträchtigt. In einer Vergleichsstudie zwischen kritisch kranken Patienten mit und ohne Infektion^[71] konnte sehr gut das Fehlen co-stimulatorischer Moleküle wie CD86, CD28 und HLA-DR in Patienten mit schweren Infektionen gezeigt werden. Insbesondere für naive Zelllinien spielen diese eine entscheidende Rolle und werden zwingend für eine gezielte Interaktion zur Infektabwehr benötigt. In der vorliegenden Studie wurde CD28 als co-stimulatorisches Molekül verfolgt. Es findet sich ein geringfügiger, nicht signifikanter Anstieg in der GM-CSF Gruppe, möglicherweise ein Hinweis auf einen ersten Schritt zur Normalisierung der Interaktionsfähigkeit. Ein Grund für den fehlenden Anstieg der Zytokinkonzentrationen könnte daher eine fehlende Interaktion zwischen T-Lymphozyten und APCs sein, beispielsweise aufgrund fehlender Expression co-stimulatorischer Signale.

Eine Verbesserung der Lymphozytenproliferation sowie -Aktivierung zeigt sich beispielsweise bei Einsatz von IL-7, das im Gegensatz zu GM-CSF direkt auf T-Lymphozyten einwirkt. In einer ersten Studie^[20] in Sepsispatienten mit ausgeprägter Lymphozytopenie konnte bereits gezeigt werden, dass IL-7 die Lymphozytenzahl dauerhaft anhebt ohne einen Zytokinsturm auszulösen oder zum Organversagen beizutragen.

Die geringste Zytokinproduktion nach Stimulation *ex vivo* fand sich in der vorliegenden Studie nach Stimulation mit Concanavalin A. Tatsächlich lag diese bei so geringen Werten, dass sich viele der untersuchten Zytokine bei einer Mehrzahl der Patienten überhaupt nicht nachweisen ließen. Auch Concanavalin A benötigt für eine optimale Funktion eine intakte Monozytenfunktion und ist abhängig von einer Kreuzvernetzung von Oberflächenmolekülen auf T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen (wie z.B. CD2). Ein fehlender Anstieg der Zytokinproduktion nach Stimulation mit ConA lässt sich möglicherweise durch ein Fehlen dieser Vernetzung erklären. Eine Untersuchung von beispielsweise CD2 in Folgestudien könnte diesen Umstand näher beleuchten. Eine optimale Wirkung von ConA *in vitro* scheint zudem vom stochastischen Verhältnis zwischen Monozyten und Lymphozyten beeinflusst zu sein. Die optimale Stimulation der Zytokinsyntheserate in Lymphozyten *ex vivo* konnte bei einem Verhältnis von 10 Monozyten: 1

Diskussion

Lymphozyten nachgewiesen werden.^[81] Unterschiede in der Präparation der Zellen hätten somit einen entscheidenden Effekt auf die Messung der Zytokinkonzentration. Einheitliche Protokolle vor Durchführung weiterer Studien, insbesondere große Multizenterstudien sind daher zwingend erforderlich.

Insbesondere in Bezug auf den mangelnden Nachweis eines Anstiegs der Zytokinproduktion nach *in vitro* Stimulation im Studienverlauf muss eventuell auch der gewählte Zeitrahmen sowohl für die Einleitung einer Therapie, als auch hinsichtlich der Nachbeobachtung der Patienten kritisch betrachtet werden. Die vorliegende Studie stützt sich auf das zum Zeitpunkt des Einschlusses der Patienten akzeptierte Modell einer verzögerten antiinflammatorischen Immunantwort im Rahmen einer Sepsis (SIRS/CARS Modell). Im Rahmen anderer Arbeiten konnte ein starkes Zytokin-Ungleichgewicht, mit einem Nebeneinander von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen bereits zu Beginn einer Sepsis nachgewiesen werden.^[72,73] Ein Zustand der persistierenden Inflammation neben einer gleichzeitig existierenden Immunsuppression, kurz PICS (*persistent inflammation, immunosuppression, and catabolism syndrome*) stellt das zur Durchführung der klinischen Studie geltende Zeitfenster für den Einsatz von immunstimulatorischen Therapieansätzen bei Sepsispatienten in Frage (**Abbildung 4.1**).

Diskussion

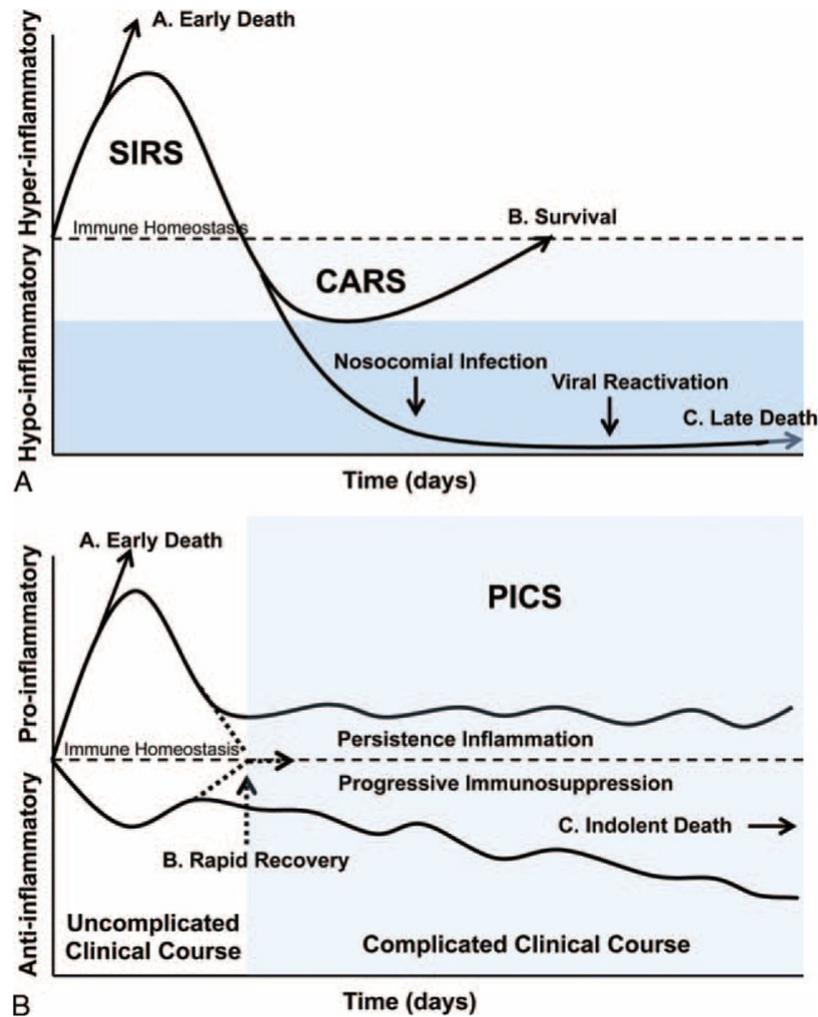


Abb. 4.1: Vom SIRS/CARS Modell zum PICS Modell der inflammatorischen Immunantwort im Rahmen einer Sepsis. Aus Mathias et al.^[73]

Das Vorhandensein immunsuppressiver Prozesse bereits am Anfang einer Sepsis rechtfertigt somit möglicherweise den Einsatz von GM-CSF zu einem viel früheren als dem in der vorliegenden Studie gewählten Zeitpunkt. Die Wirkungsweise von GM-CSF ist komplex und GM-CSF hat neben immunstimulatorischen auch antiinflammatorische Eigenschaften. Im Tiermodell erfolgten Versuche zum prophylaktischen Einsatz, bei Nachweis einer Immunsuppression, aber vor Auftreten einer Sepsis, teils mit vielversprechenden Resultaten.^[53] So sank die Mortalität in der mit GM-CSF behandelten Gruppe signifikant im Vergleich zur Placebogruppe. Inflammatorische Prozesse in Patienten mit Sepsis und SIRS finden sich überwiegend lokal im infizierten Gewebe, während sich im Blut gleichzeitig antiinflammatorische Prozesse mit Nachweis entsprechender Zelllinien und Zytokine finden. Die Rekrutierung von Immunzellen an den Ort der Infektion führt zu einer Eliminierung dieser Zellen aus der Blutzirkulation. Hierin könnte eine wichtige Ursache für die

Diskussion

reduzierte Fähigkeit zur Zytokinproduktion bei Untersuchung von Zellen aus dem Vollblut liegen, wie sie auch in der vorliegenden Studie gefunden wurde. Bei Untersuchung von Zellen aus dem infizierten Gewebe ließ sich wie zu erwarten eine vermehrte Zytokinproduktion nachweisen, während diese bei Untersuchung von Proben aus dem Vollblut, und teilweise sogar aus dem unmittelbaren Nachbargewebe (z.B. Lunge mit Pneumonie vs gesunde Lunge der Gegenseite) ausblieb oder verringert war.^[74]

Diese und andere Arbeitsgruppen untersuchten auch die Zytokinproduktion in Abhängigkeit von der verwendeten Stimulation *ex vivo*, wobei bedeutende Unterschiede in der resultierenden Zytokinproduktion nachgewiesen wurden.^[74,75] Dies lässt vermuten, dass nicht alle Signalwege in gleichem Maße in Sepsispatienten beeinträchtigt werden. Eine Optimalisierung und Standardisierung der verwendeten Untersuchungsmethoden scheint angebracht.

5 Konklusion und Ausblick

Die durchgeführte Studie zeigt die Effekte einer immunstimulatorischen Therapie auf T-Lymphozyten unter Monitoring von HLA-DR als Marker des Immunstatus von Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock. Nach Gabe von GM-CSF kommt es zu einer raschen und persistierenden Normalisierung der monozytären HLA-DR Expression. Es kommt zu einem Anstieg mit Normalisierung der Gesamtzahl der T-Lymphozyten sowie der CD4+ T Helferzellen und CD8+ zytotoxischen T-Zellen. Es findet sich ein gleichbleibender Anteil von regulatorischen T-Zellen und RTEs. Die Analyse der Funktion der untersuchten T-Zelllinien zeigt jedoch eine persistierende Anergie, gemessen durch Zytokinbestimmung nach Stimualtion *ex vivo*.

Für das in dieser Studie therapeutisch eingesetzte GM-CSF konnte zwar bisher keine verminderte Mortalität nachgewiesen werden, einzelne Studien zeigen jedoch eine bessere Erholung von Infektionen. Eine bei längerfristiger Betrachtung größerer Patientenzahlen reduzierte Mortalität aufgrund besserer Erholung von Infektionen erscheint zumindest plausibel und sollte weiter untersucht werden. Die Behandlung wurde in allen bisher durchgeführten Studien, unter anderem auch von Neugeborenen, gut toleriert.^[21,42,43,45,51,52,54,57,73]

Trotz des bisher fehlenden eindeutigen Nachweises sinkender Mortalität wirkt das Interesse an immunmodulatorischen Therapien bei Sepsispatienten ungebrochen. Einigkeit besteht darüber, dass weitere Untersuchungen im Rahmen einer Multizenterstudie indiziert sind. Dabei sollte besonders

Diskussion

der Identifizierung der Patienten, die von einer immunmodulatorischen Therapie profitieren, eine zentrale Rolle zukommen. Ein Monitoring des Immunstatus und die Identifizierung von Patienten mit besonders hohem Risiko für die Entwicklung einer Sepsis und hoher Mortalitätsrate stellen eine Voraussetzung für die Wahl des richtigen Behandlungsansatzes (pro- versus antiinflammatorisch, Kombination versus Monotherapie) und – zeitpunktes (vor Auftreten von septischen Komplikationen z.B. nach großen operativen Eingriffen, bei Nachweis einer Sepsis) dar. Um Ergebnisse im Rahmen einer Multizenterstudie vergleichen zu können, ist die Verwendung standardisierter Untersuchungsverfahren unabdingbar. Um dem komplexen Zusammenspiel von Immunzellen im Rahmen einer Sepsis Rechnung zu tragen, sollte die Untersuchung verschiedener Immunzellen und Subklassen sowie Rezeptoren und Zytokinen erfolgen. Ein Großteil der bisherigen klinischen Studien hat lediglich Gewicht auf die Zellen des angeborenen Immunsystems gelegt. Entgegen der Mehrzahl bisheriger Studien legt die vorliegende Arbeit den Fokus auch auf die Zellen der erworbenen Immunantwort, die bereits in früheren Stadien als bisher angenommen eine wichtige Rolle spielen. Auch ein prognostischer Nutzen der Untersuchung von T-Zellpopulationen konnte bereits gezeigt werden. Anhand eines Panels von fünf immunophänotypischen Variablen von T-Lymphozyten (CD3+CD4+/CD3+CD8+, CD45RA+/CD45RO+, CD62L+/CD28+) ließen sich bessere Vorhersagen bezüglich des Outcomes von Patienten mit septischem Schock treffen. Die Autoren geben dabei eine Sensitivität von 60-70% und Spezifität von 100% an.^[76] In den letzten Jahren sind mehrere Subklassen von T-Zellen identifiziert worden, die eine wichtige Rolle in der Kommunikation zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem darstellen und für die in einzelnen Fällen ein prognostischer Wert nachgewiesen werden konnte.^[77,78] Die aus großen Multizenterstudien resultierenden Erkenntnisse zu Pathomechanismen könnten weiter dazu beitragen, Patienten mit besonderen Risikofaktoren für schwere Verläufe einer Sepsis zu identifizieren. Idealerweise sollten diese Studien auch der Kompartimentalisierung der Immunantwort Rechnung tragen. Eine routinemäßige Untersuchung anderer Materialien als Vollblut beispielsweise durch bronchoalveoläre Lavage oder Punktion erscheint jedoch aufgrund des erhöhten Infektionsrisikos durch invasivere Verfahren schwierig durchführbar. Hier könnte eine Verbesserung im Bereich der Tiermodelle der Sepsis eine wichtige Rolle spielen.^[79]

Referenzen

6 Referenzen

- [1] Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall JR, Payen D: Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med* 2006;34:344-353.
- [2] 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;348:1546-1554.
- [3] Tschaikowsky K, Hedwig-Geissing M, Schiele A, Bremer F, Schywalsky M, Schüttler 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;30:1015-1023.
- [4] Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NKJ, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K: Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Feb 1;193(3):259-72.
- [5] Friedman G, Silva E, Vincent JL: Has the mortality of septic shock changed with time? *Crit Care Med* 1998;26:2078-2086.
- [6] Walmrath D, Grimminger F, Seeger W: Schwere Sepsis – neue Therapieverfahren. *Internist* 2001;42:1619-1630.
- [7] Moerer O, Burchardi H: Kosten der Sepsis. *Anaesthesist* 2006;55:S36-S42.
- [8] 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;29:1303-1310.

Referenzen

- [9] Bloos F, Kortüm A: Geschichte der Sepsis. Homepage der *Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V.* 2006; <http://webanae.med.uni-jena.de/WebObjects/DSGPortal.woa/>
- [10] Schuster HP, Müller-Werdan U: Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen. In: Werdan K, Schuster HP, Müller-Werdan U (Hrsg): *Sepsis und MODS*. Springer Heidelberg 2005, 4.Auflage; S4-17.
- [11] Bone RC, Balk RA, Cerra FB Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. *Chest* 1992;101:1643-1655.
- [12] The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), *JAMA*. 2016; 315(8):801-810
- [13] Wahl HG, Herzum I, Renz R: Sepsis und Sepsismarker – Update. *J Lab Med* 2003;27:431-439.
- [14] 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;31:1250-1256.
- [15] Rosendal C, Bouchon A, Bierhaus A, Nawroth P, Martin E, Bardenheuer H: Bedeutung der angeborenen Immunantwort in der Sepsis. *Anaesthesist* 2004;53:10-28.
- [16] Mayr FB, Yende S, Angus DC: Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 5:1, 4–11; January 1, 2014
- [17] Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):885-91.
- [18] Boomer JS, Green JM, Hotchkiss RS: The changing immune system in sepsis. *Virulence* 2014 Jan 1;5(1):45-56.
- [19] Proft T, Fraser JD: Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol*. 2003 Sep; 133(3): 299–306.

Referenzen

- [20] Wilde I, Lotz S, Engelmann D, Starke A, van Zandbergen G, Solbach W, Laskay T: Direct stimulatory effects of the TLR2/6 ligand bacterial lipopeptide MALP-2 on neutrophil granulocytes. *Med Microbiol Immunol* 2007 Jun;196(2):61-71.
- [21] Okamoto K, Tamura T, Sawatsubashi Y: Sepsis and disseminated intravascular coagulation. *J Intensive Care* 2016 Mar 23;4:23.
- [22] Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M: Sepsis-associated disseminated intravascular coagulation and thromboembolic disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2010 Aug 13;2(3):e2010024.
- [23] Leentjens J, Kox M, van der Hoeven JG, Netea MG, Pickkers P. Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change?. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013;187(12):1287-1293.
- [24] Peters van Ton AM, Kox M, Abdo WF and Pickkers P (2018) Precision Immunotherapy for Sepsis. *Front. Immunol.* 9:1926.
- [25] Peters van Ton A, Kox M, Abdo WF, Pickkers P: Precision Immunotherapy for Sepsis. *Front Immunol* 2018 Sep 5;9:1926.
- [26] Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR: Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature.* 1998; 393 (6684): 478–80
- [27] Vaki I, Kranidioti H, Karagianni V, Spyridaki A, Kotsaki A, Routsis C, Giamarellos-Bourboulis EJ: An early circulating factor in severe sepsis modulates apoptosis of monocytes and lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2011; 89:343-9.
- [28] Boomer JS, Shuherk-Shaffer J, Hotchkiss RS, Green JM: A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. *Crit Care* 2012; 16:R112.

Referenzen

- [29] Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, Bricker TL, Jarman SD 2nd, Kreisel D, Krupnick AS, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *JAMA* 2011; 306:2594-605.
- [30] 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:online publication.
- [31] 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;31:2068-2071.
- [32] Banz A, Pontoux C, Papiernik M: Modulation of Fas-dependent apoptosis: a dynamic process controlling both the persistence and death of regulatory T cells and effector T cells. *J Immunol* 2002; 169, 750–757.
- [33] Chen X, Murakami T, Oppenheim JJ: Differential response of murine CD4CD25 and CD4CD25– T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol* 2004; 34, 859–869.
- [34] Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY: Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 2012; 30:531-64.
- [35] <https://www2.nau.edu/~fpm/immunology/Exams/Tcelldevelopment-401.html>
- [36] James KD, Jenkinson WE, Anderson G. T-cell egress from the thymus: Should I stay or should I go? *J Leukoc Biol.* 2018;104:275–284.
- [37] Shah DK, Zuniga-Pflücker JC: An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol* 2014;192:4017-4023.
- [38] Fink PJ: The biology of recent thymic emigrants. *Annu Rev Immunol* 2013;31:31-50.

Referenzen

- [39] Berkley AM, Hendricks DW, Simmons KB, Fink PJ: Recent thymic emigrants and mature naïve T cells exhibit differential DNA methylation at key cytokine loci. *J Immunol*. 2013 June 15; 190(12): 6180–6186.
- [40] Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W: Monocyte deactivation in septic patients: Restoration by IFN- γ treatment. *Nat Med* 1997;3:678-681.
- [41] Delsing CE, Gresnigt MS, Leentjens J, Preijers F, Frager FA, Kox M, Monneret G, Venet F, Bleeker-Rovers CP, van de Veerdonk FL, Pickkers P, Pachot A, Kullberg BJ, Netea MG: Interferon-gamma as adjunctive immunotherapy for invasive fungal infections. *BMC Infect Dis* 2014 Mar 26;14:166.
- [42] Shindo Y, Unsinger J, Burnham CA, Green JM, Hotchkiss RS: Interleukin 7 and anti-programmed cell death 1 antibody have differing effects to reverse sepsis-induced immunosuppression. *Shock* 2015 Apr;43(4):334-43.
- [43] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D: Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis* 2013 Mar;13(3):260-8.
- [44] Thampy L, Remy K, Walton A, Hong Z, Liu K, Liu R, Yi V, Burnham C-A, Hotchkiss R: Restoration of T Cell function in multi-drug resistant bacterial sepsis after interleukin-7, anti-PD-L1, and OX-40 administration. *PLoS One* 2018; 13(6): e0199497
- [45] 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;29:646-651.
- [46] Bilgin K, Yaramiş A, Haspolat K, Taş A, Günbey S, Derman O: A randomized trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neonates with sepsis and neutropenia. *Pediatrics* 2001;107:36-41.

Referenzen

- [47] Armitage JO: Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998;92:4491-4508.
- [48] Eksioglu EA, Mahmood SS, Chang M, Reddy V: GM-CSF promotes differentiation of human dendritic cells and T lymphocytes toward a predominantly type 1 proinflammatory response. *Exp Hematol* 2007;35:1163-1171.
- [49] Berlex Product information on Leukine (Sargramostim), Stand 06/2002, Berlex Laboratories Inc., Richmond, CA 94804.
- [50] Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD. 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 Oct 1;180(7):640-8.
- [51] Presneill JJ, Harris T, Stewart AG, Cade JF, Wilson JW: A randomized phase II trial of GM-CSF therapy in severe sepsis with respiratory dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 Jul 15;166(2):138-43.
- [52] Myrianthefs PM, Karabatsos EG, Karatzas SP, Boutzouka EG, Venetsanou KF, Evagelopoulou PL, Fildissis GA, Legakis NJ, Baltopoulos GJ: Safety and efficacy of molgramostim as an adjunctive therapy in critically ill patients with severe sepsis. *Scand J Infec Dis* 2003;35(3):175-9.
- [53] Austin OM, Redmond HP, Watson WG, Cunney RJ, Grace PA, Bouchier-Hayes D: The beneficial effects of immunostimulation in posttraumatic sepsis. *J Surg Res* 1995 Oct;59(4):446-9.
- [54] Rosenbloom AJ, Linden PK, Dorrance A, Penkosky N, Cohen-Melamed MH, Pinsky MR: Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy on leukocyte function and clearance of serious infection in nonneutropenic patients. *Chest* 2005 Jun;127(6):2139-50.
- [55] Orozco H, Arch J, Medina-Franco H, Pantoja JP, Gonzalez QH, Vilatoba M, Hinojosa C, Vargas-Vorackova F, Sifuetes-Osornio J: Molgramostim (GM-CSF) associated with antibiotic

Referenzen

treatment in nontraumatic abdominal sepsis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arch Surg* 2006 Feb;141(2):150-3.

[56] Bilgin K, Yaramis A, Haspolat K, Tas MA, Günbey S, Derman O: A Randomized Trial of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Neonates With Sepsis and Neutropenia. *Pediatrics* 2001 Jan;107(1):36-41.

[57] Carr R, Modi N, Dore: G-CSF and GM-CSF for treating or preventing neonatal infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2003;(3).

[58] Monneret G, Venet F: Monocyte HLA-DR in sepsis: shall we stop following the flow? *Crit Care* 2014 Jan 6;18(1):102.

[58] Volk HD: Immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care* 2002; 6(4): 279–281.

[59] 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;229:246-254.

[60] Faisal M, Cumberland W, Champlin R, Fahey JL: Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor administration on the lymphocyte subsets of patients with refractory aplastic anemia. *Blood* 1990;76:1580-1585.

[61] Rice TW, Bernard GR: Therapeutic intervention and targets for sepsis. *Annu Rev Med* 2005;56:225-248.

[62] Döcke WD, Höflich C, Davis KA, Röttgers C, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, Nebe T, Engel A, Monneret G, Spittler A, Schmolke K, Reinke P, Volk HD, Kunz D: Monitoring Temporary Immunodepression by Flow cytometry measurements of monocytic HLA-DR expression: A multicenter study. *Clin Chem* 2005 Oct;51:12.

Referenzen

- [63] Cajander S, Tina E, Bäckman A, Magnuson A, Stralin K, Söderquist B, Källman J: Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Measurement of HLA-DRA Gene Expression in Whole Blood Is Highly Reproducible and Shows Changes That Reflect Dynamic Shifts in Monocyte Surface HLA-DR Expression during the Course of Sepsis. *PLoS One* 2016 May 4;11(5):e0154690.
- [64] Fan X, Rudensky AY: Hallmarks of tissue-resident lymphocytes. *Cell* 2016 March 10; 164(6): 1198-1211.
- [65] Kasten KR, Tschöp J, Adediran SG, Hildeman DA, Caldwell CC: T cells are potent early mediators of the host response to sepsis. *Shock* 2010 Oct;34(4):327-36.
- [66] Hotchkiss RS, Chang KC, Swanson PE, Tinsley KW, Hui JJ, Klender P, Xanthoudakis S, Roy S, Black C, Grimm E: Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. *Nat Immunol* 2000; 1, 496– 501.
- [67] Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE: Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 Dec 7;96(25)14541-6.
- [68] 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 Apr;35(4):678-86.
- [69] Chen X, Bäuml M, Männel DN, Howard OMZ, Openheim JJ: Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4⁺CD25⁺ T Regulatory Cells. *J Immunol* 2007, 179 (1) 154-161
- [70] Chang K, Svabek C, Vazquez-Guillamet C, Sato B, Rasche D, Wilson S, Robbins P, Ulbrandt N, Suzich JA, Green J, Patera AC, Blair W, Krishnan S, Hotchkiss R: Targeting the programmed cell death 1: programmed cell death ligand 1 pathway reverses T cell exhaustion in patients with sepsis. *Crit Care* 2014; 18(1): R3.

Referenzen

- [72] Gentile LF, Cuenca AG, Efron PA, Ang D, Bihorac A, McKinley BA, Moldawer LL, Moore FA: Persistent inflammation and immunosuppression: a common syndrome and new horizon for surgical intensive care. *J Trauma Acute Care Surg* 2012 Jun;72(6):1491-501.
- [73] Mathias B, Szpila BE, Moore FA, Efron PA, Moldawer LL: A Review of GM-CSF Therapy in Sepsis. *Medicine (Baltimore)* 2015 Dec;94(50).
- [75] Muret J, Marie C, Fitting C, Payen D, Cavaillon J-M: Ex vivo T-lymphocyte derived cytokine production in SIRS patients is influenced by experimental procedures. *Shock* 2000; 13:169–174.
- [76] 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.
- [77] de Pablo R, Monserrat J, Prieto A, Alvarez-Mon M: Role of Circulating Lymphocytes in Patients with Sepsis. *Biomed Res Int* 2014;2014:671087.
- [78] Andreu-Ballester JC, Tormo-Calandin C, Garcia-Ballesteros C, Perez-Griera J, Amigo V, Almela-Quilis A, Ruiz del Castillo J, Penarroja-Otero C, Ballester F: Association of $\gamma\delta$ T cells with disease severity and mortality in septic patients. *Clin Vaccine Immunol* 2013 May;20(5):738-46.
- [79] Rubio I, Osuchowski MF, Shankar-Hari M, Skirecki T, Winkler MS, Lachmann G, La Rosée P, Monneret G, Venet F, Bauer M, Brunkhorst FM, Kox M, Cavaillon JM, Uhle F, Weigand MA, Flohé SB, Wiersinga WJ, Martin-Fernandez M, Almansa R, Martin-Loeches I, Torres A, Giamarellos-Bourboulis EJ, Girardis M, Cossarizza A, Netea MG, van der Poll T, Scherag A, Meisel C, Schefold JC, Bermejo-Martín JF: Current gaps in sepsis immunology: new opportunities for translational research. *Lancet Infect Dis* 2019 Dec;19(12) e422-e436.
- [80] Spies C, Luetz A, Lachmann G, Renius M, vonHaefen C, Wernecke K-D, Bahra M, Schiemann A, Paupers M, Meisel C: Influence of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor or

Referenzen

Influenza Vaccination on HLA-DR, Infection and Delirium Days in Immunosuppressed Surgical Patients: Double Blind, Randomised Controlled Trial. *PLoS ONE* 10(12): e0144003.

[81] Hedfors E, Holm G, Pettersson D: Activation of human peripheral blood lymphocytes by Concanavalin A dependence of monocytes. *Clin Exp Immunol* 1975 Nov;22(2):223-9.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Katrin Susann Stadler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss einer immunstimulatorischen Therapie mit GM-CSF auf die T-Zell-vermittelte Immunität bei Patienten mit schwerer Sepsis und Immunparalyse“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift (Katrin Stadler)

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Frau Katrin Susann Stadler hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, **Hetzger K**, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, and Volk HD. GranulocyteMacrophage Colony-stimulating Factor to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression. Am J Respir Crit Care Med Vol 180. pp640-648, 2009.

Beitrag im Einzelnen: Patientenscreening, Erhebung klinischer Daten und deren Auswertung. Probengewinnung, laborexperimentelle Arbeiten (Durchflusszytometrie, Stimulationassays, ELISA-Assays etc.) und deren Analyse. Mitarbeit an der statistischen Auswertung und Erstellung des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

2009 Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, **Hetzger K** et al. Granulocyte-Macrophage Colonystimulating Factor to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression. *Am J Respir Crit Care Med* Vol 180. pp640-648, 2009

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk für die Betreuung der vorliegenden Arbeit innerhalb des von ihm geleiteten Instituts für Medizinische Immunologie der Charité. Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. med. Christian Meisel, dessen profunde fachliche Kompetenz und herzliche Art mich für die gesamte Dauer der Arbeit, von den ersten Versuchen im Labor bis zur Vollendung der Monografie, verlässlich und mit Humor begleitet haben.

Ein herzliches Dankeschön an alle Kollegen des Institutes, insbesondere Tycho Baumann und René Pschowski, die als Mitpromovenden eine unschätzbare Stütze waren. Kristin Neuhaus und Christa Liebenthal und Claudia Conert sowie Ingrid Jäkel und Ulrike Mönnich für ihre Geduld, Beistand und Rat bei technischen Fragestellungen und ihren Einsatz im Routinelabor des Institutes, auch am Wochenende und Feiertagen.

Dem Personal der Intensivstationen der Charité gilt mein Dank für ihre Unterstützung in der Durchführung der klinischen Studie; insbesondere Frau OÄ Dr. med. Heidrun Zuckermann-Becker, Frau Prof. Dr. med. Petra Reinke und Herrn OA Dr. med. Dietrich Hasper, deren Rückmeldungen in Bezug auf die klinischen Aspekte der Studie ich sehr schätze.

Am wertvollsten jedoch war die Unterstützung durch meine Familie, insbesondere durch meine Eltern, meine Schwester Kristin und meinen Ehemann Konstantin, weil sie immer an mich geglaubt und auch in schweren Stunden nie an mir gezweifelt haben.

Danke!