Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und internistische Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Lipopolysaccharid-, Interleukin-6- und Komplementfaktor C5a-Immunadsorption bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Malte Adrian Corsepius

aus Berlin

Gutachter:
1. Prof. Dr. med. P. Reinke
2. Prof. Dr. med. C. Spies
3. Prof. Dr. A. Wendel

Datum der Promotion: 18. September 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **5**

1.1. Sepsis . . . 5

1.1.1. Schwere Sepsis, septischer Schock und deren Epidemiologie . . . 5

1.1.2. Multi-Organ-Versagen (MOV) . . . 5

1.2. Pathophysiologie der Sepsis und Immunparalyse . . . 6

1.3. Mediatoren . . . 8

1.3.1. Endotoxin (Lipopolysaccharide) . . . 8

1.3.2. Interleukin-6 (IL-6) . . . 9

1.3.3. Komplementaktivierungsprodukt C5a . . . 9

1.4. Therapie der Sepsis . . . 10

1.4.1. Aktuelle evidenzbasierte Empfehlungen in der Sepsistherapie . . . 10

1.4.2. Immunmodulatorische Therapien . . . 11

1.4.3. Immunadsorption . . . 12

2. Fragestellung **13**

2.1. Hypothesen . . . 13

2.2. Studienziele und Endpunkte . . . 13

3. Material und Methoden **14**

3.1. Patientencharakteristika . . . 14

3.1.1. Einschlusskriterien . . . 14

3.1.2. Ausschlusskriterien . . . 14

3.1.3. Screening und Zuwahl der Patienten in die einzelnen Gruppen . . . 15

3.2. Immunadsorptionsbehandlung . . . 15

3.2.1. Immunadsorptionsmodule . . . 15

3.2.2. Behandlungsablauf . . . 16

3.3. Gemessene Parameter . . . 17

3.3.1. Laboruntersuchungen . . . 17

3.3.2. Monozytäre HLA-DR-Expression . . . 17

3.3.3. Klinische Scores . . . 18

3.4. Statistische Analyse . . . 18

4. Ergebnisse **19**

4.1. Präklinische Charakterisierung der eingesetzten Antikörper und des Bindungsverhaltens . . . 19

4.2. Klinische Studie . . . 19

4.2.1. Patientencharakteristika 19
4.2.2. Messergebnisse 23
4.2.2.1. Laboruntersuchungen 23
4.2.2.2. Immunologische Charakterisierung der Patienten 26
4.2.2.3. Organfunktion (klinische Scores) 28
4.2.2.4. Nachbeobachtungszeitraum 29

5. Diskussion **31**

6. Zusammenfassung **37**

A. Literaturverzeichnis **39**

B. Abbildungsverzeichnis **46**

C. Tabellenverzeichnis **47**

D. Abkürzungsverzeichnis **48**

E. Danksagung **50**

F. Lebenslauf **51**

G. Publikationsverzeichnis **52**

H. Eidesstattliche Erklärung **53**

1. Einleitung

1.1. Sepsis

1.1.1. Schwere Sepsis, septischer Schock und deren Epidemiologie

Sepsis ist die häufigste Todesursache kritisch kranker Patienten auf nicht-kardiologischen Intensivstationen. Eine Vielzahl von Definitionen und Kriterien wurde in der Vergangenheit verwendet, um die Krankheit Sepsis zu charakterisieren. Die aktuell akzeptierte Definition basiert auf den Diagnosekriterien der Konsensuskonferenzen des *American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) von 1991 bzw. 2001 [1, 2]. Hier wurden die Begriffe *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS), Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock und Multiorgandysfunktions-Syndrom (MODS) geprägt (Tabelle 1). Die jeweiligen Begriffe definieren unterschiedliche Schweregrade, welche mit der Mortalität der Patienten korrelieren [2]. Die Schweregrade schwere Sepsis bzw. septischer Schock beschreiben das Vorhandensein mindestens einer Organdysfunktion, bzw. das Auftreten eines volumenrefraktären Kreislaufversagens. Im septischen Schock ist somit häufig der Einsatz von Katecholaminen notwendig (Tabelle 1).

Trotz vielfacher Fortschritte in der Intensivmedizin ist die Inzidenz von Sepsis und des durch Sepsis induzierten Multiorganversagens über die vergangenen Jahre kontinuierlich gestiegen [3]. Eine Untersuchung von Angus et al. von 2001 ergab, dass die Inzidenz der schweren Sepsis in den USA bei etwa 750.000 Fällen jährlich liegt und es wurde eine Mortalität von 28,6 Prozent errechnet [4]. Für Deutschland ergibt sich eine Inzidenz von 116 Fällen pro 100.000 Einwohner pro Jahr, wobei ca. 60.000 Patienten pro Jahr an einer schweren Sepsis oder einem septischem Schock versterben [5]. Sepsis stellt somit eine enorme Belastung für öffentliche Gesundheitssysteme dar. In Deutschland liegen die Kosten laut einer Untersuchung aus dem Jahr 2002 bei ca. 23.300 Euro pro Fall [6]. 1,77 Milliarden Euro, also etwa 30 Prozent der gesamten Ausgaben der Intensivmedizin entfallen hierbei auf die Therapie septischer Patienten [5].

1.1.2. Multi-Organ-Versagen (MOV)

Das Multiorganversagen bezeichnet einen klinischen Zustand, welcher die Endstrecke einer Vielzahl kritischer Erkrankungen darstellt. Häufig existiert eine infektiöse bzw. parainfektiöse Grundlage [7]. Die betroffenen Organe sind hierbei nur zum Teil durch die zugrunde liegende Erkrankung geschädigt [8]. Histopathologische Untersuchungen zeigen, dass der Grad

Tabelle 1.: Sepsis - Definitionen der *ACCP/SCCM Consensus Conferences* von 1991 und 2001 [1, 2]

SIRS	Klinischer Zustand, der durch das Vorliegen von mindestens zwei der folgenden Kriterien charakterisiert ist: - Körpertemperatur >38°C oder <36°C, - Herzfrequenz >90/min, - Atemfrequenz >20/min oder $PaCO_2$ <32 mmHg, - Leukozyten >12000/mm^3 oder <4000/mm^3
Sepsis	SIRS hervorgerufen durch eine Infektion
Schwere Sepsis	Sepsis und Vorliegen mindestens einer Organdysfunktion
Septischer Schock	Sepsis und Vorliegen eines Kreislaufversagens mit persistierender volumenrefraktärer Hypotension und Abwesenheit anderer Schockursachen
MODS	Veränderte Organfunktion beim akut kranken Patienten, in der Art, dass die Homöostase nicht ohne Intervention aufrechterhalten werden kann

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

der Organdysfunktion hierbei nicht notwendigerweise mit der zu erwartenden strukturellen Organschädigung einhergeht [9]. Vielmehr wird von einigen Autoren vermutet, dass bei MOV funktionelle Schädigungen im Vordergrund stehen, die durch immunologische und/oder endokrin vermittelte Reaktionen entstehen [8, 10]. Die Anzahl der dysfunktionalen Organsysteme korreliert dabei direkt mit der Mortalität [7].

Die Prognose kritisch kranker Patienten und der Schweregrad der jeweiligen Erkrankung, bzw. eines MOV kann mit den nachfolgenden Skalen erfasst werden: *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE) II [11], *Sepsis-related Organ Failure Assessment* (SOFA) Score [12] und *Multiple Organ Failure* (MOF) Score [13].

1.2. Pathophysiologie der Sepsis und Immunparalyse

Der pathophysiologische Ablauf der Sepsis ist gekennzeichnet durch die Freisetzung endogener und exogener Mediatoren (z.B. Tumor Nekrose Faktor-alpha [TNF-α], Lipopolysaccharide [LPS], Interleukin [IL]-1 und IL-6) als Reaktion auf einen infektiösen Stimulus. Durch die Interaktion verschiedener pleiotroper Mediatoren kommt es zum Ablauf komplexer, feedback-regulierter Reaktionskaskaden. Wird der Infektionsfokus nicht saniert bzw. persistiert der infektiöse Stimulus, wird meist binnen kurzer Zeit die Produktion antiinflammatorischer Mediatoren induziert (z.B. IL-10, IL-1-Rezeptorantagonist [RA] und *Transforming Growth*

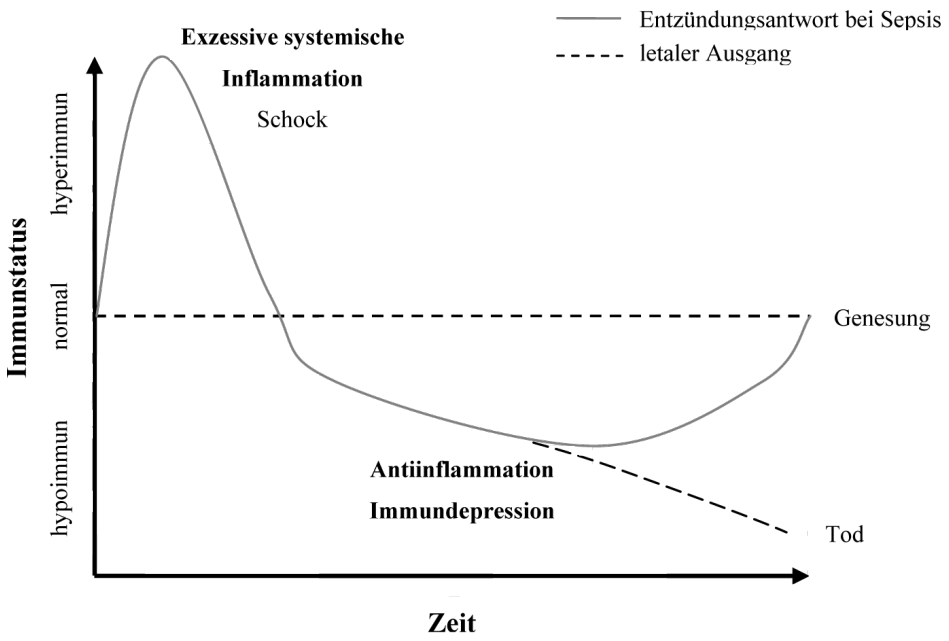

Abbildung 1.: Immunologische Phasen der Sepsis (nach Hotchkiss [10]).

Die gesteigerte Freisetzung von proinflammatorischen Entzündungsmediatoren ist kennzeichnend für die frühe Phase der Hyperinflammation. Die gegenregulatorische Antiinflammation kann zur Entstehung einer Immunparalyse beitragen [14].

Factor-beta [TGF-β]) [14, 15]. So kommt es zur Einleitung einer kompensatorischen antiinflammatorischen Phase mit erhöhten Spiegeln von antiinflammatorischen Zytokinen. Hierdurch wurde auch das frühere biphasische Bild der Sepsis mit einer früh einsetzenden proinflammatorischen Phase und einer späteren antiinflammatorischen Phase geprägt (Abbildung 1). Neuere Arbeiten weisen allerdings darauf hin, dass sich die beiden Phasen nicht strikt voneinander trennen lassen, sondern sich meist überlappen.

Bei persistierendem inflammatorischen Reiz und paralleler prolongierter Antiinflammation kommt es bei einer Vielzahl septischer Patienten zu einer Einschränkung der monozytären Funktion. Diese monozytäre Funktionseinschränkung oder auch Deaktivierung ist gekennzeichnet durch eingeschränkte monozytäre Phagozytose und Antigenverarbeitung, unzureichende Antigenpräsentation und verminderte monozytäre Zytokinsekretion. Klinisch zeigen Sepsispatienten im Verlauf oft Zeichen der Immunsuppression mit erhöhter Anfälligkeit gegenüber sekundären Infektionen [10]. Für diesen Zustand wurde der Begriff „Immunparalyse“ geprägt, welcher ein funktionelles Versagen der monozytären Immunabwehr reflektiert [16]. Der immunologische Zustand der Immunparalyse kann durch die Messung der Expression von *Major Histocompatibility Complex* (MHC) Klasse II Molekülen (*Human Leukocyte Antigen* [HLA]-DR) auf *Cluster of Differentiation* (CD) 14-positiven (+) Monozyten erfasst werden.

MHC Klasse II-Moleküle sind Glykoproteine auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen (APC). Die MHC Klasse II-vermittelte Antigenpräsentation ist von entscheidender Bedeutung für die Einleitung, Aufrechterhaltung und Regulierung einer adaptiven Immunantwort [17]. Ein großer Fortschritt der letzen Jahre besteht darin, dass die monozytäre HLA-DR-Expression mittels eines standardisierten, quantitativen Tests gemessen werden kann [18]. Die standardisierte Messung von HLA-DR erlaubt eine Aussage zur Prognose septischer Patienten [19]. Eine persistierende reduzierte HLA-DR-Expression auf CD14+ Monozyten korreliert mit gehäuftem Auftreten von sekundären Infektionen und Letalität [20, 19, 21]. Der Verlust zellvermittelter Immunität scheint für einen erheblichen Teil der Sepsismortalität verantwortlich [22]. Heute ist bekannt, dass die allermeisten Sepsispatienten mit einer letal verlaufenden Erkrankung in der späten „hypoimmunen“ Phase versterben (Abbildung 1) [20].

1.3. Mediatoren

1.3.1. Endotoxin (Lipopolysaccharide)

Endotoxine (Lipopolysaccharide [LPS]) sind Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien [23]. LPS bestehen aus drei Komponenten: dem äußeren O-Polysaccharid mit einer variablen Anzahl von Oligosacchariden, deren Länge zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies variiert, dem Core-Oligosaccharid und einer damit kovalent verknüpften Lipidkomponente (Lipid A). Lipid A besteht aus einer variablen Anzahl von Fettsäuren, die an zwei phosphorylierte Glucosaminreste gebunden sind. Lipid A ist entscheidend an der Pathogenität von Endotoxin beteiligt [23]. LPS binden in vivo an das Serumprotein *Lipopolysaccharid Binding Protein* (LBP). Der LPS-LBP-Komplex bindet an den für die Endotoxinwirkung relevanten CD14-Rezeptor. Nach dieser Bindung kommt es zur Aggregation von CD14, Adapterprotein MD2 und *Toll-Like-Rezeptor* (TLR) 4, wodurch die intrazelluläre Signaltransduktion initiiert wird [23]. Die Stimulation des TLR4-MD2-CD14-Komplexes induziert in Monozyten die Ausschüttung vielfältiger Zytokine (unter anderem TNF-α, IL-1 und IL-6), Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels und reaktiver Sauerstoffverbindungen [24]. Die übermäßige LPS-Stimulation von Monozyten führt nach initialer Stimulation mittelfristig zu einer anhaltenden Beeinträchtigung der monozytären Funktion; diese korreliert mit einer reduzierten HLA-DR-Expression auf CD14+ Monozyten [25, 26]. LPS stimulieren die Expression von IL-6 und Komplementaktivierungsprodukt C5a, die beide eine monozytäre Deaktivierung verstärken.

1.3.2. Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 wurde 1986 erstmals isoliert und ist ein Protein mit 212 Aminosäuren (Molekulargewicht 21 - 28 kd) [27, 28]. IL-6 gehört zur Familie der Glykoprotein (gp) 130-Rezeptorliganden. Es bindet an einen unter anderem von Monozyten und T-Lymphozyten exprimierten Rezeptor (IL-6R). Die Bindung bewirkt eine Aggregation des IL-6-IL-6R-Komplexes mit gp130 [15, 29]. IL-6 wird aus Monozyten, T-Lymphozyten, Endothelzellen, Mastzellen und Fibroblasten unter anderem als Antwort auf Gewebeschädigung freigesetzt [30]. IL-6 ist gemeinsam mit IL-1 und TNF-α maßgeblich an der Einleitung einer schnellen Immunantwort und der konsekutiven Rekrutierung des spezifischen Immunsystems beteiligt [15]. Es induziert Akute-Phase-Reaktionen und ist ein potentes Pyrogen [15, 28]. IL-6 stimuliert als einziger bekannter Mediator das volle Spektrum der Akute-Phase-Proteine (z.B. C-reaktives Protein [CRP], Fibrinogen und Haptoglobin) an humanen Hepatozyten [31, 32], weiterhin stimuliert es die Ausreifung von T-Lymphozyten, sowie die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen [15, 28]. IL-6 hat zudem antiinflammatorische Wirkungen: reduzierte Expression von IL-1 und TNF-α, Stimulation der Synthese von Glucocorticoiden, IL-1-RA, löslichem TNF-Rezeptor und Inhibition der Produktion von *Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor* (GM-CSF) und Interferon (IFN)-γ [15, 27, 28, 33]. Die Serumspiegel von IL-6 korrelieren im septischen Krankheitsbild mit dem Schweregrad der Erkrankung; hohe Spiegel sind mit schlechter Prognose und letalem Ausgang assoziiert [15, 30, 34]. Des Weiteren werden IL-6 kardiodepressive Eigenschaften zugeschrieben [35].

1.3.3. Komplementaktivierungsprodukt C5a

Die Komplementaktivierungsprodukte C5a und C3a, auch Anaphylatoxine genannt, sind ein Teil des angeborenen Immunsystems [36]. C5a ist ein Glykopeptid (74 Aminosäuren), das vom aminoterminalen Ende von C5 freigesetzt wird [37]. Der C5a-Rezeptor (C5aR) gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und wird von Neutrophilen, Monozyten und Endothelzellen exprimiert. Das Komplementsystem basiert auf der kaskadenartigen Aktivierung von Proteinasen durch limitierte Proteolyse aus den neun Komplementfaktoren C1 bis C9 und weiteren Kofaktoren [38]. Es sind drei Aktivierungswege bekannt: der klassische Weg, der Lektin-Weg und der alternative Weg. Der klassische (C1q-abhängige) Weg beruht auf der Aktivierung von C1q durch Immunglobulin (Ig) G- oder IgM-Antigen-Komplexe oder durch CRP [36, 37, 38]. Der Lektin-Weg wird durch die Interaktionon des Proteins *Mannose Binding Lectin* (MBL) mit bakteriellen Oberflächen und der Aktivierung der *MBL Associated Serine Proteases* (MASP) 1 bis 3 induziert [36, 37, 38]. Der alternative Weg der Komplementaktivierung beruht auf der direkten Aktivierung von C3b durch mikrobielle Oberflächen

[36, 37, 38]. Die Aktivierung führt zur Freisetzung von C3a und C5a und letztlich zur Bildung des *Membrane Attack Complex* (MAC) C5b-9 [38]. Der MAC führt zu Porenbildung und zu bakterieller Zytolyse [39, 40]. Anaphylatoxine induzieren akute Entzündungsreaktionen mit Vasodilatation, Gewebeödem und Extravasation von Leukozyten durch Chemotaxis [36, 37]. Die Aktivierungsprodukte des Komplementsystems sind dabei systemisch selten nachweisbar. Hohe C5a-Spiegel imitieren im Tiermodell einen LPS-induzierten septischen Schock [37, 41]. Systemisch nachweisbares C5a ist mit der Entwicklung von Schock, MOV, hoher Letalität und Dysfunktion der angeborenen Immunabwehr assoziiert [38, 39, 40, 42]. Kardiale Dysfunktion spielt eine wesentliche Rolle in der Pathophysiologie des MOV. Die potentiell reversible septische Kardiomyopathie ist gekennzeichnet durch Pumpversagen, sowie Vergrößerung des rechten und linken Ventrikels [43]. Verschiedene Mediatoren scheinen an der Pathogenese der septischen Kardiomyopathie beteiligt; insbesondere für TNF-α und IL-6 konnten kardiodepressive Effekte nachgewiesen werden [44, 35]. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass auch C5a in vitro und in vivo myokarddepressiv wirkt und möglicherweise kausal an der septischen Kardiomyopathie beteiligt ist [45, 46]. Des Weiteren konnte eine gegenseitige Wirkungsverstärkung von IL-6 und C5a gezeigt werden, da IL-6 die Expression von C5aR induziert und via CRP eine Komplementaktivierung augmentiert [37, 47, 48]. Das Vorkommen großer Mengen von C5a und IL-6 trägt zur Initiation der antiinflammatorischen Wirtsreaktion, aber auch zur Ausbildung einer Immunparalyse bei: C5a ist ein potenter Inhibitor der monozytären IL-12-Produktion und hemmt so die IL-12-abhängige Produktion von IFN-γ [49]. IFN-γ ist wesentlich an der endogenen Rekonstitution der monozytären Funktion beteiligt [49]. Anti-C5a- und Anti-C5aR-Antikörper, sowie ein C5aR-Antagonist wurden im Tiermodell evaluiert. Hier zeigte sich eine Reduktion der Sepsis-induzierten Mortalität [38, 39, 40, 41, 42, 47, 48, 50].

1.4. Therapie der Sepsis

1.4.1. Aktuelle evidenzbasierte Empfehlungen in der Sepsistherapie

Basierend auf den aktuellen Empfehlungen der *Surviving Sepsis Campaign* (SSC) scheinen im Rahmen der Sepsistherapie von besonderer Wichtigkeit: frühzeitige Sanierung des Infektionsfokus und frühe zielorientierte Organunterstützung (*early goal directed organ support therapy*) – insbesondere durch Volumenstatusverbesserung, resistenzgerechte antibiotische Therapie, Vasopressoren, Beatmungstherapie und den Einsatz von Nierenerstzverfahren [51].

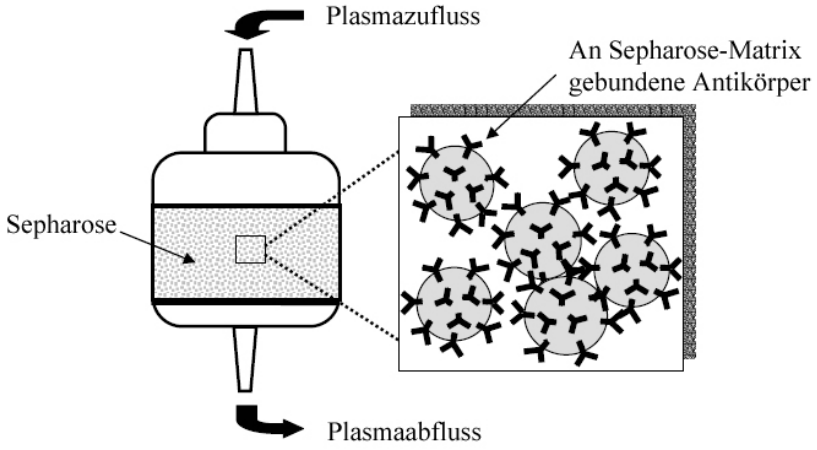

Abbildung 2.: Aufbau eines Immunadsorptionsmoduls.

1.4.2. Immunmodulatorische Therapien

Eine Vielzahl klinischer Studien hat in den vergangenen Jahren Ansätze getestet, die auf die Reduktion einzelner inflammatorischer Mediatoren (z.B. LPS, IL-1β, TNF-α) abzielten [14, 21, 42, 52]. Diese Ansätze waren zumeist erfolglos [42, 52]. Die Ursachen hierfür sind vielfältig; offenbar ist die Blockade eines einzelnen, kurzlebigen immunologischen Mediators bzw. der Eingriff in eine singuläre immunologische Kaskade aufgrund der Pleiotropie und Redundanz der Mediatoren und der Dynamik des Krankheitsverlaufs unzureichend. Verschiedene extrakorporale Therapieverfahren, wie z.B. die unselektive Plasmaseparation, auf Nierenersatztherapie basierende Verfahren, wie auch Ansätze zur selektiven Elimination von LPS aus dem Kreislauf konnten bisher keine Mortalitätsreduktion zeigen [53].

Die Charakterisierung und Verlaufsbeobachtung der zellulären Immunität ist unabdingbar für den Einsatz immunmodulatorischer Therapieansätze [54]. Ein geeigneter Parameter ist die standardisiert gemessene monozytäre HLA-DR-Expression [14, 55], welche von prognostischer Relevanz ist [19]. Bislang ist bekannt, dass sich die Expression von monozytärem HLA-DR durch die Gabe von GM-CSF und IFN-γ stimulieren lässt [56, 57]. Erkenntnisse der Grundlagenforschung und klinische Daten deuten darauf hin, dass pleiotrope immunologische Reaktionskaskaden durch eine Vielzahl von Mediatoren neben LPS induziert werden. Die vorliegende Untersuchung zielt daher darauf ab, mittels einer selektiven Intervention eine simultane Reduktion mehrerer Schlüsselmediatoren der Immunparalyse bzw. Sepsis zu erreichen.

1.4.3. Immunadsorption

Die Immunadsorption (IA) gehört zur Gruppe der selektiven extrakorporalen Therapieverfahren und geschieht meist plasmabasiert [53]. IA ist ein etabliertes Therapieverfahren, welches bei verschiedenen rheumatologischen und hämatologischen Erkrankungen, sowie bei Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen eingesetzt wird [58]. Beim Einsatz eines extrakorporalen Kreislaufs werden hohe Anforderungen an die Biokompatibilität der Materialien gestellt. Die zur IA eingesetzten Adsorptionssäulen enthalten an ein Trägermaterial gebundene Liganden (z.B. Antikörper oder Protein A), die gegen das Zielmolekül gerichtet sind (Abbildung 2). Als Trägermaterial kommt in dieser Arbeit aktivierte Agarose (Sepharose) zum Einsatz, welche hoch biokompatibel ist.

2. Fragestellung

2.1. Hypothesen

Grundlage der vorliegenden Studie sind die Hypothesen, dass die extrakorporale, selektive Entfernung von definierten inflammatorischen Mediatoren (LPS, IL-6 und C5a) aus dem Kreislauf septischer Patienten

- deren Serumspiegel effizient reduziert,
- zu einer Verbesserung der monozytären HLA-DR-Expression führt,
- einen positiven Effekt auf die Organfunktion, gemessen an drei unabhängigen klinischen Scores, hat.

2.2. Studienziele und Endpunkte

Die oben angeführten Arbeitshypothesen sollen in einer prospektiven, kontrollierten Pilotstudie mit verblindeter Endpunktanalyse geprüft werden.

Primärer Endpunkt der Studie ist die HLA-DR-Expression auf CD14+ Monozyten. Sekundäre Endpunkte sind die Serumspiegel der Zielantigene und von CRP, sowie der Verlauf der klinischen Scores.

3. Material und Methoden

3.1. Patientencharakteristika

3.1.1. Einschlusskriterien

Nach der Zustimmung der lokalen Ethikkommission zur Durchführung der Studie erfolgte der Einschluss von Patienten im Zeitraum von Januar 2002 bis Juni 2005 auf den Intensivstationen der Charité Universitätsmedizin Berlin. Als Einschlusskriterien wurden gefordert:

- Alter 18 bis 80 Jahre,
- Vorliegen einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks [2],
- Vorliegen von vier SIRS-Kriterien (Tabelle 1) [2],
- klinisch evidente Infektion bzw. mikrobiologischer Nachweis entsprechender Erreger,
- APACHE II-Score $\geq$18,
- Vorliegen einer schriftlichen Einverständniserklärung.

In Anlehnung an die Ergebnisse der Konsensuskonferenz von 2001 [2] wurde Organdysfunktion in der vorliegenden Studie wie folgt definiert: akutes Kreislaufversagen als Vorliegen einer Hypotension (systolischer Blutdruck $\leq$90 mmHg oder arterieller Mitteldruck $\leq$70 mmHg) trotz adäquater Volumentherapie und Abwesenheit anderer Schockursachen; renale Dysfunktion als Oligurie oder Anstieg des Serumkreatinins auf das Zweifache des Ausgangswertes; septische Enzephalopathie als Vorliegen einer qualitativen oder quantitativen Bewusstseinsstörung (Agitation, Verwirrtheit, Desorientiertheit, Stupor oder Koma) und Abwesenheit anderer Ursachen (neurotrope Medikation); respiratorisches Versagen als PaO_2/FiO_2-Quotient $\leq$250 bzw. Notwendigkeit der maschinellen Beatmung.

3.1.2. Ausschlusskriterien

Patienten wurden bei Vorliegen folgender Kriterien von der Studienteilnahme ausgeschlossen:

- evidente oder vermutete Schwangerschaft,
- anamnestisch allergische Reaktion auf Hühnereiweiß,
- aktive Blutung,

- Vorhandensein eines Malignoms oder einer akuten Leukämie,
- Teilnahme an einer anderen klinischen Studie <12 Wochen vor Einschluss in die Studie.

3.1.3. Screening und Zuwahl der Patienten in die einzelnen Gruppen

Die vorliegende Untersuchung zielte darauf ab, die Sicherheit und die Effektivität einer gegen LPS, IL-6 und C5a gerichteten Immunadsorption zu evaluieren. In einem offenen Design wurden kontemporäre Patienten konsekutiv eingeschlossen. Aus Sicherheitsgründen forderten wir die Anwesenheit einer qualifizierten Dialyse-Pflegekraft während jeder IA-Behandlung. Dessen ungeachtet erfolgte die Zuordnung zur Studiengruppe zufallsartig und sie war unabhängig von Tageszeit und Wochentag.

3.2. Immunadsorptionsbehandlung

3.2.1. Immunadsorptionsmodule

IA-Module beladen mit polyklonalen vitellinen IgY-Antikörpern (AK) gegen LPS, IL-6 und C5a wurden eingesetzt. Die IA-Module (MIAS, Innosorb GmbH, Rostock, Deutschland) bestehen aus einem Kunststoffgehäuse (Makrolon 2458), welches 60 ml steriles Sepharose-4FF-Gel (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) enthält. Sepharose wurde mit Cyanogenbromid (BrCN) aktiviert und diente als Matrix für kovalent gebundene IgY-AK. Der Vorteil der IgY-AK besteht hier einerseits in der verfügbaren AK-Menge und andererseits in der geringeren Kreuzreaktivität mit Säugetierantigenen [59]. Nach standardisierter Immunisierung wurden die IgY-AK aus den Eiern immunisierter Hennen isoliert. Zur Immunisierung der Hennen wurde kommerzielles, hoch gereinigtes rekombinantes humanes IL-6 (R&D Systems GmbH, Wiesbaden, Deutschland), hoch gereinigtes rekombinantes humanes C5a (Merck Biosciences Ltd., Darmstadt, Deutschland), eine Mischung verschiedener LPS-Spezies (SIGMA-Aldrich Co., München, Deutschland) und Lipid A (US Patent-Nr. 6,881,408-B1) eingesetzt. Jedes IL-6-Adsorptionsmodul enthielt 5,0 mg anti-IL-6-IgY/ml Gel und hatte eine Adsorptionskapazität von 72,6 μg humanem IL-6 (gemessen mit IL-6-ELISA, R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland). Die C5a-Adsorptionsmodule enthielten jeweils 10,0 mg anti-C5a-IgY/ml Gel und jedes Modul konnte 384 μg humanes C5a adsorbieren (C5a-ELISA, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland). Jedes LPS-Adsorptionsmodul enthielt 9,2 mg IgY/ml Gel. Die Adsorptionskapazität betrug 59.040 Endotoxin-Einheiten pro Modul (gemessen mittels Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate-QCL1000, BioWhittaker, Walkersville, USA). Im Rahmen der präklinischen Entwicklung wurde sowohl die spezifische

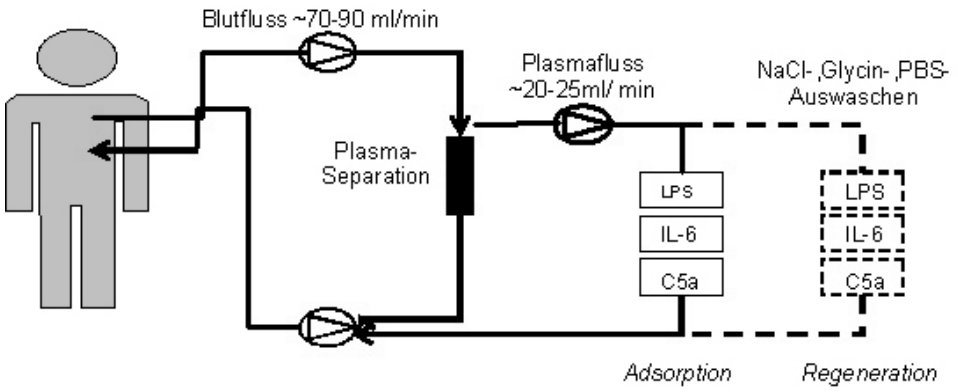

Abbildung 3.: Extrakorporale Immunadsorption von LPS, IL-6 und C5a.

NaCl - Natriumchlorid, PBS - Phosphate Buffered Saline.

Bindungsaktivität der IgY-AK getestet, als auch auf mögliche Kreuzreaktivität mit anderen Antigenen. Dafür wurde die Bindung der Anti-LPS-IgY-AK an eine Mischung pathogenetisch relevanter LPS-Typen mittels eines direkten ELISA analysiert. Gegen humanes IL-6 bzw. C5a gerichtete IgY-AK wurden ebenfalls mittels direkten ELISA analysiert. Als Kontrolle diente unspezifisches IgY nicht immunisierter Hennen. Es wurde die Adsorptionskapazität der mit den Antikörpern besetzten Sepharose untersucht. Dazu wurde humanes Plasma mit einer definierten Menge humanem IL-6 bzw. C5a versetzt. Für die präklinische Bestimmung der LPS-Adsorptionskapazität kamen plasmafreie Probelösungen zu Einsatz. Nach Vermischung von Sepharose und Probe erfolgte die Bestimmung der Adsorptionsraten.

3.2.2. Behandlungsablauf

Alle Patienten erhielten die gleiche auf den Empfehlungen der *Surviving Sepsis Campaign Guidelines* [60] basierende intensivmedizinische Therapie [61]. Zusätzlich erhielten die Patienten der Interventionsgruppe, beginnend am Tag nach Studieneinschluss (Tag 2), an fünf aufeinander folgenden Tagen 7,5 Stunden pro Tag plasmabasierte, simultane IA von LPS, IL-6 und C5a. Der klinische, immunologische und laborchemische Verlauf wurde für insgesamt 28 Tage, bzw. bis Krankenhausentlassung oder Tod erfasst. Als Gefäßzugang wurden doppellumige zentralvenöse Dialysekatheter oder vorhandene arteriovenöse Fisteln oder Shunts verwendet. Heparin oder Zitrat wurden als Antikoagulantien appliziert. Die IA wurde mittels IA-Geräten des Typs ADAsorb (Medicap clinic GmbH, Ulrichstein, Deutschland) gesteuert. Zur Plasmaseparation kamen Geräte des Typs BM-11 (Baxter Healthcare, Deerfield, USA) zum Einsatz. Bei einem Plasmafluss von 20 - 25 ml/min wurden 9.000 ml Plasma pro Sitzung

behandelt. Um die Adsorptionsleistung zu erhöhen, wurden zwei Modultriplets eingesetzt. Die beiden Säulen wurden abwechselnd in den extrakorporalen Kreislauf geschaltet, während die andere Säule durch Spülen mit NaCl-, PBS- und Glycinpuffer-Lösung regeneriert wurde (Abbildung 3). Gemäß den aktuellen Empfehlungen erhielten die Studienpatienten beider Gruppen kontinuierlich intravenös 200 - 800 internationale Einheiten (I.E.) unfraktioniertes Heparin pro Stunde, sofern keine Kontraindikation für eine derartige Antikoagulation vorlag. Bei einem Patienten in der Interventionsgruppe wurde aufgrund einer ausgeprägten Thrombozytopenie Zitrat als Antikoagulans verwendet.

3.3. Gemessene Parameter

3.3.1. Laboruntersuchungen

Zetralvenöse Blutproben wurden an Studientag 1 und 7, sowie vor und nach IA-Behandlung entnommen. Die Bluproben wurden bis zur Durchführung der Messungen bei -70°C gelagert. Als Indizes für Inflammation und monozytäre Funktion erfolgte die Bestimmung von LBP, IL-6, IL-8, IL-10 und TNF-α mittels halbautomatischer ELISA-Systeme (DPC-Biermann, Bad Nauheim, Deutschland). C5a wurde mit Hilfe eines optischen ELISA-Systems bestimmt (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Weiterhin wurde CRP immunturbidimetrisch bestimmt. Als Marker der monozytären Immunkompetenz wurde die monozytäre HLA-DR-Expression bestimmt (siehe 3.3.2). Immunparalyse wurde definiert als eine HLA-DR-Expression von weniger als 10.000 Molekülen pro CD14+ Monozyt. LPS wurde indirekt bestimmt, da die zur Verfügung stehenden direkten Messmethoden als unzuverlässig gelten [62, 63]. Es wurden die Surrogatparameter *Lipopolysaccharid Binding Protein* (LBP) und Procalcitonin (PCT) herangezogen. Die PCT-Messung erfolgte immunluminometrisch (BRAHMS-Diagnostica, Hennigsdorf, Deutschland). Bei der Kontrollgruppe wurde der Verlauf von IL-6, CRP, Leukozytenzahl und monozytärer HLA-DR-Expression verfolgt.

3.3.2. Monozytäre HLA-DR-Expression

Die standardisierte quantitative Bestimmung der HLA-DR-Expression auf CD14+-Monozyten erfolgte durchflusszytometrisch mittels QuantiBRITE^{TM}-Testsystem (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) [18]. Zum Einsatz kommt ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin konjugierter anti-HLA-DR-AK, sowie ein anti-CD14-AK, mit dem sich alle Monozyten markieren lassen. Mittels Eichkurven lässt sich aus den Fluoreszenzdaten die Anzahl der HLA-DR-Moleküle pro Zelle errechnen [18].

3.3.3. Klinische Scores

An den Studientagen 1, 4, 7, 14, 21 und 28 wurden folgende klinische Scores zur Erfassung des Krankheitsschweregrads erhoben: *Acute Physiology and Cronic Health Evaluation* II (APACHE II) [11], *Sepsis-related Organ Failure Assessment* (SOFA) Score [12] und der *Multiple Organ Failure* (MOF) Score [13].

3.4. Statistische Analyse

Die statistische Analyse der erhobenen Daten wurde mit Hilfe der Software *StatView* Version 5.0 (SAS-Institute, Cary, USA) durchgeführt. Als statistische Methoden kamen zum Einsatz: Varianzanalyse für wiederholte Messungen (*Analysis of Variance* [ANOVA]), einfacher und doppelter Student´s t-Test und der t-Test nach Fisher. Die Analyse von Subgruppen erfolgte mittels ANOVA mit t-Test. Die Normalverteilung aller Daten wurde mit dem Kolmogorow-Smirnov-Test überprüft. Ein Ergebnis wurde als signifikant betrachtet wenn $p < 0{,}05$ ist. Ergebnisse sind in der Form Mittelwert $\pm$ Standardfehler (SEM) dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1. Präklinische Charakterisierung der eingesetzten Antikörper und des Bindungsverhaltens

Die Kreuzreaktivität der eingesetzten anti-LPS-IgY-AK mit LPS verschiedener pathogenetisch relevanter Bakterienspezies wurde mittels direkten ELISA getestet. Die zur Immunisierung der Hennen eingesetzte LPS-/Lipid A-Mischung induzierte eine breite anti-LPS-IgY-Antikörperantwort, auch gegen nicht im Ansatz enthaltene LPS-Typen (Abbildung 4). Es zeigten sich anti-LPS-AK gegen LPS bzw. Lipid A der folgenden getesteten Bakterienspezies: *Escherichia (E.) coli J5*, *E. coli O55:B5*, *E. coli O111:B4*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli O128:B12*, *Salmonella enteritidis*, Lipid A von *E. coli F583*, *E. coli O127:B8*, *E. coli K-235*, *E. coli O26:B6*, *Salmonella abortus equii*, *Salmonella typhos* und *Serratia marcescens* (Abbildung 4). Abbildung 4 stellt die gemessenen Titer als Prozent der Titer des Kontroll-IgY (unspezifisches IgY) dar.

Entsprechend den Charakterisierungsuntersuchungen der anti-LPS-AK, wurden die anti-C5a- und anti-IL-6-AK untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass in beiden Fällen eine konzentrationsabhängige spezifische Bindung des jeweiligen Antigens erfolgt (Abbildung 5). Die Eigenschaften der Antigenbindung variieren erheblich zwischen Protein (C5a und IL-6) und LPS. C5a und IL-6 werden entsprechend einer gewöhnlichen AK-Antigen-Reaktion spezifisch adsorbiert (Abbildung 5). Die verwendeten Anti-C5a-IgY-AK binden C5a selbst in Gegenwart hoher C5-Konzentrationen. Das gebundene Antigen kann mittels saurer Puffer (Glycin) desorbiert werden. LPS hingegen binden mit hoher Affinität an Proteine und entsprechende Antikörper. Mit hohen Konzentrationen Natriumchlorids (NaCl) können etwa 90 Prozent der gebundenen LPS von der IA-Säule eluiert werden. In weiterführenden Untersuchungen wurde mit verkleinerten Adsorptionssäulen (0,5 ml bzw. 1,0 ml Sepharosegel) die Kinetik der Adsorption untersucht.

4.2. Klinische Studie

4.2.1. Patientencharakteristika

33 kaukasische Patienten wurden in die Studie eingeschlossen, 11 Patienten (10 männlich) in die Interventionsgruppe und 22 kontemporäre Patienten (19 männlich) als Kontrollkollektiv.

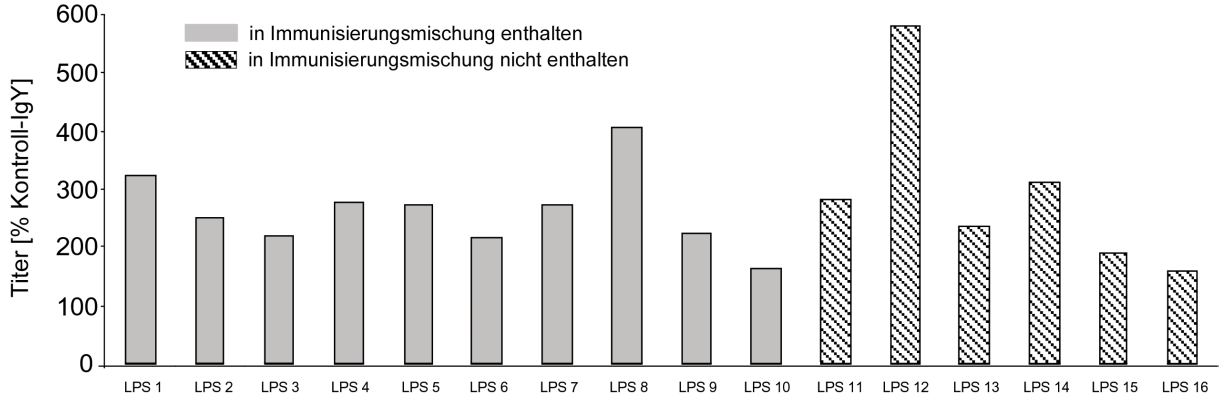

Abbildung 4.: Kreuzreaktivität des gereinigten anti-LPS-IgY mit verschiedenen LPS-Spezies.

Getestete LPS-Spezies: LPS 1: *E. coli J5*; LPS 2: *E. coli O55:B5*; LPS 3: *E. coli O111:B4*; LPS 4: *Pseudomonas aeruginosa*; LPS 5: *Salmonella typhimurium*; LPS 6: *Salmonella minnesota*; LPS 7: *Klebsiella pneumoniae*; LPS 8: *E. coli O128:B12*; LPS 9: *Salmonella enteritidis*; LPS 10: Lipid A *E. coli F583*; LPS 11: *E. coli O127:B8*; LPS 12: *E. coli K-235*; LPS 13: *E. coli O26:B6*; LPS 14: *Salmonella abortus equii*; LPS 15: *Salmonella typhos*; LPS 16: *Serratia marcescens*.

IgY - Immunglobulin Y, LPS - Lipopolysaccharide, E. coli - Escherichia coli.

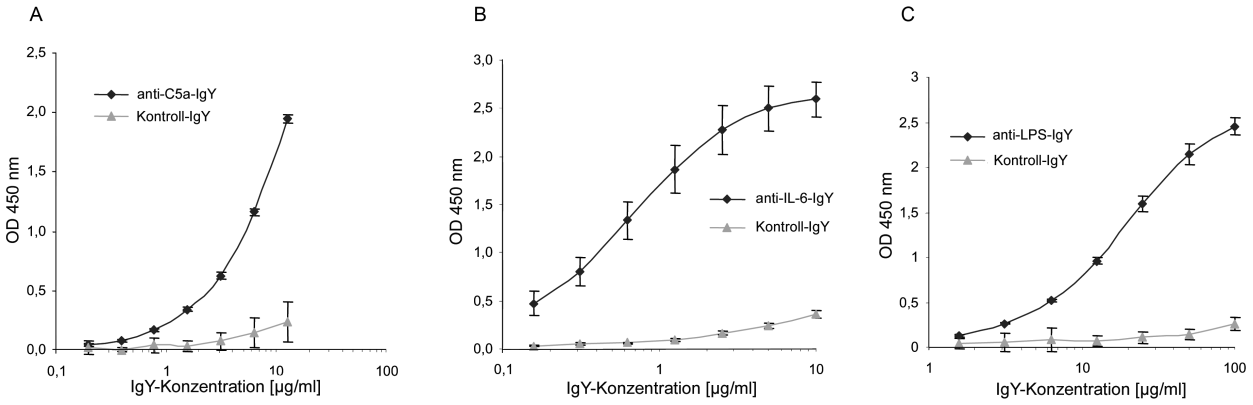

Abbildung 5.: Untersuchung der Antigenbindung der IgY-Antikörper.

A | Titration von anti-C5a-IgY und Kontroll-IgY (Testlösung mit 0,1 μg/ml rekombinantem humanem C5a). **B** | Titration von anti-IL-6-IgY und Kontroll-IgY (Testlösung mit 2 μg/ml rekombinantem humanem IL-6). **C** | Titration von gereinigte anti-LPS-IgY und Kontroll-IgY gegen eine Mischung von 5 LPS-Spezies (*E. coli J5*, *E. coli 128:B12*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*).

LPS - Lipopolysaccharide, OD - Optical Density, E. coli - Escherichia coli, IgY - Immunglobulin Y.

Tabelle 2.: Patientencharakteristika von Interventions- und Kontrollgruppe bei Studienbeginn.

Parameter		**Interventionsgruppe (n = 11)**	**Kontrollgruppe (n = 22)**	**Gruppenvergleich (p)**
Alter [Jahre]		57,8 ± 2,2	58,0 ± 2,6	0,96
Geschlecht [n]	weiblich männlich	1 10	3 19	1,00
ICU-Verweildauer bis Tag 1 [Tage]		6,0 ± 2,4	8,5 ± 1,8	0,41
Diagnose von Sepsis bis Tag 1 [Tage]		4,3 ± 1,1	7,3 ± 1,4	0,18
Schweregrad [n]	schwere Sepsis septischer Schock	5 6	9 13	1,00
klinische Scores	APACHE II SOFA MOF	23,7 ± 1,6 12,1 ± 1,1 11,4 ± 0,5	24,7 ± 1,2 10,4 ± 0,7 9,5 ± 0,5	0,60 0,18 **0,02**
monozytärer HLA-DR-Status [n]	Immunparalyse keine Immunparalyse	7 4	16 6	0,70
monozytäre HLA-DR-Expression [Moleküle pro Zelle]	alle Patienten Immunparalyse keine Immunparalyse	9291 ± 1960 4994 ± 1162 16811 ± 585	6788 ± 1153 4607 ± 600 14206 ± 2826	0,25 0,75 0,46
IL-6 [pg/ml]	(Normal <5,0)	361,7 ± 116,0	306,2 ± 65,0	0,65
CRP [mg/l]	(Normal <5,0)	251,0 ± 44,0	201,9 ± 26,0	0,30
Leukozyten [$\times 10^9$/l]	(Normal 4 - 12)	14,9 ± 3,0	13,4 ± 15,7	0,57

ICU - Intensivstation, APACHE II - Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II, SOFA - Sepsis-related Organ Failure Assessment, MOF - Multiple Organ Failure, HLA-DR - Human Leukocyte Antigen-DR, IL-6 - Interleukin-6, CRP - C-reaktives Protein. Immunparalyse ist definiert als monozytäre HLA-DR-Expression <10.000 Moleküle pro Zelle. Ein Unterschied ist signifikant, wenn $p < 0{,}05$ ist (fett gedruckt).

Tabelle 3.: Klinische Kennzahlen von Interventions- und Kontrollgruppe.

Parameter	**Interventionsgruppe (n = 11)**	**Kontrollgruppe (n = 22)**	**Gruppenvergleich (p)**
ICU-Verweildauer [Tage]	24,6 ± 8,1	58,0 ± 3,7	**0,01**
Krankenhaus-Verweildauer [Tage]	56,0 ± 41,1	76,6 ± 46,7	0,22
Beatmungsdauer [Tage]	17,6 ± 3,0	46,8 ± 3,2	**0,01**
Hämodialyse [Tage]	11,3 ± 2,4	16,0 ± 6,4	0,52

ICU - Intensivstation. Ein Unterschied ist signifikant, wenn $p < 0{,}05$ ist (fett gedruckt).

Die Patienten der beiden Gruppen unterschieden sich bei Studieneinschluss (Tag 1) nicht signifikant hinsichtlich Geschlechtsverteilung, Alter, Krankheitsdauer, Verweildauer auf der Intensivstation und Krankheitsschweregrad (gemessen an klinischen Scores). Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Patientencharakteristika der beiden Studiengruppen bei Studienbeginn.

In der Interventionsgruppe lag das Patientenalter zwischen 43 und 67 (57,8 ± 2,2) Jahren, in der Kontrollgruppe zwischen 38 und 77 (58,0 ± 2,6) Jahren (p = 0,96). Die durchschnittliche Verweildauer auf der Intensivstation bis zum Studieneinschluss war in der Interventionsgruppe 6 ± 2,4 Tage, in der Kontrollgruppe 8,5 ± 1,8 Tage (p = 0,41). Die Krankheitsdauer bis Studieneinschluss betrug in der Interventionsgruppe im Mittel 4,3 ± 1,1 Tage, im Kontrollkollektiv 7,3 ± 1,8 Tage (p = 0,18). Bei 5 bzw. 9 Patienten der Interventions- bzw. Kontrollgruppe bestand eine schwere Sepsis, bei 6 bzw. 13 Patienten ein septischer Schock (p = 1,00). Folgende Werte der klinischen Scores wurden bei Studienbeginn in der Interventions- bzw. Kontrollgruppe erhoben: APACHE II-Score 23,7 ± 1,6 bzw. 24,8 ± 1,2 (p = 0,60), SOFA-Score 12,1 ± 1,1 bzw. 10,4 ± 0,7 (p = 0,18) und MOF-Score 11,4 ± 0,5 bzw. 9,5 ± 0,5 (p = 0,02).

Interventions- bzw. Kontrollgruppe unterschieden sich zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses nicht hinsichtlich des Vorhandenseins einer Immunparalyse (7 bzw. 16 Patienten, p = 0,70), monozytärer HLA-DR-Expression (9.291 ± 1.960 bzw. 6.788 ± 1.153 Moleküle pro Zelle, p = 0,25), Leukozytenzahl (14,9 ± 3,0 bzw. 13,4 ± 15,7 $\times 10^9$/l, p = 0,57) und in den Serumspiegeln von CRP (251,0 ± 44,0 bzw. 201,9 ± 26,0 mg/l, p = 0,30) und IL-6 (361,7 ± 116,0 bzw. 306, 2 ± 65,0 pg/ml, p = 0,65).

Tabelle 4.: Verlauf des Vasopressorbedarfs in Interventions- und Kontrollgruppe.

	Interventionsgruppe (n = 11)			Kontrollgruppe (n = 22)			Gruppenvergleich (p)	
	Tag 1	Tag 7	p	Tag 1	Tag 7	p	Tag 1	Tag 7
Noradrenalindosis [μg/kg/min]	0,24 ± 0,1	0,03 ± 0,03	**0,01**	0,21 ± 0,1	0,11 ± 0,05	0,17	0,80	0,24

Ein Unterschied ist signifikant, wenn $p < 0{,}05$ ist (fett gedruckt).

Alle Patienten beider Gruppen erhielten das gleiche Ausmaß intensivmedizinischer Therapie, einschließlich extrakorporaler Nierenersatztherapie in Form von intermittierender Hämodialyse, falls indiziert (Tabelle 3). Bei den Patienten der Interventionsgruppe konnten eine signifikant kürzere Verweildauer auf der Intensivstation und eine signifikant kürzere Beatmungsdauer beobachtet werden (Tabelle 3). Nach der fünftägigen IA-Behandlung zeigte sich bei den Patienten der Interventionsgruppe ein signifikant reduzierter Bedarf an Vasopressoren, während sich der Bedarf in der Kontrollgruppe nicht signifikant veränderte (Tabelle 4).

In beiden Studiengruppen waren Pneumonie und Peritonitis die Haupterkrankungsformen, welche zur Ausbildung einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks führten. Die Verteilung der Grunderkrankung war nicht signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Gruppen. Alle Patienten der Interventionsgruppe überlebten den Behandlungszeitraum. Es traten keine Nebenwirkungen oder Komplikationen auf, die mit der IA in Zusammenhang gebracht wurden. Parameter der Blutgerinnung stabilisierten oder besserten sich unter der IA-Behandlung, so dass von einer Gerinnungsaktivierung durch Interaktion mit künstlichen Oberflächen im extrakorporalen Kreislauf nicht auszugehen ist (siehe 4.2.2.1 und Tabelle 5).

4.2.2. Messergebnisse

4.2.2.1. Laboruntersuchungen

Die Serumspiegel aller drei Zielmediatoren der IA bzw. deren Surrogatparameter wurden durch die IA-Behandlung reduziert (Abbildung 6).

Bei der Bestimmung im Anschluss an die letze IA-Behandlung betrugen die Spiegel von IL-6 bzw. C5a lediglich 11 Prozent bzw. 27 Prozent ($p = 0{,}02$ bzw. $p < 0{,}001$) des Ausgangswertes

Tabelle 5.: Ergebnisse der Laboruntersuchungen vor und nach Immunadsorptionsbehandlung.

	Parameter	Referenzbereich	**Vor IA (Tag 1)**	**Nach IA (Tag 7)**	**Veränderung**	**p**
Inflammation und Immunologie	IL-6 [pg/ml]	<5	361,7 ± 116,0	38,2 ± 15,2	-89%	**0,02**
	CRP [mg/l]	<5	251 ± 44,0	68,0 ± 21,0	-73%	**0,002**
	IL-10 [pg/ml]	<5	60,7 ± 36,0	14,6 ± 3,1	-76%	n.s.
	C5a [ng/ml]	<0,5	297,6 ± 43,1	79,2 ± 14,5	-73%	**<0,001**
	TNF-α [pg/ml]	<15	23,3 ± 4,5	12,4 ± 2,3	-47%	**0,02**
	PCT [μg/l]	<5	30,2 ± 19,7	4,7 ± 3,2	-84%	**0,02**
	LBP [μg/ml]	<15	75,9 ± 20,2	21,3 ± 4,5	-72%	**0,02**
Hämatologie und Gerinnung	Leukozyten [$\times 10^9$/l]	4 - 12	14,9 ± 3,0	14,7 ± 2,5	-1%	n.s.
	Thrombozyten [$\times 10^9$/l]	150 - 400	106,8 ± 22,4	187,5 ± 31,2	+76%	**0,03**
	Gerinnungsfaktor V [% (Faktor)]	0,6 - 1,5	1,3 ± 0,2	1,3 ± 0,3	+3%	n.s.
	Gerinnungsfaktor VIII [% (Faktor)]	0,5 - 1,5	3,6 ± 0,3	3,3 ± 0,5	-7%	n.s.
	D-Dimere [mg/l]	<0,5	3,5 ± 0,3	3,2 ± 0,7	-9%	n.s.
	Fibrinogen [μmol/l]	4,4 - 13,1	22,3 ± 3,8	14,4 ± 3,2	-64%	**0,04**
	Antithrombin-III [mg/l]	700 - 1300	592,0 ± 153,0	736,0 ± 163,0	+24%	**0,02**
	Protein-C-Aktivität [% (Faktor)]	0,7 - 1,4	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,2	+55%	**0,03**
	Protein-S-Aktivität [% (Faktor)]	0,7 - 1,4	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,6	+34%	n.s.

IA - Immunadsorption, IL-6 - Interleukin-6, CRP - C-reaktives Protein, IL-10 - Interleukin-10, C5a - Komplementfaktor C5a, TNF-α - Tumornekrosefaktor-α, PCT - Procalcitonin, LBP - Lipopolysaccharide Binding Protein, n.s. - nicht signifikant. Ein Unterschied ist signifikant, wenn $p < 0{,}05$ ist (fett gedruckt).

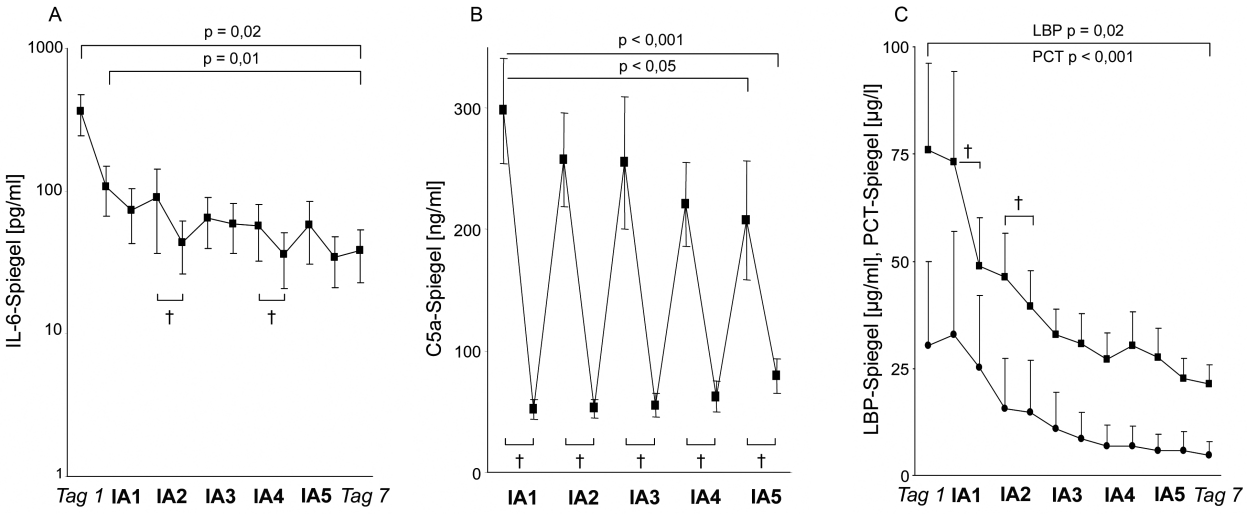

Abbildung 6.: Verlauf der Blutspiegel der Zielmediatoren unter IA-Behandlung.

A | Verlauf des mittleren IL-6-Spiegels (■) in der Interventionsgruppe unter IA-Therapie (logarithmische Skalierung). **B** | Verlauf des mittleren C5a-Spiegels (■) in der Interventionsgruppe unter IA-Therapie. **C** | Verlauf des mittleren LBP- (■) und PCT-Spiegels (●) in der Interventionsgruppe unter IA-Therapie. Signifikante Veränderungen sind mit † gekennzeichnet.

IL-6 - Interleukin-6, C5a - Komplementfaktor C5a, PCT - Procalcitonin, LBP - Lipopolysaccharid Binding Protein, IA - Immunadsorption, † - signifikant.

(Tabelle 5, Abbildungen 6A und 6B). Die Veränderung der Serumspiegel von IL-6 nach Immunadsorption (Tag 7) war auch im Vergleich mit den Tag 7-Werten der Kontrollgruppe signifikant: 38,2 ± 15,2 pg/ml in der Interventionsgruppe versus 230,6 ± 71,2 pg/ml in der Kontrollgruppe (p = 0,04, Tabelle 6).

Beide Surrogatmarker für die LPS-Blutspiegel waren zu diesem Zeitpunkt ebenfalls erniedrigt: Die Serumspiegel von LBP bzw. PCT betrugen 28 Prozent (p = 0,02) bzw. 16 Prozent (p = 0,02) des Ausgangswertes (Tabelle 5, Abbildung 6C).

Die Blutspiegel mehrerer Marker für Inflammation waren nach Abschluss der IA-Therapie erniedrigt. CRP wurde auf 27 Prozent (p = 0,002) und Fibrinogen auf 36 Prozent (p = 0,04) des jeweiligen Ausgangswertes reduziert (Tabelle 5). Die Veränderung von CRP nach Intervention (Tag 7) war auch im Gruppenvergleich signifikant: 68,0 ± 21,0 mg/l in der Interventionsgruppe gegenüber 160,8 ± 18,2 mg/l in der Kontrollgruppe (p = 0,004, Tabelle 6). Die Leukozytenzahlen unterschieden sich in der Interventions vor und nach IA, sowie in der Kontrollgruppe und im Gruppenvergleich nicht signifikant (Tabelle 6).

Zusätzlich stiegen die Protein-C- und Protein-S-Aktivität in der Interventionsgruppe um 55 Prozent (p = 0,03) bzw. 34 Prozent (nicht-signifikant) an, die Thrombozytenzahl um 76 Pro-

Tabelle 6.: Verlauf inflammatorischer Parameter in Interventions- und Kontrollgruppe.

	Interventionsgruppe (n = 11)			Kontrollgruppe (n = 22)			Gruppenvergleich (p)	
	Tag 1	Tag 7	p	Tag 1	Tag 7	p	Tag 1	Tag 7
IL-6 [pg/ml]	361,7 ± 116,0	38,2 ± 15,2	**0,02**	306,2 ± 65,0	230,6 ± 71,2	0,66	0,65	**0,04**
CRP [mg/l]	251,0 ± 44,0	68,0 ± 21,0	**0,002**	201,9 ± 26,0	160,8 ± 18,2	0,07	0,30	**0,004**
Leukozyten [$\times 10^9$/l]	14,9 ± 3,0	14,7 ± 2,5	0,94	13,4 ± 1,0	15,7 ± 1,8	0,05	0,57	0,68

IL-6 - Interleukin-6, CRP - C-reaktives Protein. Ein Unterschied ist signifikant, wenn $p < 0{,}05$ ist (fett gedruckt).

zent (p = 0,03). Diese Gerinnungsparameter veränderten sich von pathologisch subnormalen zu normalen Werten (Tabelle 5). Die Blutspiegel von Antithrombin-III (+24%, p = 0,02) und TNF-α (-47%, p = 0,02) normalisierten sich in der Interventionsgruppe (Tabelle 5).

In der Kontrollgruppe wurde bei keinem der untersuchten Laborparameter eine signifikante Veränderung festgestellt.

Weiterhin wurden in der IA-Gruppe keine Veränderungen der Blutspiegel von IgA, -G, -M, Glukose, Cholesterol, Triglyceriden, sowie der Gerinnungsfaktoren V, VII und VIII gemessen (Tabelle 5).

4.2.2.2. Immunologische Charakterisierung der Patienten

Die Expression von HLA-DR-Molekülen auf der Oberfläche CD14+ Monozyten wurde bestimmt, um festzustellen, ob es unter IA-Therapie zur Wiederherstellung der monozytären Funktion kommt.

Bei Studienbeginn bestand zwischen Interventions- und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied in der mittleren monozytären HLA-DR-Expression: 9.291 ± 1.960 Moleküle pro Zelle in der Interventionsgruppe gegenüber 6.788 ± 1.153 Molekülen pro Zelle in der Kontrollgruppe (p = 0,25, Tabelle 2). Bei der Messung nach Abschluss der IA-Behandlung (Tag 7) war die HLA-DR-Expression in der Interventionsgruppe nahezu um den Faktor 3 gegenüber der Kontrollgruppe an Tag 7 angestiegen: 17.746 ± 2.558 Moleküle pro Zelle in der Interventionsgruppe, 5957 ± 672 Moleküle pro Zelle in der Kontrollgruppe ($p < 0{,}0001$, Tabelle 7).

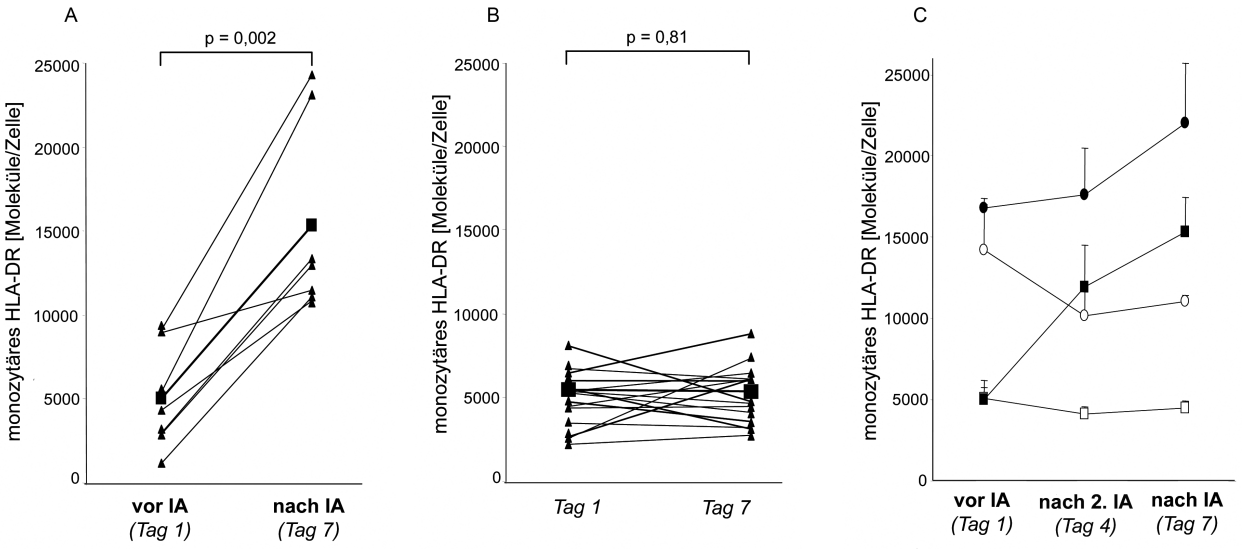

Abbildung 7.: Verlauf der monozytären HLA-DR-Expression.

A | Interventionsgruppe: Veränderung der monozytären HLA-DR-Expression vor (Tag 1) und nach (Tag 7) IA-Behandlung bei Patienten mit initialer IP (▲). Mittlere monozytäre HLA-DR-Expression (■). **B** | Kontrollgruppe: Veränderung der monozytären HLA-DR-Expression von Tag 1 bis Tag 7 bei Patienten mit initialer IP (▲). Mittlere monozytäre HLA-DR-Expression (■). **C** | Verlauf der mittleren monozytären HLA-DR-Expression von Studienbeginn (Tag 1) bis Abschluss der IA-Behandlung (Tag 7). Interventionsgruppe ohne IP (●), Kontrollgruppe ohne IP (○), Interventionsgruppe mit IP (■), Kontrollgruppe mit IP (□).

HLA-DR - Human Leukocyte Antigen-DR, IA - Immunadsorption, IP - Immunparalyse. Immunparalyse ist definiert als monozytäre HLA-DR-Expression <10.000 Moleküle pro Zelle.

Den deutlichsten Effekt auf die HLA-DR-Expression hatte die IA-Behandlung bei den Patienten, die initial als immunparalysiert klassifiziert worden waren (Tabelle 2). Bei dieser Patientengruppe war die mittlere monozytäre HLA-DR-Expression nach Abschluss der IA-Behandlung an Studientag 7 von initial 4.994 ± 1.162 auf 15.295 ± 2.197 Moleküle pro Zelle angestiegen und hatte damit mehr als das Dreifache des Ausgangswertes erreicht (p = 0,002, Tabelle 7, Abbildungen 7A und 7C). Es konnte beobachtet werden, dass bei allen diesen Patienten (n = 7) die initiale Immunparalyse unter IA-Therapie aufgehoben wurde (Abbildung 7A).

Im Gegensatz dazu war die mittlere HLA-DR-Expression in der Kontrollgruppe an Studientag 7 gegenüber dem Ausgangswert von Studientag 1 unverändert: von 6.788 ± 1.153 auf 5.957 ± 672 Moleküle pro Zelle (p = 0,32, Tabelle 7, Abbildungen 7B und 7C).

Alle Patienten der Kontrollgruppe, die sich bei Studienbeginn im Zustand der Immunparalyse befanden (n=16), waren zu den Messzeitpunkten an Tag 4 und 7 noch in diesem Zustand (Abbildungen 7B und 7C). Im Verlauf wurde ein weiterer Abfall der HLA-DR-Expression festgestellt (p = 0,81, Tabelle 7).

Tabelle 7.: Verlauf der monozytären HLA-DR-Expression in Interventions- und Kontrollgruppe.

	Interventionsgruppe (n = 11)			Kontrollgruppe (n = 22)			Gruppenvergleich (p)	
	Tag 1	Tag 7	p	Tag 1	Tag 7	p	Tag 1	Tag 7
alle Patienten (normal >15.000)	9291 ± 1960	17746 ± 2558	**0,003**	6788 ± 1153	5957 ± 672	0,32	0,25	**<0,0001**
mit Immunparalyse (<10.000 Moleküle/Zelle)	4994 ± 1162	15295 ± 2197	**0,002**	4607 ± 600	4464 ± 376	0,81	0,75	**<0,0001**
ohne Immunparalyse (>10.000 Moleküle/Zelle)	16811 ± 585	22035 ± 3659	0,38	14206 ± 2826	11303 ± 407	0,35	0,46	0,07

HLA-DR - Human Leukocyte Antigen-DR, angegeben in Molekülen pro CD14+ Monozyt.

Patienten der Interventionsgruppe ohne Immunparalyse (n=4) stiegen mit der HLA-DR-Expression unter IA-Therapie an (p = 0,38), während Kontrollpatienten ohne Immunparalyse (n=6) nicht signifikant absanken (p = 0,35, Tabelle 7).

4.2.2.3. Organfunktion (klinische Scores)

Bei Studienbeginn bestand zwischen Interventions- und Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied bezüglich der APACHE II- (23,7 ± 1,6 versus 24,7 ± 1,2, p = 0,6) und SOFA-Scores (12,1 ± 1,1 versus 10,4 ± 0,7, p = 0,18). Im MOF-Scoresystem ergaben sich bei Studienbeginn signifikant schlechtere Werte in der Interventionsgruppe (Tabelle 8).

Die Werte aller erhobenen klinischen Scores (APACHE II, SOFA und MOF) verbesserten sich sowohl im Interventionszeitraum von Studienbeginn bis Tag 7 (Tabelle 8), als auch im weiteren Verlauf des 28-tägigen Untersuchungszeitraumes in beiden Studiengruppen (Abbildung 8). Es wurde beobachtet, dass die Verbesserung der Krankheitsschwere in der Interventionsgruppe jedoch größer war und sich früher ereignete als bei den Kontrollpatienten. In der Gruppe der mit IA behandelten Patienten besserte sich der APACHE II-Score bereits nach der zweiten Behandlung signifikant (Abbildung 8). Nach Abschluss der IA-Therapie an Studientag 7 betrug der durchschnittliche APACHE II-Score in der Interventionsgruppe 14,3 ± 0,7 (p < 0,0001 gegenüber Tag 1); dies entspricht 60 Prozent des Ausgangswertes (Tabelle 8). SOFA- und MOF-Score zeigten ebenfalls eine signifikante Verbesserung in der Interventionsgruppe. An Studientag 7 waren SOFA- bzw. MOF-Score auf 7,1 ± 1,4 oder 59 Prozent (p = 0,004) bzw. 6,1 ± 1,1 oder 54 Prozent des Ausgangswertes (p = 0,0002 gegenüber Tag 1) gefallen (Tabelle 8). In der Kontrollgruppe gab es im Zeitraum von Studienbeginn

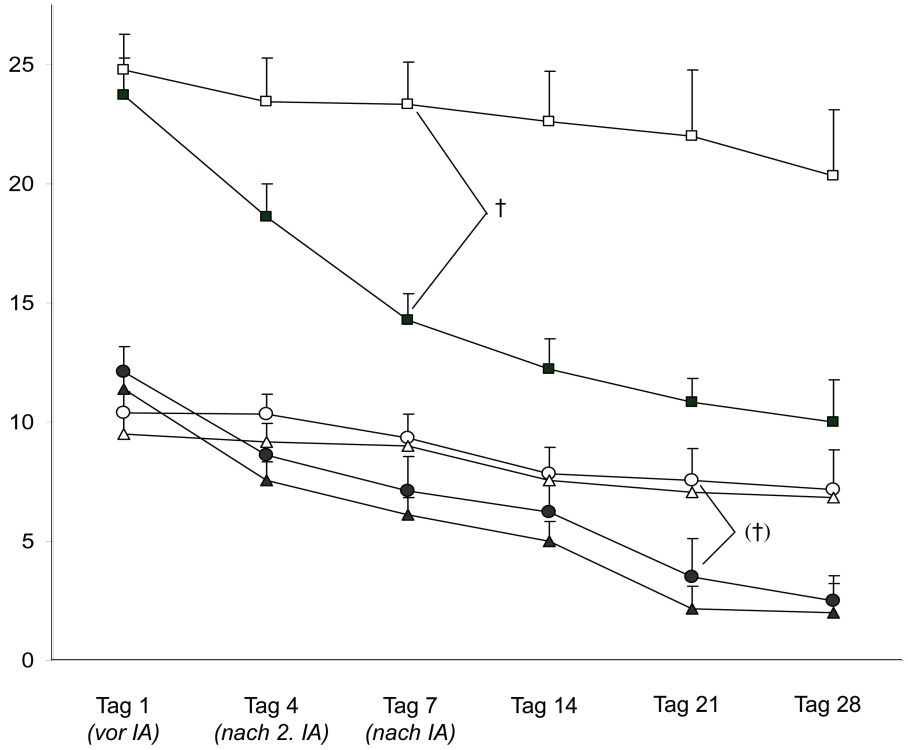

Abbildung 8.: Verlauf der klinischen Scores.

Dargestellt ist der Verlauf des durchschnittlichen APACHE II- Scores der Interventions- (■) und Kontrollgruppe (□), des SOFA-Scores der Interventions- (●) und Kontrollgruppe (○), sowie des MOF-Scores der Interventions- (▲) und Kontrollgruppe (△). Signifikante Unterschiede zwischen Interventions- und Kontrollgruppe sind mit † gekennzeichnet.

IA - Immunadsorption, APACHE II - Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II, SOFA - Sepsis-related Organ Failure Assessment, MOF - Multiple Organ Failure, † - signifikant.

bis Studientag 7 keine signifikante Veränderung des APACHE II-, SOFA- oder MOF-Scores (Tabelle 8). Zum Ende des Interventionszeitraumes an Tag 7 hatte die Interventionsgruppe signifikant bessere APACHE II- und MOF-Werte als die Kontrollgruppe (Tabelle 8) und – obwohl sich alle Scores im weiteren Beobachtungszeitraum in beiden Studiengruppen kontinuierlich verbesserten – konnte in der Interventionsgruppe eine deutlichere Verbesserung festgestellt werden (Abbildung 8).

4.2.2.4. Nachbeobachtungszeitraum

Zwölf der insgesamt 33 Studienpatienten verstarben im Verlauf des 21-tägigen Nachbeobachtungszeitraumes im Anschluss an den Interventionszeitraum. Vier der Todesfälle ereigneten sich bei Patienten der Interventionsgruppe. Zwei davon hatten eine sepsisbezogene Todesursache: Ein nicht beatmeter Patient entwickelte eine infizierte Gangrän und verweigerte eine

Tabelle 8.: Verlauf der Krankheitsschwere: Klinische Scores in Interventions- und Kontrollgruppe.

	Interventionsgruppe (n = 11)			**Kontrollgruppe (n = 22)**			**Gruppenvergleich (p)**	
	Tag 1	Tag 7	p	Tag 1	Tag 7	p	Tag 1	Tag 7
APACHE II	23,7 ± 1,6	14,3 ± 0,7	**<0,0001**	24,7 ± 1,2	23,3 ± 1,4	0,17	0,60	**0,0001**
SOFA	12,1 ± 1,1	7,1 ± 1,4	**0,004**	10,4 ± 0,7	9,3 ± 0,8	0,09	0,18	0,15
MOF	11,4 ± 0,5	6,1 ± 1,1	**0,0002**	9,5 ± 0,5	9,0 ± 0,5	0,13	**0,02**	**0,01**

APACHE II - Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II, SOFA - Sepsis-related Organ Failure Assessment, MOF - Multiple Organ Failure. Ein Unterschied ist signifikant, wenn $p < 0{,}05$ ist (fett gedruckt).

spezifische chirurgische Therapie, ein Weiterer verstarb im Kreislaufversagen. Die zwei nicht sepsisbezogenen Todesfälle in der Interventionsgruppe ereigneten sich wegen Nachblutung nach chirurgischem Eingriff, sowie wegen Lungenarterienembolie nach wiederholten abdominellen Operationen. Bei allen Todesfällen in der Interventionsgruppe ergaben sich keine Hinweise darauf, mit der IA-Therapie in Bezug zu stehen.

In der Kontrollgruppe starben sieben Patienten an sepsisbezogenen Ursachen, ein weiterer Kontrollpatient verstarb (nicht sepsisbezogen) wegen Blutungen.

5. Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden prospektiven, kontrollierten Pilotstudie mit verblindeter Endpunktanalyse zeigen, dass durch simultane extrakorporale Immunadsorption von LPS, IL-6 und C5a bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock die Serumspiegel der drei Zielmediatoren effizient reduziert und eine monozytäre „Reaktivierung“ bewirkt werden kann. Des Weiteren wurden weitere prognoserelevante Veränderungen beobachtet: Die Reduktion der Zielmediatoren durch die IA korrelierte mit einer Normalisierung, bzw. einem Trend zu einer Normalisierung bei mehreren immunologischen Mediatoren (TNF-α, IL-10), Gerinnungsparametern (Thrombozyten, Protein C-Aktivität, Antithrombin-III) und Akute-Phase-Proteinen (CRP, Fibrinogen). Obwohl mehrere prognoserelavante Veränderungen beobachtet wurden, ist aufgrund der limitierten Fallzahl eine Aussage im Hinblick auf die Mortalität nicht möglich. Eine größere, randomisierte Studie sollte daher durchgeführt werden.

Bei den Patienten der Interventionsgruppe konnten eine signifikant kürzere Verweildauer auf der Intensivstation und eine signifikant kürzere Beatmungsdauer beobachtet werden (Tabelle 3). Nach der fünftägigen IA-Behandlung zeigte sich bei den Patienten der Interventionsgruppe ein reduzierter Bedarf an Vasopressoren (Tabelle 4). Ob auch unter der einzelnen IA-Behandlung ein reduzierter Vasopressorbedarf vorliegt, sollte in einer größeren Folgestudie untersucht werden. Diese Ergebnisse stützen die vorliegenden Erkenntnisse anderer Autoren, dass LPS, IL-6 und C5a Schlüsselrollen in der Pathogenese der Sepsis darstellen.

Weiterhin deuten die Studienergebnisse darauf hin, dass die IA-Intervention bei Sepsis das Patientenüberleben an Tag 28 verbessern könnte. Dies muss jedoch in einer größeren randomisierten Studie verifiziert werden, da die geringen Patientenzahlen in der vorliegenden Untersuchung keine statistischen Aussagen zum Überleben erlauben.

Die drei Mediatoren LPS, IL-6 und C5a wurden als Zielantigene ausgewählt, weil diese eine wesentliche Rolle in den pathophysiologischen Reaktionskaskaden der Sepsis spielen, zu einem Versagen der zellvermittelten Immunität führen und konsekutiv mit einer schlechten Prognose assoziiert sind.

Obwohl eine extrakorporale Intervention an sich theoretisch die Aktivierung von inflammatorischen Reaktionskaskaden bewirken könnte, wurde in der aktuellen Studie festgestellt, dass die Spiegel von IL-6 und CRP bei jedem einzelnen Patienten der Interventionsgruppe abfielen. Aus diesen Studienergebnissen kann daher geschlossen werden, dass inflammatorische Schlüsselmediatoren der Pathophysiologie der Sepsis durch eine selektive extrakorporale Intervention entfernt werden können. Die fehlenden Veränderungen der Plasmaspiegel von IgA,

-G und -M, des Blutzuckers, sowie der Blutspiegel von Cholesterol, Triglyceriden und der Gerinnungsfaktoren V, VII und VIII sprechen weiterhin für die Selektivität des angewandten IA-Verfahrens und die Biokompatibilität der verwendeten Materialien.

Mehrere Studien haben in den vergangenen Jahren den Ansatz untersucht, bei septischen Patienten proinflammatorische Mediatoren zu eliminieren bzw. zu reduzieren. In diesem Kontext kamen sowohl unselektive extrakorporale Therapieverfahren wie Plasmaseparation zum Einsatz, als auch verschiedene auf extrakorporalen Nierenersatzverfahren basierende Ansätze [53].

Lipopolysaccharide spielen eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der systemischen Inflammation. Jedoch zeigen neuere Ergebnisse aus der Grundlagenforschung sowie aus klinischen Studien, dass viele der zuvor definierten immunologischen Reaktionskaskaden durch andere Mediatoren und Stimuli neben LPS ausgelöst und aufrecht erhalten werden können [63, 64, 65]. In einigen Sepsisstudien wurde die Reduktion von LPS mittels extrakorporaler Verfahren untersucht. Diese Studien konnten jedoch keine Auswirkung auf das Überleben der behandelten Patienten demonstrieren [60, 53, 65, 66]. Die Ursachen für das Versagen der anti-LPS-Strategien liegen vermutlich in einer suboptimalen Dosis der jeweiligen Intervention. Des Weiteren scheint die Blockade eines einzelnen, mehr oder weniger kurzlebigen immunologischen Mediators bzw. der Eingriff in eine singuläre immunologische Kaskade aufgrund der Pleiotropie und Redundanz der Mediatoren und der Dynamik des Krankheitsverlaufs unzureichend.

In der vorliegenden Studie wurden neben LPS die zwei weiteren Schlüsselmediatoren IL-6 und C5a simultan mittels eines selektiven Verfahrens eliminiert. Endotoxin stimuliert die Expression von IL-6 und von Komplementprodukt C5a, welche beide verstärkend auf eine monozytäre Deaktivierung wirken.

Wolk et al. beschrieben, dass Endotoxin neben seiner Rolle in verschiedenen Inflammationskaskaden zur monozytären Deaktivierung beiträgt [26, 67]. Die monozytäre Immunfunktion wird durch LPS initial stimuliert, in der Folge jedoch dauerhaft deaktiviert [26]. Es ist bekannt, dass der endogene Mediator IL-10 eine temporäre Depression der monozytären Funktion bewirken kann [68, 69]. Obwohl beispielsweise bei Psoriasis-Patienten ähnlich hohe IL-10-Spiegel vorkommen wie bei septischen Patienten, kommt es hier nicht zur Immunparalyse [70]. Die monozytäre Deaktivierung durch IL-10 ist rasch reversibel, während LPS dauerhaft sowohl Zytokinsekretion, als auch HLA-DR-Expression bei Monozyten inhibiert [25]. Somit ist anzunehmen, dass die Entfernung von LPS aus dem Kreislauf der behandelten Patienten in unserer Studie zur beobachteten Wiederherstellung der monozytären HLA-DR-Expression beigetragen hat.

Die Annahme, dass die Intervention die Spiegel von zirkulierenden Lipopolysacchariden (LPS) signifikant reduziert, hängt von der Validität der angewendeten Messmethode ab. Derzeit können LPS-Spiegel aus Plasmaproben nicht zuverlässig direkt gemessen werden [63, 62]. Daher wurden in der vorliegenden Studie die Spiegel zweier Surrogatparameter (LBP und PCT) bestimmt. LBP ist ein sensitiver, jedoch nicht spezifischer Parameter in Bezug auf das Vorliegen einer Endotoxinämie. Die hepatische Produktion von LBP wird durch LPS, jedoch auch durch IL-6 stimuliert. Die beobachtete Reduktion des LBP-Spiegels in der Interventionsgruppe ist also nicht ausschließlich auf eine LPS-Reduktion zurückzuführen, sondern könnte durch die IL-6-IA teilweise mit verursacht sein.

Für den zweiten gemessenen Surrogatparameter Procalcitonin (PCT) konnte gezeigt werden, dass er ein sensitiver und spezifischer Marker für Endotoxinämie ist. PCT erlaubt die Unterscheidung zwischen bakteriellen und nicht-bakteriellen Ursachen von Inflammation [71, 72, 73, 74]. In einer von Simon et al. durchgeführten Metaanalyse für PCT wurde eine Sensitivität von 88 Prozent und eine Spezifität von 81 Prozent ermittelt [74]. Bei Aikawa et al. war PCT als Indikator für Sepsis in einer Multizenterstudie sowohl konventionellen Serummarkern, als auch Blutkulturen überlegen [75]. Verschiedene Autoren konnten zeigen, dass mittels PCT-Bestimmung bei erwachsenen Patienten Bakteriämie festgestellt bzw. ausgeschlossen werden kann [75, 76, 77]. Darüberhinaus hat PCT auch prognostische Aussagekraft hinsichtlich der Mortalität [73]. Die PCT-Bestimmung wurde von der *Food and Drug Administration* (FDA) als diagnostische Methode zugelassen [78]. Eine Grad-B-Empfehlung für das klinische Monitoring bei Sepsis wurde ausgesprochen. Hierbei wurde festgestellt, dass die PCT-Bestimmung die gleiche Validität wie kommerziell vertriebene Verfahren zur Messung von zirkulierendem Endotoxin hat.

Unter der fünftägigen Intervention wurde ein signifikanter Abfall sowohl von PCT als auch von LBP beobachtet. Von einer wirksamen Reduktion von zirkulierendem bakteriellem Endotoxin durch die angewandte Intervention ist auszugehen.

IL-6 wurde als Zielmolekül der IA gewählt, da bekannt ist, dass der IL-6-Serumspiegel eng mit der Krankheitsschwere bei entzündlichen Erkrankungen, sowie mit der Mortalität bei septischen Patienten korreliert [15, 30, 34, 73, 79]. Weiterhin ist bekannt, dass IL-6 durch kardiodepressive Effekte negative Auswirkung auf die Hämodynamik hat [35]. Es konnte beobachtet werden, dass unter IA-Therapie die Spiegel von zirkulierendem IL-6 signifikant abnahmen, jedoch trat dieser Effekt im Vergleich zur Veränderung der Spiegel von LBP und PCT zeitlich verzögert auf (Abbildung 6).

IL-6 deaktiviert Monozyten durch Aktivierung von *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT) 3 [80]. STAT 3 gehört zur Familie der STAT-Proteine, welche die Signale

von Zytokinrezeptoren an der Zelloberfläche an den Zellkern vermitteln [80]. IL-6 führt durch Bindung an den IL-6-Rezeptor zur Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT 3. Zu den intrazellulären Mechanismen, über die eine STAT 3-Aktivierung zur monozytären Deaktivierung führt, gehören die Inhibition des Transkriptionsfaktors NF-κB sowie Mechanismen zur Unterdrückung von Zytokinwirkungen (via *Suppressor of Cytokine Signaling* [SOCS] 3) [80]. Die Entfernung von IL-6 aus dem Kreislauf der Patienten hat also möglicherweise ebenso zu der beobachteten Wiederherstellung der monozytären Funktion in der Interventionsgruppe beigetragen.

Als dritten Faktor zielte die IA-Intervention auf das Anaphylatoxin C5a ab, da bekannt ist, dass systemisch messbare C5a-Spiegel mit der klinischen Krankheitsschwere bei Sepsis korrelieren. Erhöhte Spiegel von systemischem C5a reflektieren eine unkontrollierte Komplementaktivierung, ungerichtete Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, eine erhöhte Vasopermeabilität, sowie eine Beeinträchtigung des Abbaus mikrobieller Komplementaktivatoren [63, 37, 41, 42, 64, 65]. Des Weiteren konnte kürzlich gezeigt werden, dass C5a ein potenter Inhibitor der monozytären IL-12-Produktion ist und die IL-12-abhängige Produktion von IFN-γ hemmt [49]. IFN-γ ist wesentlich an der endogenen Wiederherstellung der monozytären Funktion beteiligt [49]. Die akute septische Kardiomyopathie spielt eine wichtige Rolle im Krankheitsbild von Sepsis und MOV [43]. Es konnte gezeigt werden, dass C5a in vitro wie in vivo myokarddepressiv wirkt und möglicherweise kausal an der septischen Kardiomyopathie beteiligt ist [45, 46]. Unter der Therapie konnte eine signifikante Reduktion der C5a-Spiegel in jeder Sitzung erreicht werden (Abbildung 6). Obwohl im Anschluss an jede IA-Sitzung ein erneuter Anstieg des C5a-Spiegels festzustellen war, wurden in keinem Fall Werte des jeweiligen Vortages erreicht, so dass insgesamt eine signifikante Reduktion von C5a um 73 Prozent über den gesamten Behandlungszeitraum zu verzeichnen war (Tabelle 5, Abbildung 6).

Die Studienergebnisse implizieren, dass im untersuchten Krankheitsbild offensichtlich massive C5a-Produktion und C5a-Degradation stattfinden. In Folgestudien könnte aufgrund des hohen „C5a-Umsatzes“ eine Erhöhung der Behandlungsdosis in Betracht gezogen werden.

Immunmodulatorische Therapien sollten den Nachweis einer immunologischen Wirksamkeit erbringen. In der vorliegenden Studie war die immunologische Charakterisierung der Studienpatienten daher unabdingbarer Bestandteil des Untersuchungsprotokolls. Um die zellvermittelte monozytäre Immunität zu erfassen, wurde die Expression von HLA-DR-Molekülen auf CD14+ Monozyten mittels eines kommerziell erwerblichen, standardisierten, quantitativen durchflusszytometrischen Tests bestimmt [18]. Eine verminderte monozytäre HLA-DR-Expression reflektiert hierbei ein Versagen der zellvermittelten Immunität [14, 19, 55]. *Human Leukocyte Antigen* (HLA)-DR-Moleküle (*Major Histocompatibility Complex* [MHC] Klasse II

Moleküle) auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen spielen eine wichtige Rolle im Rahmen der adaptiven Immunantwort. Die MHC Klasse II-vermittelte Antigenpräsentation ist von entscheidender Bedeutung für die Einleitung, Aufrechterhaltung und Regulierung einer adaptiven Immunantwort [17]. Verschiedene Autoren postulieren, dass eine reduzierte monozytäre HLA-DR-Expression eine beeinträchtigte monozytäre Antigenverarbeitung und -präsentation und eine eingeschränkte Stimulation adaptiver Immunmechanismen bedeutet, sowie mit gehäuftem Auftreten von sekundären Infektionen und Letalität korreliert [17, 19, 21, 81, 82, 83, 84, 85, 86]. Es konnte gezeigt werden, dass das monozytäre HLA-DR einen unabhängiger Prädiktor im Hinblick auf die Mortalität von Patienten mit septischem Schock darstellt [19, 82]. In der vorliegenden Studie wurde beobachtet, dass eine Zunahme der monozytären HLA-DR-Expression bei allen Patienten der Interventionsgruppe, nicht jedoch bei Kontrollpatienten auftrat. Bei allen IA-behandelten Patienten, bei denen initial eine Immunparalyse mit einer monozytären HLA-DR-Expression von weniger als 10.000 Molekülen pro CD14+ Monozyt bestand, kam es zu einer Konversion der Immunparalyse. Zwar erlaubt die Größe der Studiengruppen keine definitive Aussage in Hinblick auf die Mortalität, jedoch bestätigen die Beobachtungen der vorliegenden Studie die prognoserelevante Bedeutung der monozytären Immunität bei Patienten mit Sepsis: 71 Prozent der initial immunparalysierten Patienten in der Interventionsgruppe überlebten den Beobachtungszeitraum, während 50 Prozent der persistierend immunparalysierten Patienten der Kontrollgruppe überlebten. Die Ergebnisse zeigen, dass die simultane IA von LPS, IL-6 und C5a bei septischen Patienten einen wesentlichen Mechanismus der zellulären Immundefizienz aufhebt. Die Wiederherstellung der zellulären Immunkompetenz mittels selektiver IA könnte somit einen günstigen Einfluss auf das Überleben septischer Patienten haben. Dies muss in einer größeren randomisierten Folgestudie geklärt werden.

Die Erhebung der klinischen Scores nach verschiedenen Punktesystemen dient der Messung von Krankheitsschwere und des Ausmaßes von Organdysfunktion. Das etablierte *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* (APACHE) II-Scoresystem wird bei vielen Formen kritischer Krankheit angewendet, da es an Tag 1 eng mit der Krankenhausmortalität korreliert [11, 63]. Die Erhebung von drei unabhängigen Punktesystemen erfolgte in der vorliegenden Untersuchung, um mögliche Auswirkungen der IA auf die Organfunktion festzustellen. Neben dem APACHE II-Score wurde der SOFA-Score angewendet [12]. Der MOF-Score wurde ursprünglich entworfen, um speziell auf chirurgischen Intensivstationen Organdysfunktion zu messen [13]. Während des stationären Verlaufes aller Patienten war eine Verbesserung der Werte entsprechender Scoresysteme zu verzeichnen (siehe 4.2.2.3). Gegenüber der Kontrollgruppe zeigte sich jedoch, dass die Abnahme der Scores in der Interventionsgruppe schneller und nachhaltiger erfolgte.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse müssen bestimmte Einschränkungen der Studie berücksichtigt werden. An erster Stelle ist hier das nicht randomisierte Studiendesign zu nennen. Dieses ist Sicherheitsüberlegungen geschuldet, da bei allen IA-Behandlungen eine speziell ausgebildete, examinierte Dialyse-Fachpflegekraft anwesend zu sein hatte. Die Zuordnung zu den Studiengruppen erfolgte jedoch zufällig und war unabhängig von Zeitpunkt bzw. Wochentag. Da bei den Patienten des Kontrollkollektivs keine unspezifische Immunadsorptionsbehandlung (sogenanntes „*sham treatment*“) durchgeführt wurde, besteht theoretisch die Möglichkeit, dass beobachtete Effekte durch die extrakorporale Zirkulation und Plasmaseparation an sich verursacht sind. Weiterhin bleibt ein theoretisch möglicher Einfluss von Volumentherapie und Therapie mit Blutprodukten (Verdünnung/Substitution) unklar. Dies sind Limitationen der vorliegenden Untersuchung.

Weiterhin könnte auch die Einführung eines neuen Therapieverfahrens im Rahmen einer Studie im Sinne eines Hawthorne-Effekts zu einer verbesserten Behandlungsqualität bei den Patienten der Interventionsgruppe geführt haben. Obwohl eine derartige Beeinflussung der Studienergebnisse nicht ausgeschlossen werden kann, scheint dies nicht für die zu beobachtenden Effekte der extrakorporalen Therapie verantwortlich.

Alle beobachteten Parameter - mit Ausnahme der klinischen Scores - wurden verblindet erhoben. Die Behandlung aller Patienten erfolgte gemäß den aktuellen international anerkannten Behandlungsleitlinien. Alle Patienten erhielten die gleiche zugrunde liegende supportive Intensivtherapie.

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um die erste Studie, die zeigt, dass die gleichzeitige, selektive Reduktion von zirkulierendem Endotoxin, IL-6 und C5a durch ein extrakorporales Verfahren bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock den Verlauf der monozytären Deaktivierung günstig beeinflusst [61]. Weiterhin war eine Verbesserung von Organfunktion, gemessen an drei klinischen Scores, zu beobachten [61]. Wichtig erscheint, dass aufgrund der Limitationen der Untersuchung die Frage offen bleibt, ob die Intervention die Überlebensraten von septischen Patienten verbessert. Die Ergebnisse dieser frühen Pilotstudie bedürfen somit der Verifizierung durch eine größere randomisierte Folgestudie.

6. Zusammenfassung

Bei schwerer Sepsis und septischem Schock lösen Endotoxin (Lipopolysaccharide - LPS), Interleukin (IL)-6 und Komplementfaktor C5a inflammatorische Reaktionskaskaden aus, deren Aktivierung zum Versagen der monozytären Immunität führt (Immunparalyse). Dies geht in vielen Fällen mit nicht kontrollierbarer Infektion, chronifiziertem Multiorganversagen und einem letalem Ausgang einher. Die vorliegende Arbeit untersucht, ob durch simultane selektive extrakorporale Immunadsorption (IA) von LPS, IL-6 und C5a eine Reduktion der Mediatoren bei septischen Patienten erreicht werden kann, und ob hierdurch der Verlauf der monozytären Deaktivierung günstig beeinflusst und des Weiteren Organfunktion verbessert werden kann (Schefold et al., Shock, 2007 [61]).

In einer prospektiven, kontrollierten Pilotstudie mit verblindeter Endpunktanalyse wurden 33 Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock eingeschlossen. Zusätzlich zu leitliniengetreuer supportiver intensivmedizinischer Sepsistherapie erhielten 11 Patienten (Alter 57,8 ± 2,2 Jahre, *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation* [APACHE] II-Score 23,7 ± 1,6) an fünf aufeinander folgenden Tagen 7,5 Stunden pro Tag extrakorporale, plasmabasierte, simultane IA von LPS, IL-6 und C5a. In der Kontrollgruppe wurden bei 22 kontemporären Patienten (Alter 58,0 ± 2,6 Jahre, APACHE II-Score 24,8 ± 1,2) prognostisch relevante Parameter verfolgt. Als Beobachtungsendpunkte wurden die monozytäre Immunität (monozytäre HLA-DR-Expression), die Serumspiegel der Zielantigene und anderer Inflammationsparameter, sowie der Verlauf klinischer Scoresysteme herangezogen.

Bei Studieneinschluss bestand kein Unterschied zwischen den Studiengruppen. Unter IA wurde der durchschnittliche IL-6-Spiegel von 361,7 ± 116,0 pg/ml auf 38,2 ± 15,2 pg/ml ($p = 0{,}02$) und der C5a-Spiegel von 297,6 ± 43,1 ng/ml auf 79,2 ± 14,5 ng/ml ($p < 0{,}001$) reduziert. Zwei Marker für Endotoxinämie (PCT und LBP) wurden ebenfalls signifikant reduziert. IA-behandelte Patienten wiesen ein niedrigeres C-reaktives Protein (CRP), sowie niedrigere APACHE II-Scores an Studientag 7 auf als Patienten der Kontrollgruppe ($p = 0{,}004$ bzw. $p = 0{,}0001$). Die monozytäre HLA-DR-Expression verbesserte sich in der Interventionsgruppe, jedoch nicht in der Kontrollgruppe ($p < 0{,}0001$). Unter IA wurde bei allen Patienten mit initialer Immunparalyse die monozytäre HLA-DR-Expression wiederhergestellt (von 4993,6 ± 1162 Molekülen pro Zelle auf 15.295,3 ± 2197 Moleküle pro Zelle, $p = 0{,}002$).

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie erstmalig, dass die gleichzeitige, selektive Elimination von LPS, IL-6 und C5a bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock den Verlauf der monozytären Immunität günstig beeinflusst. Die Wiederherstellung der monozytären Funktion geht mit einer Verbesserung von Organfunktion, gemessen an klinischen

Scores, einher. Selektive extrakorporale IA könnte einen vielversprechenden neuen Therapieansatz in der Behandlung septischer Patienten darstellen. Dies trifft offenbar insbesondere für Patienten mit Immunparalyse zu. In einer größeren Folgestudie muss nun geprüft werden, ob eine solche selektive Immuntherapie zu verbesserten Überlebenszahlen septischer Patienten führt.

A. Literaturverzeichnis

[1] Bone, R. C., R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein und W. J. Sibbald: *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.* Chest, 101(6):1644–55, 1992.

[2] Levy, M. M., M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent und G. Ramsay: *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference.* Crit Care Med, 31(4):1250–6, 2003.

[3] Annane, D., P. Aegerter, M. C. Jars-Guincestre und B. Guidet: *Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network.* Am J Respir Crit Care Med, 168(2):165–72, 2003.

[4] Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo und M. R. Pinsky: *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care.* Crit Care Med, 29(7):1303–10, 2001.

[5] Reinhart, K., F. M. Brunkhorst, H. G. Bone, H. Gerlach, M. Grundling, G. Kreymann, P. Kujath, G. Marggraf, K. Mayer, A. Meier-Hellmann, C. Peckelsen, C. Putensen, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte und K. Werdan: *Diagnosis and Therapy of Sepsis : Guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine.* Internist (Berl), 47(4):356–373, 2006.

[6] Moerer, O., A. Schmid, M. Hofmann, A. Herklotz, K. Reinhart, K. Werdan, H. Schneider und H. Burchardi: *Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use.* Intensive Care Med, 28(10):1440–6, 2002.

[7] Cabre, L., J. Mancebo, J. F. Solsona, P. Saura, I. Gich, L. Blanch, G. Carrasco und M. C. Martin: *Multicenter study of the multiple organ dysfunction syndrome in intensive care units: the usefulness of Sequential Organ Failure Assessment scores in decision making.* Intensive Care Med, 2005.

[8] Singer, M., V. De Santis, D. Vitale und W. Jeffcoate: *Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation.* Lancet, 364(9433):545–8, 2004.

[9] Hotchkiss, R. S., P. E. Swanson, B. D. Freeman, K. W. Tinsley, J. P. Cobb, G. M. Matuschak, T. G. Buchman und I. E. Karl: *Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction.* Crit Care Med, 27(7):1230–51, 1999.

[10] Hotchkiss, R. S. und I. E. Karl: *The pathophysiology and treatment of sepsis.* N Engl J Med, 348(2):138–50, 2003.

[11] Knaus, W. A., E. A. Draper, D. P. Wagner und J. E. Zimmerman: *APACHE II: a severity of disease classification system.* Crit Care Med, 13(10):818–29, 1985.

[12] Vincent, J. L., R. Moreno, J. Takala, S. Willatts, A. De Mendonca, H. Bruining, C. K. Reinhart, P. M. Suter und L. G. Thijs: *The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine.* Intensive Care Med, 22(7):707–10, 1996.

[13] Lefering, R., R. J. Goris, E. J. van Nieuwenhoven und E. Neugebauer: *Revision of the multiple organ failure score.* Langenbecks Arch Surg, 387(1):14–20, 2002.

[14] Kox, W. J., T. Volk, S. N. Kox und H. D. Volk: *Immunomodulatory therapies in sepsis.* Intensive Care Med, 26 Suppl 1:S124–8, 2000.

[15] Oberholzer, A., C. Oberholzer und L. L. Moldawer: *Cytokine signaling–regulation of the immune response in normal and critically ill states.* Crit Care Med, 28(4 Suppl):N3–12, 2000.

[16] Volk, H. D., P. Reinke und W. D. Docke: *Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'.* Chem Immunol, 74:162–77, 2000.

[17] Reith, W., S. LeibundGut-Landmann und J. M. Waldburger: *Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator.* Nat Rev Immunol, 5(10):793–806, 2005.

[18] Docke, W. D., C. Hoflich, K. A. Davis, K. Rottgers, C. Meisel, P. Kiefer, S. U. Weber, M. Hedwig-Geissing, E. Kreuzfelder, P. Tschentscher, T. Nebe, A. Engel, G. Monneret, A. Spittler, K. Schmolke, P. Reinke, H. D. Volk und D. Kunz: *Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study.* Clin Chem, 51(12):2341–7, 2005.

[19] Monneret, G., A. Lepape, N. Voirin, J. Bohe, F. Venet, A. L. Debard, H. Thizy, J. Bienvenu, F. Gueyffier und P. Vanhems: *Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock.* Intensive Care Med, 32(8):1175–83, 2006.

[20] Schefold, J.C., D. Hasper, H.D. Volk und P. Reinke: *Sepsis: Time has come to focus on the later stages.* Medical hypotheses, 71(2):203–208, 2008.

[21] Hoflich, C. und H. D. Volk: *Immunomodulation in sepsis.* Chirurg, 73(11):1100–4, 2002.

[22] Saenz, J. J., J. J. Izura, A. Manrique, F. Sala und I. Gaminde: *Early prognosis in severe sepsis via analyzing the monocyte immunophenotype.* Intensive Care Med, 27(6):970–7, 2001.

[23] Rensing, H.: *Endotoxins. Pathogenetic meaning of sepsis.* Anaesthesist, 52 Suppl 1:S7–S13, 2003.

[24] Woltmann, A., L. Hamann, A. J. Ulmer, J. Gerdes, H. P. Bruch und E. T. Rietschel: *Molecular mechanisms of sepsis.* Langenbecks Arch Surg, 383(1):2–10, 1998.

[25] Wolk, K., W. Docke, V. von Baehr, H. Volk und R. Sabat: *Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis.* Pathobiology, 67(5-6):253–6, 1999.

[26] Wolk, K., W. D. Docke, V. von Baehr, H. D. Volk und R. Sabat: *Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance.* Blood, 96(1):218–23, 2000.

[27] Barton, B. E.: *IL-6: insights into novel biological activities.* Clin Immunol Immunopathol, 85(1):16–20, 1997.

[28] Van Snick, J.: *Interleukin-6: an overview.* Annu Rev Immunol, 8:253–78, 1990.

[29] Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen und F. Schaper: *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation.* Biochem J, 374(Pt 1):1–20, 2003.

[30] Cavaillon, J. M., M. Adib-Conquy, C. Fitting, C. Adrie und D. Payen: *Cytokine cascade in sepsis.* Scand J Infect Dis, 35(9):535–44, 2003.

[31] Lindmark, E., E. Diderholm, L. Wallentin und A. Siegbahn: *Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy.* Jama, 286(17):2107–13, 2001.

[32] Ridker, P. M., N. Rifai, M. J. Stampfer und C. H. Hennekens: *Plasma concentration of interleukin-6 and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men.* Circulation, 101(15):1767–72, 2000.

[33] Opal, S. M. und V. A. DePalo: *Anti-inflammatory cytokines.* Chest, 117(4):1162–72, 2000.

[34] Song, M. und J. A. Kellum: *Interleukin-6.* Crit Care Med, 33(12 Suppl):S463–5, 2005.

[35] Pathan, N., C. A. Hemingway, A. A. Alizadeh, A. C. Stephens, J. C. Boldrick, E. E. Oragui, C. McCabe, S. B. Welch, A. Whitney, P. O'Gara, S. Nadel, D. A. Relman, S. E. Harding und M. Levin: *Role of interleukin 6 in myocardial dysfunction of meningococcal septic shock.* Lancet, 363(9404):203–9, 2004.

[36] Kemper, C. und J. P. Atkinson: *T-cell regulation: with complements from innate immunity.* Nat Rev Immunol, 7(1):9–18, 2007.

[37] Ward, P. A.: *The dark side of C5a in sepsis.* Nat Rev Immunol, 4(2):133–42, 2004.

[38] Riedemann, N. C., R. F. Guo und P. A. Ward: *A key role of C5a/C5aR activation for the development of sepsis.* J Leukoc Biol, 74(6):966–70, 2003.

[39] Guo, R. F., N. C. Riedemann und P. A. Ward: *Role of C5a-C5aR interaction in sepsis.* Shock, 21(1):1–7, 2004.

[40] Riedemann, N. C., R. F. Guo und P. A. Ward: *The enigma of sepsis.* J Clin Invest, 112(4):460–7, 2003.

[41] Guo, R. F. und P. A. Ward: *Role of c5a in inflammatory responses.* Annu Rev Immunol, 23:821–52, 2005.

[42] Riedemann, N. C., R. F. Guo und P. A. Ward: *Novel strategies for the treatment of sepsis.* Nat Med, 9(5):517–24, 2003.

[43] Müller-Werdan, U., R. Prondzinsky, R. Witthaut, N. Stache, K. Heinroth, C. Kuhn, H. Schmidt, I. Busch und K. Werdan: *[The heart in infection and MODS (multiple organ dysfunction syndrome)].* Wien Klin Wochenschr, 109 Suppl 1:3–24, 1997.

[44] Müller-Werdan, U., H. Engelmann und K. Werdan: *Cardiodepression by tumor necrosis factor-alpha.* Eur Cytokine Netw, 9(4):689–691, Dec 1998.

[45] Hoesel, Laszlo M, Andreas D Niederbichler und Peter A Ward: *Complement-related molecular events in sepsis leading to heart failure.* Mol Immunol, 44(1-3):95–102, Jan 2007.

[46] Niederbichler, Andreas D, Laszlo M Hoesel, Margaret V Westfall, Hongwei Gao, Kyros R Ipaktchi, Lei Sun, Firas S Zetoune, Grace L Su, Saman Arbabi, J. Vidya Sarma, Stewart C Wang, Mark R Hemmila und Peter A Ward: *An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction.* J Exp Med, 203(1):53–61, Jan 2006.

[47] Riedemann, N. C., T. A. Neff, R. F. Guo, K. D. Bernacki, I. J. Laudes, J. V. Sarma, J. D. Lambris und P. A. Ward: *Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression.* J Immunol, 170(1):503–7, 2003.

[48] Ward, P. A., N. C. Riedemann, R. F. Guo, M. Huber-Lang, J. V. Sarma und F. S. Zetoune: *Anti-complement strategies in experimental sepsis.* Scand J Infect Dis, 35(9):601–3, 2003.

[49] Sala, A. la, M. Gadina und B. L. Kelsall: *G(i)-protein-dependent inhibition of IL-12 production is mediated by activation of the phosphatidylinositol 3-kinase-protein 3 kinase B/Akt pathway and JNK.* J Immunol, 175(5):2994–9, 2005.

[50] Huber-Lang, M., V. J. Sarma, K. T. Lu, S. R. McGuire, V. A. Padgaonkar, R. F. Guo, E. M. Younkin, R. G. Kunkel, J. Ding, R. Erickson, J. T. Curnutte und P. A. Ward: *Role of C5a in multiorgan failure during sepsis.* J Immunol, 166(2):1193–9, 2001.

[51] Dellinger, R. P., M. M. Levy, J. M. Carlet, J. Bion, M. M. Parker, R. Jaeschke, K. Reinhart, D. C. Angus, C. Brun-Buisson, R. Beale, T. Calandra, J. F. Dhainaut, H. Gerlach, M. Harvey, J. J. Marini, J. Marshall, M. Ranieri, G. Ramsay, J. Sevransky, B. T. Thompson, S. Townsend, J. S. Vender, J. L. Zimmerman und J. L. Vincent: *Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008.* Crit Care Med, 36(1):296–327, 2008.

[52] Reinhart, K. und W. Karzai: *Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned.* Crit Care Med, 29(7 Suppl):S121–5, 2001.

[53] Schefold, J., D. Hasper, C. Storm, M. Corsepius, R. Pschowski und P. Reinke: *Die extrakorporale Therapie septischer Patienten.* Intensivmedizin und Notfallmedizin, 44(2):57–63, 2007.

[54] Schefold, J.C., G. Monneret, D. Hasper, H.D. Volk und P. Reinke: *Consider delayed immunosuppression into the concept of sepsis.* Crit Care Med, in press, 2008.

[55] Volk, H. D., P. Reinke und W. D. Docke: *Immunological monitoring of the inflammatory process: Which variables? When to assess?* Eur J Surg Suppl, (584):70–2, 1999.

[56] Docke, W. D., F. Randow, U. Syrbe, D. Krausch, K. Asadullah, P. Reinke, H. D. Volk und W. Kox: *Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment.* Nat Med, 3(6):678–81, 1997.

[57] Nierhaus, A., B. Montag, N. Timmler, D. P. Frings, K. Gutensohn, R. Jung, C. G. Schneider, W. Pothmann, A. K. Brassel und J. Schulte Am Esch: *Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis.* Intensive Care Med, 29(4):646–51, 2003.

[58] Schneider, K. M.: *Plasmapheresis and immunoadsorption: different techniques and their current role in medical therapy.* Kidney Int Suppl, 64:S61–5, 1998.

[59] Schade, R., E. G. Calzado, R. Sarmiento, P. A. Chacana, J. Porankiewicz-Asplund und H. R. Terzolo: *Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine.* Altern Lab Anim, 33(2):129–54, 2005.

[60] Dellinger, R. P., J. M. Carlet, H. Masur, H. Gerlach, T. Calandra, J. Cohen, J. Gea-Banacloche, D. Keh, J. C. Marshall, M. M. Parker, G. Ramsay, J. L. Zimmerman, J. L. Vincent und M. M. Levy: *Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock.* Crit Care Med, 32(3):858–73, 2004.

[61] Schefold, J. C., S. von Haehling, M. Corsepius, C. Pohle, P. Kruschke, H. Zuckermann, H. D. Volk und P. Reinke: *A Novel Selective Extracorporeal Intervention in Sepsis: Immunoadsorption of Endotoxin, Interleukin 6, and Complement-Activating Product 5a.* Shock, 28(4):418–425, 2007.

[62] Cohen, J.: *The detection and interpretation of endotoxaemia.* Intensive Care Med, 26 Suppl 1:S51–6, 2000.

[63] Vincent, J. L. und E. Abraham: *The last 100 years of sepsis.* Am J Respir Crit Care Med, 173(3):256–63, 2006.

[64] Annane, D., E. Bellissant und J. M. Cavaillon: *Septic shock.* Lancet, 365(9453):63–78, 2005.

[65] Cohen, J.: *The immunpathogenesis of sepsis.* Nature, 420(6917):885–91, 2002.

[66] Venkataraman, R., S. Subramanian und J. A. Kellum: *Clinical review: extracorporeal blood purification in severe sepsis.* Crit Care, 7(2):139–45, 2003.

[67] Wolk, K., S. Kunz, N. E. Crompton, H. D. Volk und R. Sabat: *Multiple mechanisms of reduced major histocompatibility complex class II expression in endotoxin tolerance.* J Biol Chem, 278(20):18030–6, 2003.

[68] Woiciechowsky, C., K. Asadullah, D. Nestler, B. Eberhardt, C. Platzer, B. Schoning, F. Glockner, W. R. Lanksch, H. D. Volk und W. D. Docke: *Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury.* Nat Med, 4(7):808–13, 1998.

[69] Woiciechowsky, C., B. Schoning, W. R. Lanksch, H. D. Volk und W. D. Docke: *Mechanisms of brain-mediated systemic anti-inflammatory syndrome causing immunodepression.* J Mol Med, 77(11):769–80, 1999.

[70] Asadullah, K., W. Sterry, K. Stephanek, D. Jasulaitis, M. Leupold, H. Audring, H. D. Volk und W. D. Docke: *IL-10 is a key cytokine in psoriasis. Proof of principle by IL-10 therapy: a new therapeutic approach.* J Clin Invest, 101(4):783–94, 1998.

[71] Harbarth, S., K. Holeckova, C. Froidevaux, D. Pittet, B. Ricou, G. E. Grau, L. Vadas und J. Pugin: *Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis.* Am J Respir Crit Care Med, 164(3):396–402, 2001.

[72] Muller, B., K. L. Becker, H. Schachinger, P. R. Rickenbacher, P. R. Huber, W. Zimmerli und R. Ritz: *Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit.* Crit Care Med, 28(4):977–83, 2000.

[73] Pettila, V., M. Hynninen, O. Takkunen, P. Kuusela und M. Valtonen: *Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with suspected sepsis.* Intensive Care Med, 28(9):1220–5, 2002.

[74] Simon, L., F. Gauvin, D. K. Amre, P. Saint-Louis und J. Lacroix: *Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis.* Clin Infect Dis, 39(2):206–17, 2004.

[75] Aikawa, N., S. Fujishima, S. Endo, I. Sekine, K. Kogawa, Y. Yamamoto, S. Kushimoto, H. Yukioka, N. Kato, K. Totsuka, K. Kikuchi, T. Ikeda, K. Ikeda, K. Harada und S. Satomura: *Multicenter prospective study of procalcitonin as an indicator of sepsis.* J Infect Chemother, 11(3):152–9, 2005.

[76] Brunkhorst, F. M., O. K. Eberhard und R. Brunkhorst: *Discrimination of infectious and noninfectious causes of early acute respiratory distress syndrome by procalcitonin.* Crit Care Med, 27(10):2172–6, 1999.

[77] Chirouze, C., H. Schuhmacher, C. Rabaud, H. Gil, N. Khayat, J. M. Estavoyer, T. May und B. Hoen: *Low serum procalcitonin level accurately predicts the absence of bacteremia in adult patients with acute fever.* Clin Infect Dis, 35(2):156–61, 2002.

[78] BRAHMS-Diagnostica: *BRAHMS PCT LIA - 510(K) SUMMARY OF SAFETY AND EFFECTIVENESS http://www.fda.gov/cdrh/pdf4/k040887.pdf.* 2005 [cited 2007 November 8].

[79] Oberholzer, A., S. M. Souza, S. K. Tschoeke, C. Oberholzer, A. Abouhamze, J. P. Pribble und L. L. Moldawer: *Plasma Cytokine Measurements Augment Prognostic Scores As Indicators Of Outcome In Patients With Severe Sepsis.* Shock, 23(6):488–493, 2005.

[80] Lang, R.: *Tuning of macrophage responses by Stat3-inducing cytokines: molecular mechanisms and consequences in infection.* Immunobiology, 210(2-4):63–76, 2005.

[81] Hershman, M. J., W. G. Cheadle, S. R. Wellhausen, P. F. Davidson und Jr. Polk, H. C.: *Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient.* Br J Surg, 77(2):204–7, 1990.

[82] Lekkou, A., M. Karakantza, A. Mouzaki, F. Kalfarentzos und C. A. Gogos: *Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections.* Clin Diagn Lab Immunol, 11(1):161–7, 2004.

[83] Pachot, A., G. Monneret, A. Brion, F. Venet, J. Bohe, J. Bienvenu, B. Mougin und A. Lepape: *Messenger RNA expression of major histocompatibility complex class II genes in whole blood from septic shock patients.* Crit Care Med, 33(1):31–8; discussion 236–7, 2005.

[84] Strohmeyer, J. C., C. Blume, C. Meisel, W. D. Doecke, M. Hummel, C. Hoeflich, K. Thiele, A. Unbehaun, R. Hetzer und H. D. Volk: *Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients.* Cytometry B Clin Cytom, 53(1):54–62, 2003.

[85] Tschaikowsky, K., M. Hedwig-Geissing, A. Schiele, F. Bremer, M. Schywalsky und J. Schuttler: *Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients.* Crit Care Med, 30(5):1015–23, 2002.

[86] Volk, H. D., P. Reinke, D. Krausch, H. Zuckermann, K. Asadullah, J. M. Muller, W. D. Docke und W. J. Kox: *Monocyte deactivation–rationale for a new therapeutic strategy in sepsis.* Intensive Care Med, 22 Suppl 4:S474–81, 1996.

B. Abbildungsverzeichnis

1. Immunologische Phasen der Sepsis (nach Hotchkiss) 7
2. Aufbau eines Immunadsorptionsmoduls 11
3. Extrakorporale Immunadsorption von LPS, IL-6 und C5a 16
4. Kreuzreaktivität des gereinigten anti-LPS-IgY mit verschiedenen LPS-Spezies 20
5. Untersuchung der Antigenbindung der IgY-Antikörper 20
6. Verlauf der Blutspiegel der Zielmediatoren unter IA-Behandlung 25
7. Verlauf der monozytären HLA-DR-Expression 27
8. Verlauf der klinischen Scores 29

C. Tabellenverzeichnis

1. Sepsis - Definitionen der *ACCP/SCCM Consensus Conferences* 1991/2001 . 6
2. Patientencharakteristika bei Studienbeginn 21
3. Klinische Kennzahlen von Interventions- und Kontrollgruppe 22
4. Verlauf des Vasopressorbedarfs 23
5. Ergebnisse der Laboruntersuchungen vor und nach IA 24
6. Verlauf inflammatorischer Parameter 26
7. Verlauf der monozytären HLA-DR-Expression 28
8. Verlauf der Krankheitsschwere: Klinische Scores 30

D. Abkürzungsverzeichnis

ACCP/SCCM	American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine
AK	Antikörper
ANOVA	Analysis of Variance
APACHE II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
APC	Antigen Presenting Cells
BrCN	Cyanogenbromid
bzw.	beziehungsweise
C1q	Complement component 1, q
C3a	Komplementaktivierungsprodukt C3a
C5a	Komplementaktivierungsprodukt C5a
C5aR	C5a-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
E. coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
FiO_2	Inspiratorische Sauerstofffraktion
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
gp130	Glykoprotein 130
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen-DR
hsCRP	high-sensitivity CRP
I.E.	Internationale Einheiten
IA	Immunadsorption
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
kd	Kilodalton
LBP	Lipopolysaccharid Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharide
MAC	Membrane Attack Complex
MASP	MBL-Associated Serine Proteases
MBL	Mannose Binding Lectin
MD2	Lymphocyte Antigen 96 (Adapterprotein MD2)
MHC	Major Histocompatibility Complex
MODS	Multiorgandysfunktions-Syndrom
MOF	Multiple Organ Failure
MOV	Multi-Organ-Versagen
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte (optical density)
$PaCO_2$	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck

PaO_2	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCT	Procalcitonin
RA	Rezeptorantagonist
SEM	Standardfehler
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOCS	Suppressor of Cytokine Signaling
SOFA	Sepsis-related Organ Failure Assessment
SSC	Surviving Sepsis Campaign
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-alpha
z.B.	zum Beispiel

E. Danksagung

Frau Prof. Dr. med. P. Reinke danke ich herzlichst für die Möglichkeit, an dieser Studie mitarbeiten zu dürfen, sowie für die Überlassung des Themas und die fördernde Unterstützung bei der Bearbeitung.

Herrn Dr. med. J.C. Schefold danke ich für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und die stetige Bereitschaft zur kritischen Auseinandersetzung. Seine fachliche Kompetenz und die wertvollen Anregungen haben entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ich danke den Mitarbeitern des Instituts für medizinische Immunologie (Direktor Herr Prof. Dr. med. H.D. Volk), insbesondere Herrn Dr. med. S. Pfeiffer, für die Vermittlung von immunologischem Fachwissen und die Bearbeitung immunologischer Fragestellungen.

Zudem danke ich allen Ärztinnen und Ärzten, Krankenschwestern und Pflegern der Intensivstationen der Charité - Universitätsmedizin Berlin, die mir bei der Durchführung der klinischen Studie Hilfe geleistet haben. Besonderen Dank schulde ich Frau OÄ Dr. med. H. Zuckermann-Becker und ihrem Team der Intensivstation 105i, sowie dem Team der Station 43 für die freundliche Unterstützung meiner Arbeit.

Ohne meine Familie und meine Freunde hätte ich das Vorhaben nicht durchführen und fertigstellen können. Mein Dank gebührt allen, die durch ihre Hilfe, ihre Kritik und ihre bestärkenden Worte zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danke Anaïs.

F. Lebenslauf

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

G. Publikationsverzeichnis

Originalartikel:

Schefold, J.C., D. Hasper, C. Storm, M. Corsepius, R. Pschowski und P. Reinke: *Die extrakorporale Therapie septischer Patienten.* Intensivmedizin und Notfallmedizin, 44(2):57-63, 2007.

Schefold, J.C., S. von Haehling, M. Corsepius, C. Pohle, P. Kruschke, H. Zuckermann, H.D. Volk und P. Reinke: *A Novel Selective Extracorporeal Intervention in Sepsis: Immunoadsorption of Endotoxin, Interleukin 6, and Complement-Activating Product 5a.* Shock, 28(4):418-425, 2007.

Poster und Abstracts:

Schefold, J.C., M. Corsepius, C. Pohle, P. Reinke, H.D. Volk und P. Kruschke: *Immunoadsorption Of Endotoxin, IL-6 And C5a In Severe Sepsis And Septic Shock.: 202-T.* Society of Critical Care Medicine 35th Critical Care Congress, San Francisco, California, USA, January 7-11, 2006. 33(12) Abstract Supplement: A161, December 2005.

Schefold, J.C., M. Corsepius, C. Pohle, H.D. Volk und P. Reinke: *Immunoadsorption Of Endotoxin, IL-6 And C5a Reverses Immunoparalysis In Patients With Severe Sepsis And Septic Shock.* 7th International Conference On New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy, Berlin, Germany, February 16-19, 2006.

Schefold, J.C., M. Corsepius, C. Pohle, H.D. Volk und P. Reinke: *Immunoadsorption Of Lipopolysaccharides, IL-6 and Complement-Activation Product 5a In Severe Sepsis and Septic Shock.* 26th International Symposium on Intensive Care and Emergency Medicine, Brussels, Belgium, March 21-24, 2006. Critical Care, 10(Suppl 1):P288, 2006.

H. Eidesstattliche Erklärung

Ich, Malte Adrian Corsepius, erkläre an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Lipopolysaccharid-, Interleukin-6- und Komplementfaktor C5a- Immunadsorption bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock“ von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt wurden.

Datum: Unterschrift: