

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

DISSERTATION

Der Einfluss von GM-CSF auf den Tryptophan-Metabolismus und die
IDO-Aktivität bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock und
Sepsis-assoziiierter Immunsuppression

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

René Pschowski

aus Frankfurt (Oder)

Gutachter: 1. Priv.Doz. Dr. med. J. Schefold
 2. Prof. Dr. med. A. Walther
 3. Prof. Dr. med. A. Salama

Datum der Promotion: 24.02.2012

Die vorliegende Arbeit wurde als Substudie innerhalb einer doppelblinden placebo-kontrollierten multizentrischen randomisierten klinischen Studie konzipiert und durchgeführt. Die Hauptstudie enthält Experimente, welche gemeinsam mit den Doktoranden Fr. K. Hetzger und Hr. T. Baumann (Institut für medizinische Immunologie, Charite Berlin) durchgeführt wurden. Schwerpunkt und eigenständige wissenschaftliche Leistung der vorliegenden Promotionsarbeit ist die Durchführung der Substudie als auch die Analyse des Tryptophan-Katabolismus und der IDO-Aktivität bei Patienten mit sepsis-assoziiierter Immunsuppression unter Immunstimulation mit GM-CSF.

Folgende Teile der Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

1. Schefold JC, Zeden JP, **Pschowski R**, Hammoud B, Fotopoulou C, Hasper D, Fusch G, Haehling SV, Volk HD, Meisel C, Schütt C, Reinke P. Treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is associated with reduced indoleamine 2,3-dioxygenase activity and kynurenine pathway catabolites in patients with severe sepsis and septic shock. *Scand J Infect Dis.* **2009** Dec 4.
2. Meisel C, Schefold JC, **Pschowski R**, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med.* **2009** Oct 1;180(7):640-8. Epub 2009 Jul 9.

Die Arbeit wurde 2010 mit dem Roger Bone Preis der Deutschen Sepsis-Gesellschaft für eine herausragende Publikation auf dem Gebiet der klinischen Sepsisforschung ausgezeichnet.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|------|
| Publikationen: | III |
| Abkürzungsverzeichnis | VI |
| Zusammenfassung | VIII |
| 1 Einleitung..... | 1 |
| 1.1 Epidemiologie der schweren Sepsis und des septischen Schocks | 2 |
| 1.2 Pathogenese der Sepsis | 3 |
| 1.2.1 Immunpathogenese der Sepsis | 3 |
| 1.2.2 Tryptophan und Tryptophan-Metabolismus | 5 |
| 1.2.3 Indolamin-2,3-Dioxygenase [IDO] | 6 |
| 1.2.4 Biologische Effekte der IDO | 7 |
| 1.2.5 Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor [GM-CSF]. | 11 |
| 1.2.6 Pharmakologie von GM-CSF | 12 |
| 1.3 Diagnostik der Sepsis..... | 12 |
| 1.4 Leitliniengerechte Therapie der Sepsis | 14 |
| 2 Zielsetzung | 16 |
| 2.1 Hypothese | 16 |
| 2.2 Fragestellungen..... | 16 |
| 3 Material und Methoden..... | 17 |
| 3.1 Studienaufbau und Studiendesign..... | 17 |
| 3.2 Patientenkollektiv..... | 18 |
| 3.2.1 Einschlusskriterien | 18 |
| 3.2.2 Ausschlusskriterien | 20 |
| 3.3 Immunologische Diagnostik..... | 20 |
| 3.3.1 Bestimmung der Serumspiegel von IL-10, PCT, GM-CSF | 20 |
| 3.3.2 Bestimmung der Serumspiegel des monozytären TNF- α | 21 |
| 3.3.3 Flowzytometrische Bestimmung der monozytären HLA-DR-Expression | 21 |
| 3.3.4 Massenspektrometrische Bestimmung von Tryptophan- und Metabolitenserumspiegel, errechnete IDO-Aktivität..... | 23 |
| 3.4 Statistik..... | 24 |
| 4 Ergebnisse | 25 |
| 4.1 Allgemeiner Teil: Studienpopulation – Studieneinschluss | 25 |
| 4.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs..... | 26 |
| 4.2.1 Verlauf ausgewählter löslicher Entzündungsmediatoren | 29 |
| 4.2.2 HLA-DR-Expression und GM-CSF-Spiegel..... | 29 |
| 4.2.3 Nachbeobachtungszeitraum | 30 |

| | | |
|-------|--|----|
| 4.3 | Tryptophan-Metabolismus in den Studiengruppen..... | 31 |
| 4.3.1 | Tryptophan und Tryptophan–Metaboliten | 31 |
| 4.3.2 | Verlauf der Indolamin-2,3-Dioxygenase-Aktivität | 33 |
| 4.3.3 | IDO–Aktivität in Korrelation zur HLA–Expression | 34 |
| 4.3.4 | IDO–Aktivität in Korrelation zu löslichen Entzündungsmediatoren..... | 35 |
| 5 | Diskussion | 36 |
| 6 | Anhang..... | 40 |
| 6.1 | Abbildungsverzeichnis..... | 40 |
| 6.2 | Tabellenverzeichnis..... | 41 |
| 6.3 | Danksagung | 42 |
| 6.4 | Eidesstattliche Erklärung | 43 |
| 6.5 | Lebenslauf..... | 44 |
| 6.6 | Publikationsverzeichnis | 45 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 47 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------|--|
| ACCP/SCCM | American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine |
| ANOVA | Analysis of Variance |
| APACHE | Acute Physiology and Chronic Health Evaluation |
| APC | Antigenpräsentierende Zelle |
| AS | Aminosäuren |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| B-Zellen | Bursa Fabricii (B)-Lymphozyt |
| cAMP | Cyclisches Adenosinmonophosphat |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CI | Konfidenzintervall |
| COPD | Chronisch obstruktive Lungenerkrankung |
| CRP | C-reaktives Protein |
| CTLA-4 | Cytotoxic T-Lymphocyte – Associated Protein 4 |
| DSG | Deutsche Sepsis-Gesellschaft |
| ELISA | Enzyme Linked Immunosorbent Assay |
| G-CSF | Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor |
| GM-CSF | Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor |
| HLA-DR | Human Leukocyte Antigen-DR |
| Gpt/L | Giga-Parts pro Liter |
| HMGB-1 | High-Mobility-Group-Box Protein B1 |
| 5-HT | 5 Hydroxytryptamin |
| 5-HTP | 5-Hydroxytryptophan |
| IDO | Indolamin -2,3- Dioxygenase |
| IFN | Interferon |
| IL | Interleukin |
| INDOL 1 | Indoleamine 2,3 – Dioxygenase – Like Protein 1 |
| INF-γ | Interferon γ |
| ISF | International Sepsis Forum |
| JAK | Januskinase |
| LBP | Lipopolysaccharid Binding Protein |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| mAk/Zelle | Monoklonaler Antikörper/Zelle |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| MODS | Multiorgandysfunktions-Syndrom |
| MOV | Multi-Organ-Versagen |
| 1 – MT | 1 – Methyl – I – Tryptophan |
| MTH – Trp | Methylthiohydantoin – dl-Tryptophan |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NAD | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid |
| NADH | reduzierte Form des NAD |
| NADP | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat |
| n.s. | nicht signifikant |
| OD | Optische Dichte |
| PAMP | Pathogen Associated Molecular Patterns |
| PCT | Procalcitonin |
| PRR | Pattern Recognition Receptors |

| | |
|-------------------------------|--|
| SAPS | Simplified Acute Physiology <i>Score</i> |
| SEM | Standardfehler |
| SIRS | Systemic Inflammatory Response Syndrome |
| SOFA | Sequential Organ Failure Assessment |
| SSC | Surviving Sepsis Campaign |
| STAT | Signal Transducer and Activator of Transcription |
| sTREM | Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 |
| TZR | T-Zell-Rezeptor |
| TDO | Tryptophan-2,3-Dioxygenase |
| TGF-β | Transforming Growth Factor β |
| TH-Zellen | T-Helfer-Zellen |
| TISS | Therapeutic Intervention Scoring System |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| Trp | Tryptophan |

Zusammenfassung

Die schwere Sepsis und der septische Schock zeichnen sich durch eine kontinuierlich zunehmende Inzidenz und eine persistierend hohe Mortalität aus.¹ Pro-inflammatorische Reaktionskaskaden lösen bei persistierendem infektiösem Stimulus eine kompensatorische und häufig prolongierte anti-inflammatorische Wirtsreaktion aus. Die resultierende Sepsis-assoziierte Immunsuppression mit Versagen der zellvermittelten Immunität korreliert mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber sekundären nosokomialen Infektionen, protrahiertem Organversagen, einer längeren Krankenhausverweildauer und einer erhöhten Sterblichkeitsrate septischer Patienten.²

Indolamin 2,3- Dioxygenase (IDO), das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Tryptophan-Metabolismus, wird durch pro-inflammatorische Stimuli (u.a. LPS, lösliche Zytokinrezeptoren) induziert und ist als Proliferationsinhibitor infektiöser Erreger und zentraler Immunregulator bekannt. Die immunregulierende Wirkung von IDO beruht u.a. auf einer lokal erzeugten Tryptophan-Depletion und einer damit verbundenen Proliferationshemmung von Lymphozyten. Eine gesteigerte IDO-Aktivität in der Sepsis kann jedoch zur T-Zell-Dysfunktion mit Th-1-Zellapoptose und einem Anstieg toxischer vasodilatierender Tryptophan-Metabolite führen. Vorarbeiten zeigen, dass in der schweren Sepsis und dem septischen Schock die Aktivität von IDO etwa um den Faktor 3 erhöht ist.^{3 4 5}

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss des Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF), einem pro-inflammatorischen Zytokin, auf die IDO-Aktivität bzw. den Tryptophan-Metabolismus bei Patienten mit schwerer Sepsis/septischem Schock und Sepsis-assoziiierter Immunsuppression. Die Untersuchung wurde als Substudie einer prospektiven, randomisierten, placebo-kontrollierten Multicenterstudie durchgeführt. Zusätzlich zur Standardintensivtherapie („best supportive care“) erhielten 36 Patienten entweder subkutane Gaben von 4 µg/kg/KG GM-CSF für fünf Tage oder Placebo (subkutane Injektionen von 0.9% NaCl). Bei Rekonvaleszenz der HLA-DR-Expression (>15.000 Moleküle/Zelle) am Tag 5 wurde GM-CSF in der Dosis von 4 µg/kg/KG für drei weitere Tage fortgeführt. Bei fehlender Rekonvaleszenz der HLA-DR-Expression an Tag 5 erfolgte eine Dosisescalation auf 8 µg/kg/KG für drei Tage. Primäres Endziel der Studie war die

Wiederherstellung der monozytären Immunkompetenz bei septischen Patienten und Sepsis-assoziiierter Immunsuppression mittels GM-CSF.

Zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses konnte kein Unterschied in den Studienpopulationen bzgl. des Tryptophan-Metabolismus bzw. der IDO-Aktivität beobachtet werden. Die GM-CSF Therapie führte zu einer signifikant reduzierten IDO-Aktivität über das achttägige Behandlungsintervall ($35.2 \pm 21.0 \mu\text{M}$ [Studientag 1] vs. $21.6 \pm 9.9 \mu\text{M}$ [Studientag 9], $p = 0.02$). Ein statistischer Unterschied zwischen beiden Studiengruppen war am Studientag 9 festzustellen ($p = 0.03$). Des Weiteren konnten statistisch signifikant reduzierte Trp-Metaboliten (Kynureninsäure, Quinolinsäure) am Studientag 9 im Verumarm im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Als Zeichen der klinischen Rekonvaleszenz konnten reduzierte Entzündungsparameter und tendenziell verbesserte klinische Scores ($p = \text{n.s.}$) in der Verumgruppe beobachtet werden. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine GM-CSF induzierte Rekonstruktion der monozytären Immunität bei Patienten mit Sepsis-assoziiierter Immunsuppression mit Veränderungen des Tryptophan-Metabolismus und der IDO-Aktivität einhergeht.

Zusammenfassend zeigt die vorgelegte Studie erstmalig, dass die Gabe von GM-CSF bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock die (errechnete) IDO-Aktivität signifikant reduziert. Die reduzierte IDO-Aktivität sowie der Serumspiegel von Tryptophanmetaboliten waren mit einem Anstieg der absoluten Zahl CD4- und CD8 positiver T-Lymphozyten assoziiert. Eine weitere Assoziation mit Veränderungen des Zytokinprofils sowie günstigem Verlauf von klinischen Schweregradskalen wurde beobachtet. Obwohl die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Regulierung der IDO-Aktivität durch GM-CSF unklar bleiben, unterstreichen die vorliegenden Daten die Bedeutung von IDO im Kontext der Immunregulation bei Patienten mit Sepsis-assoziiierter Immunsuppression.

1 Einleitung

Sepsis ist eine systemische inflammatorische Wirtsreaktion auf eine Infektion.^{6 7} Laut ACCP/ SCCM - Konsens von 1992/2001 liegt eine Sepsis vor, wenn mindestens zwei der vier Kriterien des „systemic inflammatory response syndrome“ [SIRS], ätiologisch bedingt durch eine Infektion vorliegen (Tabelle 1). Die schwere Sepsis ist definiert als Sepsis mit zusätzlicher akuter Organdysfunktion, der septische Schock als Sepsis mit vorhandenem volumenrefraktärem Kreislaufversagen (Tabelle 1).^{8 9} Die unterschiedlichen Schweregrade der Sepsis korrelieren hierbei mit der Mortalitätsrate entsprechender Patienten.

| |
|---|
| I. Nachweis der Infektion Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien |
| II. Systemic inflammatory response syndrome (mind. 2 Kriterien) <ul style="list-style-type: none">• Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$) bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder -vesikale Messung• Tachykardie: Herzfrequenz ≥ 90 /min• Tachypnoe (Frequenz ≥ 20/min) o. Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4.3$ kPa/ ≤ 33 mmHg)• Leukozytose ($\geq 12000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild |
| III. Akute Organdysfunktion (mind. 1 Kriterium) <ul style="list-style-type: none">• Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium.• Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von 24 Stunden• Stunden oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\text{mm}^3$. Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein.• Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10$ kPa (≤ 75 mmHg) unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$-Verhältnis von ≤ 33 kPa (≤ 250 mmHg) unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.• Renale Dysfunktion: Eine Diurese von ≤ 0.5 ml/kg/h für wenigstens zwei Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins $> 2\times$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.• Metabolische Azidose: Base Excess ≤ -5 mmol/l oder eine Laktatkonzentration $> 1,5\times$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches. |
| Sepsis: Kriterien I und II, Schwere Sepsis: Kriterien I, II und III Septischer Schock: Kriterien I und II sowie für wenigstens eine Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck ≤ 90 mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck ≤ 65 mmHg oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck ≥ 90 mmHg oder den arteriellen Mitteldruck ≥ 65 mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären. |

Tabelle 1: Diagnosekriterien der Sepsis, schweren Sepsis und des septischen Schocks¹⁰

1.1 Epidemiologie der schweren Sepsis und des septischen Schocks

Nach Schätzungen des Kompetenznetzwerkes Sepsis „SepNet“ beträgt die Inzidenz der Sepsis ca. 80.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland, während die Inzidenz der schweren Sepsis und des septischen Schocks ca. 75.000 Einwohner pro Jahr in Deutschland beträgt. Frauen sind seltener betroffen. Mit ca. 60.000 Todesfällen stellen septische Erkrankungen somit in Deutschland die dritthäufigste Todesursache dar.¹¹ Die direkten anteiligen intensivmedizinischen Kosten für die Behandlung septischer Erkrankungsbilder liegen in Deutschland bei errechneten 1,77 Milliarden Euro. Die weiteren indirekten Kosten betragen geschätzt 4,5 Milliarden Euro.^{12 13} Ein Drittel aller intensivmedizinischen Kosten werden durch die Behandlung der Sepsis verursacht.

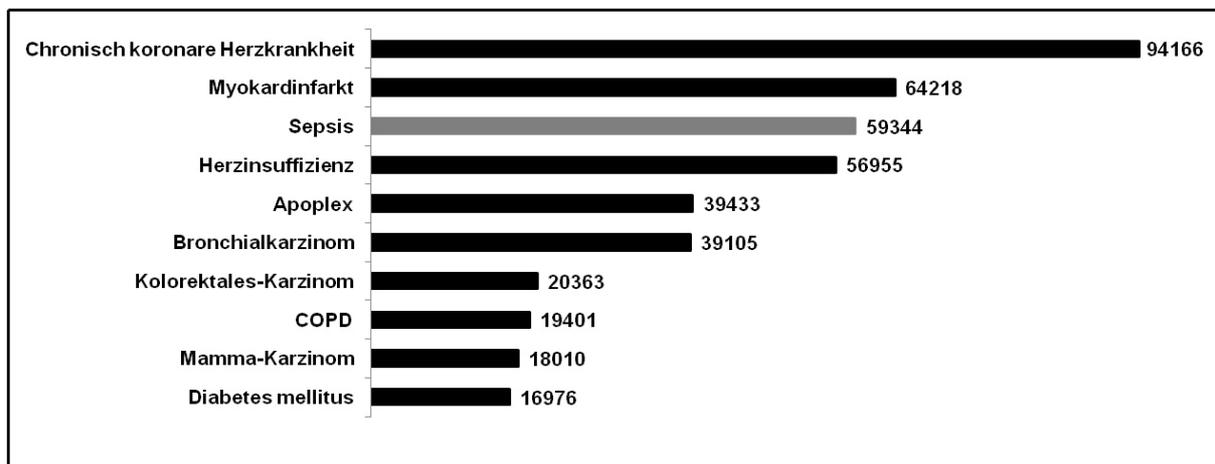


Abbildung 1: Anzahl der Todesfälle pro Jahr in Deutschland (Angaben: Statistisches Bundesamt)^{14 15}

1.2 Pathogenese der Sepsis

1.2.1 Immunpathogenese der Sepsis

Initial werden bei einer Immunantwort im Rahmen einer Sepsis gegenüber invasiven Mikroben durch die Gruppe der „pathogen recognition receptors“ molekulare essentielle Strukturmerkmale eines Pathogens (pathogen-associated molecular patterns) erkannt. Die PRRs wirken als Opsonine und verstärken die Wirtsreaktion.¹⁶ Durch Triggersubstanzen (u.a. Interleukine) erfolgt die Aktivierung von zellulären (Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen u.a.m.) und humoralen Systemen (Komplementsystem, Gerinnungssystem, Kininsystem). Monozyten sezernieren als eine der ersten zellulären Komponenten nach Antigenkontakt pro-inflammatorische Mediatoren (z.B. IL-1, IL-6, TNF- α). Diese pleiotropen Mediatoren koordinieren durch Interaktion komplexer feedback-regulierter Reaktionskaskaden die Immunantwort. Des Weiteren sind Monozyten zur Phagozytose befähigt und in der Lage, Bestandteile eines infektiösen Stimulus zu prozessieren und mittels MHC-II Molekülen auf ihrer Oberfläche zu präsentieren. Monozyten initiieren so die Entzündungsreaktion und induzieren eine adaptive Immunantwort. Diese sind als immunologische Schlüsselzellen in der Sepsis zu betrachten.

In der zellvermittelten adaptiven Immunantwort nehmen T-Zellen mit dem T-Zell-Rezeptor, der die Erkennung von auf Zelloberflächen der APC-Zellen präsentierten Antigenen über MHC-codierte Klasse-I- und Klasse-II-Rezeptoren ermöglicht, eine Schlüsselrolle ein. Die Bindung des TZR mit seinen immunphänotypischen Oberflächenmerkmalen „CD 4“ und „CD 8“ an einen passenden Antigenpeptid/MHC-Komplex eines Monozyten induziert die Proliferation der naiven T-Zelle. CD8+T-Zellen differenzieren in der Regel zu zytotoxischen T-Zellen, deren Hauptfunktion darin liegt intrazelluläre Antigene zu beseitigen. CD4+T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zu TH1- oder TH2-Zellen.¹⁷

Im Verlauf der Sepsis kommt es durch die Persistenz des inflammatorischen Stimulus zum Versagen der komplexen dynamischen Kontrollsysteme. Bei fehlender lokaler Eliminierung und Persistenz des infektiösen Stimulus entsteht initial eine systemische, pro-inflammatorische Entzündungsreaktion (SIRS) mit Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen. Die fulminante Produktion und das „systemische

Anfluten“ von pro-inflammatorischen Triggersubstanzen führt u.a. zu Zellfunktionsstörungen und morphologischen Destruktionen (direkte Zellschädigung) und Beeinträchtigung des nutritiven Blutflusses mit konsekutiver Gewebehypoxie (sekundäre Zellschädigung).¹⁸ Das Multiorganversagen stellt das klinische Korrelat als Endstrecke des septischen Prozesses dar.

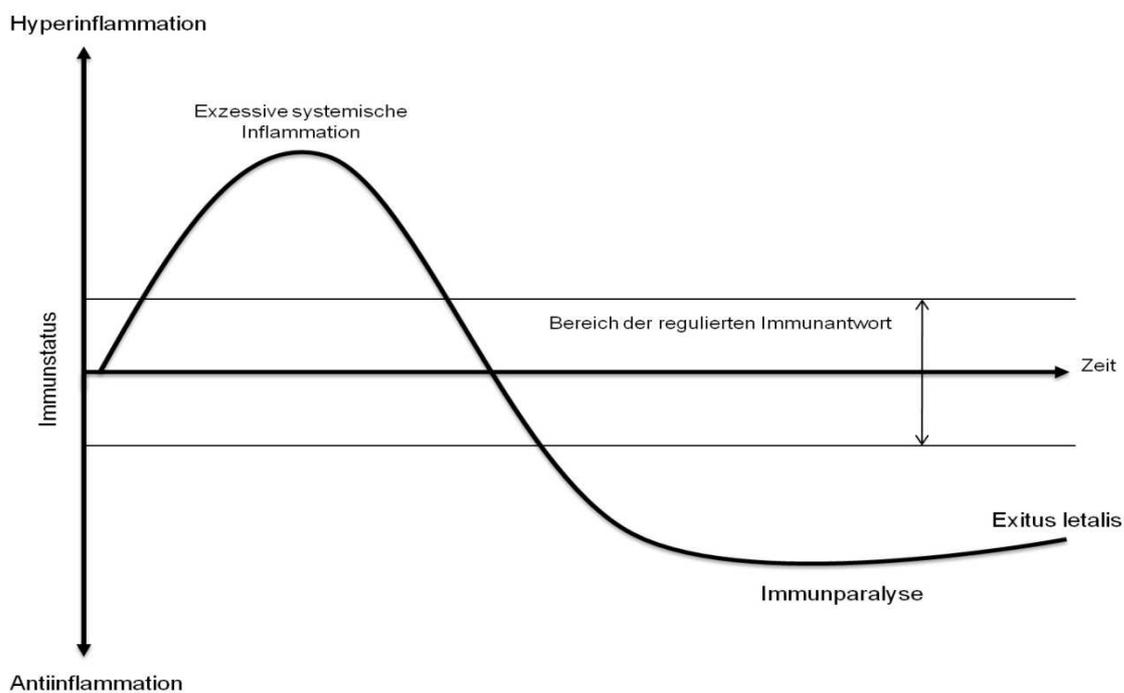


Abbildung 2: Hypothetischer Verlauf einer Immunreaktion in der Sepsis (nach Hochkiss¹⁹)

Der initialen Hyperinflammation in der Sepsis folgt eine kompensatorische Anti-Inflammation mit einem veränderten Zytokinprofil (Abb. 2). Pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 fördern die Produktion anti-inflammatorischer Mediatoren (z.B. IL-10 Transforming Growth Factor- β), um eine pathologisch überschießende Ausweitung der systemischen Entzündungsantwort zu inhibieren. Diese hemmen die Freisetzung von TNF- α und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen.^{20 21} Insbesondere CD4+T-Helferzellen, TH1-Zellen und TH2-Zellen, prägen durch ihr Zytokinprofil die Immunreaktionen in der Sepsis. Die anfängliche pro-inflammatorische Th1-Antwort, die durch Produktion von Interferon- γ und Interleukin-12 (IL-12) charakterisiert ist, kann in eine anti-inflammatorische Th2-Antwort (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 Produktion) übergehen. Eine prolongierte Anti-Inflammation in der Sepsis führt im weiteren Verlauf zu einer Deaktivierung der antigenpräsentierenden

Monozyten mit funktionellem Versagen des zellvermittelten Immunsystems.²² Die eingeschränkte monozytäre Immunkompetenz beeinträchtigt die Phagozytose und führt zu reduzierter Antigenverarbeitung und fehlender pro-inflammatorischer Zytokinausschüttung. Diese monozytäre Deaktivierung wurde als „Immunparalyse“ definiert und geht mit einer verminderten HLA-DR-Expression auf der Oberfläche von CD14+ Monozyten einher. Sie reflektiert das funktionelle Versagen des zellulären Immunsystems in der Sepsis. Die Sepsis-assoziierte Immunsuppression mit Verlust der zellvermittelten Immunität und höheren IL-10- und TNF- α -Spiegeln führt zu einem gehäuftem Auftreten von sekundären Infektionen, längerer Beatmungszeit und Krankenhausverweildauer sowie zu einem Anstieg der Gesamtmortalität.^{23 24 25 26 27}

1.2.2 Tryptophan und Tryptophan-Metabolismus

Die erstmalig 1901 beschriebene AS L-Tryptophan ist eine proteinogene α -Aminosäure mit einem aromatischen Indol-Ringsystem.²⁸ Wie Phenylalanin, Tyrosin und Histidin zählt Trp zu den aromatischen Aminosäuren. D-Tryptophan sowie das Racemat DL-Tryptophan scheinen nach heutigem Wissensstand von geringer Bedeutung zu sein.²⁹ Zwei Hauptwege des Trp-Metabolismus konnten bisher identifiziert werden. Der Metabolismus von L-Trp über den Serotoninweg ist Grundlage der Biosynthese des biogenen Monoamin Serotonin (5-Hydroxytryptamin).³⁰ 5-HT wirkt als Neurotransmitter im peripheren und zentralen Nervensystem, fungiert als Gewebshormon im extra-neuronalen Gewebe und ist Metabolit der Melatonin-Synthese in den Pinealozyten der Glandula pinealis. Außerhalb des Nervensystems fördert Serotonin die Thrombozytenaggregation, die Stimulation der Darmperistaltik und ist an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt.

Schätzungsweise 70-90% des Gesamt-Trp bilden den Ausgangspunkt des Kynurenin-Stoffwechselweges als zweiten Metabolismusweg mit den biologisch aktiven Endprodukten Kynurenin, Quinolin- und Kynureninsäure. Der Kynureninweg führt über die Biosynthese der Nicotinsäure zu den Coenzymen und essentiellen Redoxmetaboliten NAD⁺ und NADP⁺.³¹ Während die energiereiche, reduzierte Form NADH im oxidativen Stoffwechsel des Katabolismus als energielieferndes Coenzym der Atmungskette (ATP Generation) fungiert, dient die reduzierte Form NADPH im

Anabolismus als Lieferant von Elektronen und Protonen. Zusätzlich sind immunmodulierende Eigenschaften des Kynurenin-Stoffwechselweges bekannt: Mit dem Abbau des Tryptophans durch das den Kynurenin-Metabolismus geschwindigkeitsbestimmende Enzym Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) wird in der lokalen Umgebung die Proliferation infektiöser Stimuli und die Aktivierung von T-Zellen reduziert.³²

1.2.3 Indolamin-2,3-Dioxygenase [IDO]

Der Kynureninweg wird mittels oxidativer Öffnung des Indol-Ringes von Tryptophan zum N-Formylkynurenin initiiert. Geschwindigkeitsbestimmende Enzyme sind Tryptophan-2,3-Dioxygenase (TDO) und Indolamin-2,3-Dioxygenase. Das ausschließlich hepatisch exprimierte TDO reguliert die systemische L-Tryptophan-Homöostase. Die Transkription von TDO wird durch die Trp-Konzentration, Glucocorticoide und Glucagon reguliert.³³ Nach heutigem Kenntnisstand ist TDO nicht immunologisch durch Zytokine induzierbar.³⁴ Erste Arbeiten konnten antimikrobielle Effekte durch Trp-Depletion des Enzyms TDO aufzeigen.³⁵

Indolamin-2,3-dioxygenase wurde zum ersten Mal 1975 von Hayaishi et al. beschrieben.³⁶ Es handelt sich um ein glykosyliertes Enzym (43 kDa), welches Häm als prosthetische Gruppe enthält und in Anwesenheit von Sauerstoff die initiale und geschwindigkeitsbestimmende Umwandlung vom Tryptophan zu L-N-Formylkynurenin und Kynurenin entlang des Kynurenin-Stoffwechselweges katalysiert.³⁷ Während die hepatische TDO substratspezifisch ausschließlich Trp metabolisiert, besitzt die IDO ein breites Substratspektrum und kann die Indolamine L- und D-Tryptophan, Tryptamin, Serotonin, 5-HTP umsetzen.³⁸ IDO ist entgegen TDO nicht ausschließlich hepatisch gebunden und wird von vielen humanen Gewebetypen exprimiert, wobei der vollständige Kynurenin-Stoffwechsel nicht in allen humanen Zellen vorhanden ist.³⁹ Die Expression und Aktivität des nicht konstitutiv exprimierten Enzyms IDO ist durch immunologische Mediatoren wie Zytokine (TNF- α ⁴⁰, IFN- γ ⁴¹, IL-1 β), IFN- γ -Inducers wie Lipopolysaccharide, Prostaglandine und membranständige Rezeptoren (CD40⁴², CTLA-4⁴³, Toll-like Rezeptoren^{44 45}) reguliert. In der Promotorregion des IDO-Gens auf dem Chromosom 8 finden sich Anzeichen, die auf eine erhöhte Sensibilität des Gens für Typ I

Interferone (IFN- α,β) und in noch stärkerem Maße für Typ II Interferone (IFN- γ) über den JAK-STAT-Signalweg deuten.^{46 47}

Neuere Veröffentlichungen beschreiben ein drittes tryptophanumsetzendes Enzym im Kynurenin-Stoffwechselweg, welches aufgrund der genetischen Homologie als IDO-2, „indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein“ (INDOL1) bzw. als „indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein“ (proto-IDO) beschrieben wurde und eine IDO-ähnliche enzymatische Aktivität aufzeigt.⁴⁸ Die biologische Funktion von IDO-2 ist unklar. Das murine IDO-2 wurde in der Leber, Niere sowie in Epididymis und Testis nachgewiesen. Mittels rekombinanter Expression konnte gezeigt werden, dass die murine IDO-2 in der Lage ist, L-Tryptophan zu Kynurenin zu metabolisieren.⁴⁹

1.2.4 Biologische Effekte der IDO

IDO ist von zentraler Bedeutung in der anti-bakteriellen, anti-parasitären und anti-viralen Abwehr und wird durch pro-inflammatorische Stimuli (u.a. LPS, Typ I / II-Interferone, lösliche Zytokinrezeptoren) aktiviert.^{50 51} So konnte nach Stimulation mit IFN- γ eine IDO-Aktivierung in Makrophagen, dendritischen Zellen, Fibroblasten, Tumorzellreihen und Endothelzellen nachgewiesen werden.⁵² Voneinander unabhängige Arbeitsgruppen konnten die Hemmung der mikrobakteriellen Proliferation durch eine lokale Tryptophan-Depletion in der Umgebung eines infektiösen Stimulus, welche durch IDO verursacht wird, belegen. Die Empfindlichkeit der Mikroorganismen gegenüber der L-Tryptophan Depletion scheint in der Notwendigkeit der exogenen Zufuhr des Tryptophans, welches zur Proliferation notwendig ist, begründet. Byrne et al. zeigten erstmalig am Infektionsmodell mit *Chlamydia psittacci* eine Beteiligung der IDO in der IFN- γ vermittelten antibakteriellen Abwehr.^{53 54} In weiteren in vitro Infektionsexperimenten mit obligat intra- und extrazellulären Bakterien konnte durch die IFN- γ induzierte IDO-Aktivität die Proliferation der Bakterien gehemmt werden.^{55 56 57 58 59 60} Durch experimentelle Tryptophansupplementation oder Zugabe der Tryptophanalogika 1-Methyl-L-Tryptophan und Methylthiohydantoin-DL-Tryptophan konnte der nach IFN- γ -Stimulation vermittelte antibakterielle Effekt von IDO aufgehoben werden.^{61 62} Zum Ausschluss weiterer IFN- γ vermittelter, nicht enzymatisch induzierter

Effektormechanismen, die eine Proliferationshemmung von Mikroorganismen verursachen könnten, erfolgten Versuche mit rekombinanten IDO, die eine INF- γ unabhängige antibakterielle Wirkung zeigen konnten.^{63 64}

Neben antibakteriellen Effekten ist die INF- γ induzierte IDO-Expression ein antiviraler Effektormechanismus.^{65 66} Der Einfluss der Tryptophandegradation bei der Abwehr von Parasiten wurde am Infektionsmodell mit *Toxoplasma gondii* untersucht. So kann die Proliferation von *Toxoplasma gondii* in IDO-defizienten Wirtszellen trotz INF- γ Stimulation nicht inhibiert werden. Die Antigen-Präsentation über MHC II war hierbei nicht eingeschränkt.⁶⁷ In verschiedenen Zelllinien konnte die Reversibilität der Proliferationshemmung nach Tryptophansupplementation nachgewiesen werden. Anzumerken bleibt, dass die Hypothese des antimikrobiellen Effekts durch Tryptophandepletion kontrovers diskutiert wird. So besitzen einige Mikroorganismen die Fähigkeit aus Anthranilinsäure und Kynurenin Tryptophan zu synthetisieren. Diese Pathogene müssten spekulativ dem antimikrobiellen Effekt von IDO entgehen und einen höheren Virulenzfaktor besitzen.^{68 69}

Der immunsuppressive Charakter von IDO scheint für die Balance zwischen Pro-Inflammation und Anti-Inflammation in der Sepsis relevant. Die immunsuppressive Wirkung beruht u.a. auf einer ausgeprägten IDO-Aktivierung und der damit vermittelten T-Zellproliferationshemmung. Wird zunächst die für Mikroorganismen essentielle Konzentration an Tryptophan zur Proliferation durch IDO entzogen, erfolgt die Hemmung der T-Zell-Differenzierung bei ca. 10- bis 20-fach geringeren Tryptophankonzentrationen.⁷⁰ In Folge kommt es zur Induktion von T-Zellapoptose und Apoptoseinduktion aktivierter T-Zellen, wodurch eine T-Zell-vermittelte Immunantwort inhibiert wird. Munn et al. konnten beobachten, dass humane Makrophagen und weitere antigenpräsentierende Zellen durch IDO Aktivität Tryptophandepletion induzieren und konsekutiv die Proliferation von T-Zellen in vivo inhibieren.⁷¹ In Zellkultur aktivierte TH1-Zellen wurden unter Tryptophanmangel sensitiver gegenüber CD-95L-induzierter Apoptose. Nach Stimulation der T-Zellen im tryptophanarmen Medium waren diese zwar in der Lage in den Zellzyklus einzutreten jedoch kam es am Übergang von der G0- in die S-Phase zum Stillstand.⁷² Während in einer kontrollierten Immunantwort die Intensität der IDO durch die reduzierte Ausschüttung von INF- γ abnimmt, kommt es bei massiver pro-inflammatorischer Zytokinausschüttung zu vermehrter T-Zellfunktionsstörung und Apoptose.⁷³

Die Bildung von zytotoxischen Tryptophanmetaboliten des Kynureninwegs in antigenpräsentierenden Zellen wird neben der Tryptophan - Depletion als weiterer Regulationsweg für die Hemmung der T-Zellproliferation diskutiert („feedback-Loop“).^{74 75} 3-Hydroxyanthranilin Säure, 3-Hydroxykynurenin, Kynurenin und Quinolinsäure induzieren in der TH1-Zell-Population der Lymphozyten, jedoch nicht in der TH2-Zell-Population, eine CD-95L unabhängige Apoptose.⁷⁶ 3-Hydroxyanthranilinsäure und Quinolinsäure induzieren in vitro in aktivierten TH1 Zellen einen über Caspase-8 vermittelten Zelltod.⁷⁷ Durch Inhibierung und Apoptose von TH1-Zellen wird die Ausbildung einer zellvermittelten Immunantwort inhibiert und eine TH2-Zellen Antwort begünstigt. Die TH1-Zellen initiieren durch Sezernierung von IL-2, IFN- γ und TNF- α eine pro-inflammatorische Immunantwort, welche zur Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen führt und durch die IDO - Aktivierung (über lösliche Mediatoren) den Abbau von Tryptophan zu Kynurenin fördert. TH2-Zellen fördern durch die Interaktion mit B-Lymphozyten die Produktion von Antikörpern. Die Zytotoxizität der Try-Metaboliten für T-Zellen wurde in vitro nachgewiesen.⁷⁸ Ungeklärt ist jedoch, ob diese Zytotoxizität für die gehemmte T-Zellproliferation verantwortlich ist.

Ob die Induktion von IDO hypothetisch eher vermehrt dem Wirt oder dem Erreger Vorteile verschafft, ist Gegenstand der wissenschaftlichen Diskussion, da eine Tryptophan-Depletion neben der Hemmung der Proliferation des infektiösen Stimulus, wie erwähnt, zur Suppression von adaptiven T-Zellantworten führt. Die bisherige Datenlage suggeriert, dass die IDO-Aktivität eine regulatorische Rolle zwischen der Ausschüttung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen einnimmt.⁷⁹ Die Inhibierung der T-Zellproliferation durch eine erhöhte IDO-Aktivität könnte theoretisch die Pathophysiologie der Sepsis-assoziierten Immunsuppression verstärken. Gerade bei schweren klinischen Verläufen der Sepsis kann die Entwicklung eines „Shifts“ von Th1-Effektorzellen zu Th2-Helferzellen beobachtet werden. Dieser Effekt geht mit einem erhöhten Risiko von Organversagen und einer erhöhten Letalität einher.⁸⁰ Mit diesen Beobachtungen korrelierend, konnte eine um den Faktor 3 erhöhte IDO-Aktivität in der schweren Sepsis bzw. im septischen Schock beobachtet werden.^{81 82}
⁸³ Ob ein direkter funktioneller Zusammenhang besteht, bleibt jedoch aktuell unklar.

Neben dem immunologischen Effekt suggerieren aktuelle Daten einen regulatorischen vasodilatierenden Effekt von Kynureninen in der Sepsis. So konnte an septischen Patienten gezeigt werden, dass der Grad der Hypotension invers mit

der Höhe des Kynurenin-Spiegels korreliert. Hohe Konzentrationen von Kynureninen stimulieren die Aktivitäten der Guanylylzyklasen und Adenylatzyklasen. Guanylylzyklasen vermitteln über die Reduzierung der intrazellulären Calcium-Konzentrationen die gefäßdilatorische Wirkung von Stickstoffmonoxid. Adenylat katalysieren die Bildung von cAMP aus ATP, welches als „second messenger“ fungiert und zur Relaxation der glatten Muskulatur führen kann. Durch Behandlung mit einem IDO-Inhibitor (1-Methyl-Tryptophan) konnte bei endotoxinämie-induzierter Hypotonie bei Mäusen die Normalisierung des Blutdrucks erreicht werden.⁸⁴

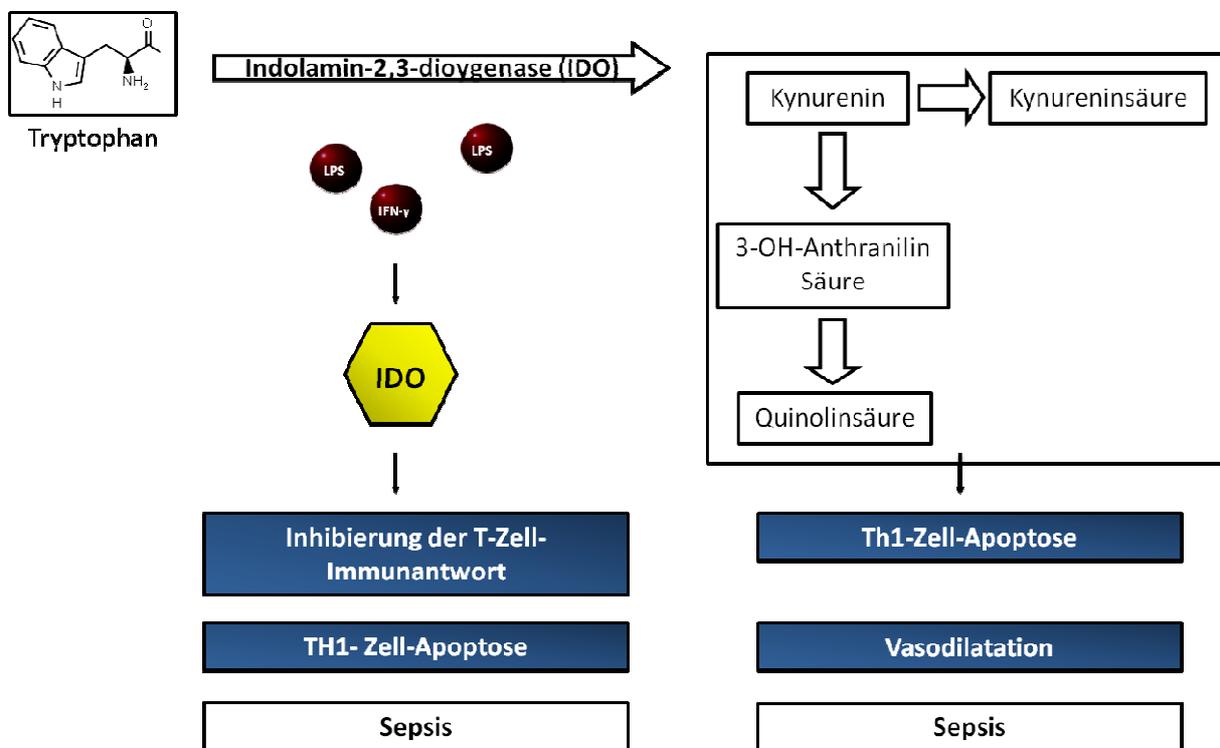


Abbildung 3: Tryptophan-Metabolismus und Sepsis-assoziierte IDO-Aktivität^{85 86}

1.2.5 Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor [GM-CSF]

Der Wachstumsfaktor Granulozyten–Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor [GM-CSF] ist ein 23-kD großer monomerer Wachstumsfaktor mit potenten immunstimulierenden Effekten. Das Glykoprotein, welches insbesondere von T-Zellen (durch IL-1,IL-2, IL-4 Einwirkung), Makrophagen und B-Zellen, sowie Mastzellen, Fibroblasten und Endothelzellen nach Aktivierung sezerniert wird, reguliert die irreversible Differenzierung und Proliferation von hämatopoetischen Vorläuferzellen und stimuliert die Synthese und Freisetzung von Zytokinen (IL 1, TNF- α).^{87 88} GM-CSF induziert alle Zelllinien mit Ausnahme der lymphozytären Reihe. Als Entzündungsmediator ist GM-CSF ein chemotaktischer Faktor und entfaltet die stärkste Wirkung auf die Granulozyten-Makrophagen-Linie, während die Thrombozyten einem geringen Einfluss unterliegen. GM-CSF verstärkt die antikörperabhängige, zellvermittelte Zytotoxizität von Neutrophilen, Eosinophilen und Makrophagen, sowie die Phagozytose von reifen neutrophilen Granulozyten. Neben der Proliferation und der Differenzierung erhöht GM-CSF in der Peripherie die Aktivität und Überlebensdauer ausgereifter neutrophiler Granulozyten und Makrophagen.^{89 90 91} Die Differenzierung von epidermalen Langerhans-Zellen zu dendritischen Zellen sowie die Einwanderung und Proliferation von Endothelzellen in nicht-hämatopoetische Gewebe wird durch die Freisetzung von GM-CSF angeregt.⁹²

Rekombinant gewonnenes GM-CSF, welches 1985 erstmals kloniert und sequenziert wurde, ist zur prophylaktischen und therapeutischen Regeneration des hämatopoetischen Systems nach Induktionschemotherapie-induzierter Neutropenie oder Knochenmarkstransplantation zugelassen.⁹³ In einer kontrollierten Studie mit 60 neutropenen septischen Neonaten konnte durch die Gabe von GM-CSF ein Anstieg der Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten bewirkt werden und eine Mortalitätsreduktion gezeigt werden.⁹⁴ In einer Pilotstudie wurde an zehn chirurgischen Intensivpatienten mit schwerer Sepsis gezeigt, dass die Gabe von GM-CSF zu einer Rekonvaleszenz der supprimierten monozytäre HLA-DR-Expression und gleichzeitig zur funktionellen Erholung der unspezifischen Immunantwort führt.⁹⁵ Weiterhin weisen Tiermodelle auf eine reduzierte Intensität bakterieller Last und Schwere von Pneumonien unter GM-CSF-Therapie hin.^{96 97 98 99}

1.2.6 Pharmakologie von GM-CSF

Pharmakodynamisch erreicht GM-CSF nach subkutaner Gabe innerhalb von zwei Stunden einen maximalen Plasmaspiegel. Des Weiteren resultiert aus der subkutanen Gabe ein stärkerer Anstieg der Neutrophilen-Zahl.¹⁰⁰ Die Plasmahalbwertszeit beträgt etwa drei Stunden. Nach intravenöser Gabe ergibt sich eine Halbwertszeit von ca. 1,5 bis 2 Stunden. Bekannte Nebenwirkungen bei wachen Patienten nach subkutaner Applikation sind multilokuläre Knochen- und Weichteilschmerzen, Kopfschmerzen sowie Müdigkeit. In Einzelfällen sind allergische Reaktionen beschrieben.^{101 102} Gelegentlich können transiente Erhöhungen der Harnsäure, der Laktatdehydrogenase und der alkalischen Phosphatase beobachtet werden. Bei langfristiger hochdosierter Gabe konnten vereinzelt Hyperleukozytosen beobachtet werden.¹⁰³

1.3 Diagnostik der Sepsis

Neben der Verwendung der ACCP/SCCM Kriterien zur Diagnose der Sepsis stehen Biomarker wie das C-reaktive Protein [CRP], die Leukozytenzahl, eine Linksverschiebung im Differentialblutbild und das Procalcitonin [PCT] zum Monitoring der Sepsis zur Verfügung. Diese Biomarker sind jedoch zum Teil durch eine verzögerte Induktion charakterisiert und erlauben zudem keine Aussage in Bezug auf die immunologische Phase bei Sepsis. PCT dient als Surrogat-Parameter und kann neben klinischen Kriterien zur Detektion von bakteriellen Infektionen herangezogen werden. PCT kann in der Sepsis den Grad der Bakteriämie reflektieren und ist prognostisch relevant.^{104 105 106 107 108 109} Ergänzend können im Rahmen der Immunaktivierung pro-inflammatorische Zytokine (insbes. IL-6, TNF- α) und anti-inflammatorische Zytokine (insbes. IL-10) als Zeichen einer infektionsbedingten Entzündungsgenese mittels semi-automatischer ELISA-Systeme und „point-of-care“-Tests gemessen werden. IL-6 führt zur monozytären Aktivierung und ist in der Entzündungskaskade dem TNF- α untergeordnet. Es aktiviert die Akute-Phase-Proteine, reguliert die Differenzierung und Proliferation von T-Lymphozyten und stimuliert die IgG-Sekretion der B-Lymphozyten.^{110 111 112} Der Serumspiegel des pro-inflammatorischen IL 6 sowie des anti-inflammatorischen IL-10 korrelieren mit der

Krankheitsschwere und der Mortalität septischer Patienten.^{113 114} Die diagnostische Aussagekraft der TNF- α -Serum-Spiegel ist durch die Halbwertszeit limitiert.¹¹⁵

Mit der Messung der Expression von MHC Klasse II Molekülen (Humanes Leukozyten Antigen, HLA-DR) auf CD14-positiven Monozyten steht ein Parameter zur Erfassung des Funktionszustandes von Monozyten zur Verfügung. Dieser Test korreliert mit der ex vivo Freisetzung von TNF- α aus Monozyten, welcher zur Beurteilung der monozytären Immunkompetenz dient, und kann als globaler, zellulärer Immunfunktionstest betrachtet werden, da die MHC Klasse II-vermittelte Antigenpräsentation von entscheidender Bedeutung für die Einleitung, Aufrechterhaltung und Regulierung einer adaptiven Immunantwort ist.¹¹⁶ Eine persistierend reduzierte HLA-DR-Expression auf CD14+ Monozyten korreliert in der Sepsis mit einem gehäuften Auftreten von sekundären Infektionen und erhöhter Letalität.^{117 118} Die monozytäre HLA-DR-Expression wird mittels eines neuentwickelten, standardisierten quantitativen Tests gemessen und erlaubt prognostische Aussagen bezüglich septischer Patienten.^{119 120 121}

Des Weiteren finden zur Objektivierung des Schweregrades, des Ausmaßes der Organdysfunktion und der Verlaufs- und Therapiebeurteilung von Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock Scoring-Systeme Verwendung. Der „acute physiology and chronic health evaluation (APACHE) II“ Score ist eine validierte Methode bei Intensivpatienten den Schweregrad der Erkrankung zu klassifizieren und die Letalitätswahrscheinlichkeit zum Zeitpunkt der Krankenhausaufnahme zu berechnen.¹²² Der „sequential organ failure assessment (SOFA)“ Score dient u.a. der Beschreibung der Organ(-dys)funktion.¹²³ Der „therapeutic intervention scoring system (TISS)“ Score gilt als geeignetes Messinstrument zur Bestimmung des Versorgungsaufwands. Der „simplified acute physiology score“ (SAPS II) ermöglicht die Einschätzung der Erkrankungsschwere von Intensivpatienten auf der Basis physiologischer Daten. Die aufgeführten Score-Systeme wurden in der vorliegenden Arbeit angewendet.

1.4 Leitliniengerechte Therapie der Sepsis

Die Therapie der Sepsis stützt sich nach den aktuellen Empfehlungen des International Sepsis Forum (ISF), der Surviving Sepsis Campaign (SSC) und der Deutschen Sepsis-Gesellschaft (DSF) auf vier primäre Säulen. Dazu zählen die frühzeitige Sanierung eines Infektfokus, die initial kalkulierte und nachfolgend resistenzgerechte antibiotische Behandlung, die supportive und die adjunktive Therapie (Abbildung 4).^{124 125} Zur leitliniengerechten supportiven Therapie zählen u.a. Volumen- und Katecholamintherapie sowie die lungenprotektive Beatmung. Aktuell wird der in den bisherigen Leitlinien enthaltene Einsatz von low-dose-Hydrokortison nicht mehr generell bei septischen Patienten empfohlen. Neuere Daten lassen ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Superinfektionen unter niedrigdosierter Hydrokortison-Therapie vermuten.¹²⁶ Ebenso ist der potenzielle Einsatz von aktiviertem Protein C zurzeit leitliniengerecht nur bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock und hohem Mortalitätsrisiko empfohlen.¹²⁷

Eine Vielzahl von Arbeitsgruppen hat in den vergangenen Jahren immunmodulatorische Ansätze als möglichen adjunktiven Therapieansatz verfolgt, die u.a. auf der Inhibierung inflammatorischer Kaskaden durch die Reduktion von Mediatoren und mittels der Wiederherstellung von definierten Immunfunktionen als eventuelle Voraussetzung einer erfolgreichen Primärbehandlung von Infektionen abzielen.¹²⁸ Ob eine solche Behandlung zu einer verringerten Sterblichkeitsrate führt, muss in zukünftigen konfirmatorischen Studien gezeigt werden.

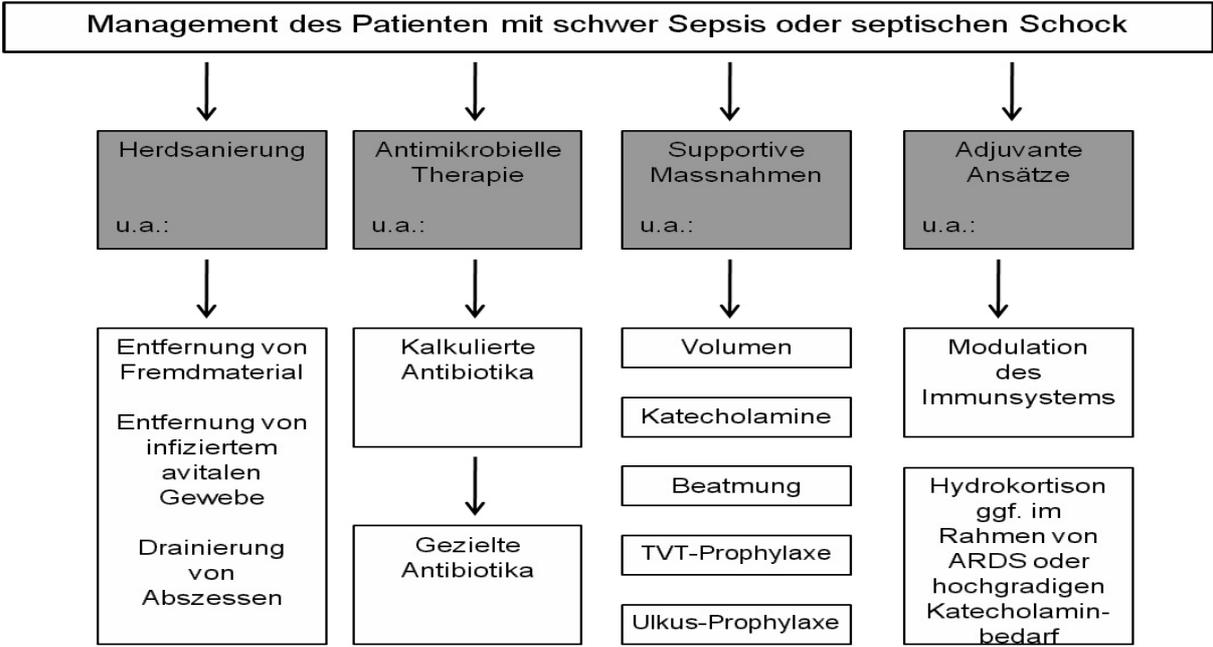


Abbildung 4: Therapie der Sepsis

2 Zielsetzung

2.1 Hypothese

Die vorliegende Arbeit wurde als Substudie der multizentrischen randomisierten placebokontrollierten, doppelverblindeten GM-CSF-Studie konzipiert und durchgeführt.¹²⁹ Ziel der Hauptstudie war es zu untersuchen, ob eine biomarkergeführte Immunstimulation mittels GM-CSF zur Wiederherstellung der monozytären Immunkompetenz bei Patienten mit schwerer Sepsis bzw. im septischen Schock führt. Die hier vorgestellte Substudie untersucht die essentielle Aminosäure Tryptophan (Trp) mit den Metaboliten: Kynurenin, Kynureninsäure, Quinolinsäure sowie dieIDO-Aktivität bei Patienten mit Sepsis-assoziiierter Immunsuppression unter GM-CSF Therapie im Vergleich zur Kontrolle (Placebo). Des Weiteren soll der Einfluss von GM-CSF auf den Tryptophan-Metabolismus und die errechnete IDO-Aktivität untersucht werden. Initial wurde postuliert, dass GM-CSF zu einer Reduktion der IDO-Aktivität und der Trp-Metabolitenspiegel führt. Die Reduktion der Trp-Metaboliten könnte mit einer Stabilisierung der zellulären Immunkompetenz einhergehen. Zur Interaktion von GM-CSF und Tryptophan mit den Metaboliten sowie IDO lagen bislang keine Daten vor.

2.2 Fragestellungen

Folgende Fragen sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

1. Überprüfung der durch verschiedene Arbeitsgruppen aufgestellten These, der ca. 3-fachen verstärkten IDO-Aktivität bei Patienten mit schwerer Sepsis/septischen Schock.
2. Der Einfluss von GM-CSF auf den Verlauf der Serumspiegel von Trp, Trp-Metaboliten und die IDO-Aktivität.
3. Die Korrelation bzw. Assoziation der IDO-Aktivität, Trp, Trp-Metaboliten mit Markern der zellulären (mHLA-DR) und humoralen (IL-6,IL-10,TNF- α) Immunität.
4. Die Korrelation bzw. Assoziation der IDO-Aktivität, Trp, Trp-Metaboliten mit klinischen Indizes im untersuchten Kollektiv.

3 Material und Methoden

3.1 Studienaufbau und Studiendesign

Die zugrundeliegende Arbeit wurde als Substudie der GM-CSF-Studie zur Wiederherstellung der monozytären Immunkompetenz bei Patienten mit schwerer Sepsis und Sepsis-assoziiertes Immunsuppression an der Charité-Universitätsmedizin zu Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Nephrologie und internistische Intensivmedizin und dem Institut für Medizinische Immunologie durchgeführt. Eingeschlossen wurden Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock und Nachweis einer mindestens 48-stündigen Sepsis-assoziiertes Immunsuppression, definiert als HLA-DR-Expression < 8.000 Moleküle/Zelle. Der Studieneinschluss erfolgte von November 2005 bis Januar 2007. Alle Patienten erhielten die Standardintensivtherapie basierend auf den Empfehlungen der „*Surviving Sepsis Campaign Guidelines*“ und des „*International Sepsis Forum*“. Es erfolgte eine blockweise Randomisierung. Eingeschlossene Patienten erhielten am Tag nach der Randomisierung subkutane Gaben von GM-CSF (Leukine®, Berlex Laboratories Richmond, CA, USA) bzw. Placebo (0.9% NaCl). Patienten der Verumgruppe wurde GM-CSF in einer Dosis von $4 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{KG}$ für fünf Tage appliziert. Nach Rekonvaleszenz der HLA-DR-Expression (HLA-DR > 15.000 Moleküle/Zelle) am Tag 5 wurde GM-CSF in der Dosis von $4 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{KG}$ für drei weitere Tage verabreicht. Bei fehlender Rekonvaleszenz der HLA-DR-Expression (HLA-DR < 15.000 Molekülen/Zelle) erfolgte eine Dosisescalation auf $8\mu\text{g}/\text{kg}/\text{KG}$ für drei Tage (Abbildung 5).

Am Studientag 1 (Ausgangstatus) wurden folgende Indizes erfasst: klinische Skalen (APACHE II, SOFA, SAPS II, TISS-28), Serumspiegel pro-inflammatorischer und anti-inflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-10), Leukozyten, Thrombozyten, CRP, PCT und die monozytäre HLA-DR- [mHLA-DR] Expression. Primärer Endpunkt der Studie war die Verbesserung der mHLA-DR-Expression. Sekundäre Endpunkte waren: Verlauf der Krankheits schwere, Verlauf der zellulären Immunität, des Zytokinprofils, Verlauf des Trp undIDO-Metabolismus sowie die Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation und die Krankenhausverweildauer.

Alle Blutentnahmen erfolgten morgens (8.00 - 10.00 Uhr) an den Screening-Tagen (Tag -1, Tag 0) sowie nach Studieneinschluss an den Tagen 1 bis 9 aus zentralvenösen Zugängen. Die Studie wurde entlang der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Das Studienprotokoll wurde von der Ethik-Kommission genehmigt.

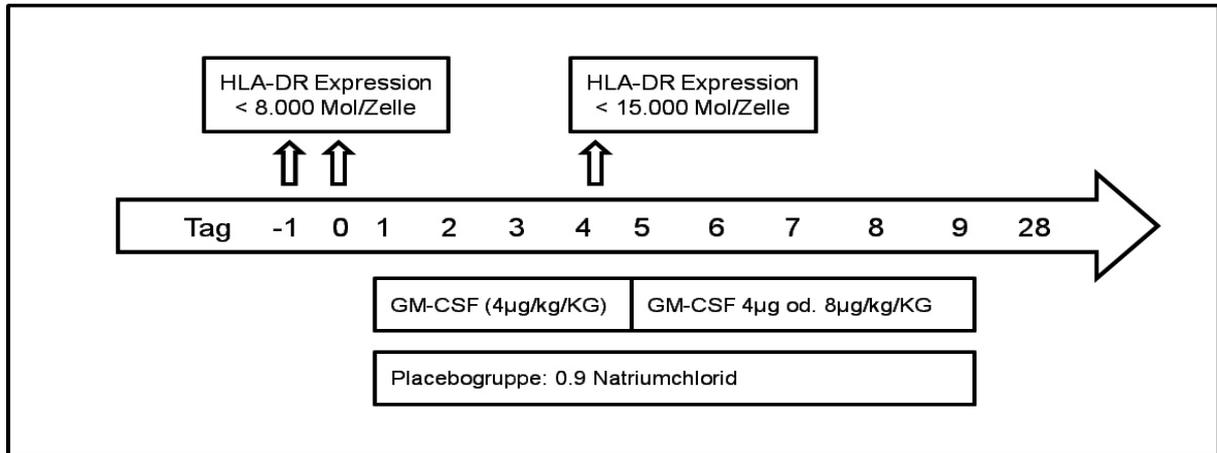


Abbildung 5: Studiendesign der GM-CSF Studie

3.2 Patientenkollektiv

3.2.1 Einschlusskriterien

Folgende Einschlusskriterien mussten für die Teilnahme an der Studie erfüllt sein: Vorliegen der schriftlichen Einwilligungserklärung, Kriterien der schweren Sepsis bzw. des septischen Schocks, persistierende Sepsis-assoziierte Immundepression (Tabelle 2 -> Seite 18).

| Einschlussbedingungen: | Definition der Einschlussbedingung: |
|---|--|
| Klinischer Nachweis einer <u>Infektion</u> innerhalb der letzten 72 h (mindestens ein Punkt muss erfüllt sein) | <p>Nachweis von Granulozyten in normalerweise steriler Körperflüssigkeit:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Durch positive Kultur oder Gram-Färbung nachgewiesene pathogene Mikroorganismen in Blut, Urin, Sputum oder sonst steriler Flüssigkeit • Augenscheinlich erkennbare Ursache für eine Infektion (z.B. Darmperforation mit freier Luft, in die Bauchhöhle ausgetretener Darminhalt, oder purulente Wundverhältnisse) • Sonstiger klinischer Nachweis einer Infektion – z.B. behandelte Pneumonie, Purpura fulminans, usw. |
| Nachweis einer systemischen Entzündungsreaktion in den letzten 24 Stunden. (mindestens zwei Punkte müssen erfüllt sein) | <ul style="list-style-type: none"> • Hyperthermie (> 38,3 °C), Hypothermie (< 35,6 °C) • Tachykardie (Herzfrequenz > 90/min) • Tachypnoe (Atemfrequenz > 20/min oder PaCO₂ < 32 mmHg) oder maschinelle Beatmung • Leukozytose (>12000/μl) oder Leukopenie (< 4000/μl) oder Linksverschiebung mit > 10 % unreifen neutrophilen Granulozyten. |
| Nachweis eines Organversagens (mindestens ein Punkt muss erfüllt sein) | <p>Auftreten von Organminderdurchblutung oder Organdysfunktion unabhängig von der Grunderkrankung oder als Folge von Medikamenten aber in einem Zusammenhang mit dem Auftreten einer Sepsis innerhalb der letzten 24 Stunden:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Oligurie für mindestens eine Stunde (< 0,5 ml/kg/Stunde) • Metabolische Azidose (pH < 7.3 oder BE ≥ 5,0 mmol/L, oder Laktat > 2 mmol/L) • Arterielle Hypoxie (PaO₂/FIO₂ < 280 ohne Pneumonie oder < 200 mit Pneumonie) • Bewusstseinstörung (GCS < 14 oder akute Verschlechterung) • Thrombozytopenie (< 100.000/μl) oder Abfall der Thrombozytenzahl um ≥50% |
| Auftreten eines septischen Schocks definiert durch: | <p>Vorliegen eines systolischen Blutdrucks < 90 mm Hg (oder ein Abfall des systolischen Blutdrucks von > 50 mm Hg vom Ausgangswert bei Patienten mit präexistenter arterieller Hypertonie) für mindestens eine Stunde trotz adäquater Flüssigkeitstherapie ODER Notwendigkeit einer Therapie mit Vasopressoren (Dopamin ≥ 5 μg/kg/min oder jede Therapie mit Adrenalin, Noradrenalin, Phenylephrin oder Vasopressin unabhängig von der Dosierung) zur Aufrechterhaltung eines systolischen Blutdrucks ≥ 90 mmHg.</p> |
| Sepsis-assoziierte Immunsuppression | HLA-DR < 8000AB/Zelle an zwei aufeinanderfolgen Tagen |
| Einwilligungserklärung | Schriftliche Dokumentation auf dem Ausklärungsbogen |

Tabelle 2: Einschlusskriterien

3.2.2 Ausschlusskriterien

Patienten wurde ausgeschlossen bei: bekannter Überempfindlichkeit gegen GM-CSF, Mannitol/Zitrat, NaHCO₃, (vermuteter) Schwangerschaft oder Stillzeit, Alter < 18 Jahre, moribunder Patient (Lebenserwartung aufgrund der akuten Erkrankung <24 Stunden), Lebenserwartung aufgrund der Grunderkrankung < 3 Monate, systemische Autoimmunerkrankungen mit systemischer Gabe von ≥ 10 mg/d Prednisolonäquivalent, Zustand nach Transplantation, hämatologische Systemerkrankung, bekannte HIV Infektion, Reanimation, akuter Herzinfarkt oder Lungenarterienembolie innerhalb der letzten 72 Stunden, Vorliegen einer „do-not-resuscitate“-Verfügung und Teilnahme an anderen experimentellen Medikamenten-Studien AMG-Studie.

3.3 Immunologische Diagnostik

3.3.1 Bestimmung der Serumspiegel von IL-10, PCT, GM-CSF

Heparinisiertes Vollblut wurde unmittelbar nach Entnahme an den Studientagen bei 200g und 4°C zentrifugiert und das gewonnene Plasma bei -80°C aliquotiert und eingefroren. Entsprechend den Herstellerangaben erfolgte die Bestimmung der Plasmakonzentration von IL-10 mit dem IMMULITE[®]-Chemilumineszenz-Immunoassay (DPC, Los Angeles, CA, USA). Die untere Nachweisgrenze lag bei dem verwendeten Essays bei 5 pg/ml. Die Procalcitoninbestimmung (Normwert <500 pg/ml) erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen immunchromatographischen Assays (Brahms, Henningsdorf Deutschland), dessen untere Nachweisgrenze bei <80 pg/ml liegt. Die GM-CSF-Serumspiegel wurden mit Hilfe eines handelsüblichen kolorimetrischen Sandwich-ELISA-Kit bestimmt (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland). Die untere Nachweisgrenze liegt bei < 3 pg/ml.

Grundprinzip des Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex (Double-Antibody Sandwich-ELISA) ist die enzymatische Farbreaktion unter Verwendung zweier Antikörper, die spezifisch an unterschiedlichen Epitopen des nachzuweisenden humoralen Marker binden. Das Reaktionsprodukt kann mittels Verstärker quantifiziert werden, wodurch auf die Menge des gebundenen antikörpergekoppelten Enzyms geschlossen werden kann (siehe Abbildung 5).

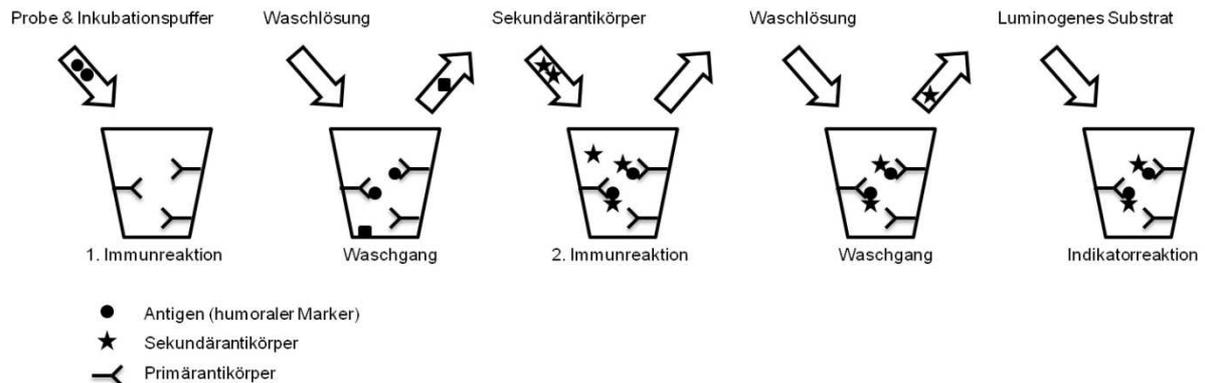


Abbildung 6: ELISA mit Sandwichprinzip (modifiziert nach Sernetz M et al.)¹³⁰

3.3.2 Bestimmung der Serumspiegel des monozytären TNF- α

100 μ l heparinisiertes Vollblut wurden im Verhältnis 1:10 mit einer Stimulationslösung aus RPMI und 500 pg/ml Lipopolysaccharid (LPS, Fa. Sigma- Aldrich Heidelberg, BRD) des Escherichia coli Serotyp 0127: B8 inkubiert. Nach vierstündiger Inkubationszeit bei 37°C und 5 % CO₂ erfolgte die Zentrifugation bei 200g für fünf Minuten. Die Überstände wurden aufgenommen und bis zur Analyse mit dem IMMULITE[®] - Chemilumineszenz-Immunoassay bei -70°C gelagert. Die kritische Grenze für die Diagnose „monozytäre Sepsis-assoziierte Immunsuppression“ liegt bei < 300 pg/ml (Referenzbereich: 500-2500 pg/ml).

3.3.3 Flowzytometrische Bestimmung der monozytären HLA-DR-Expression

50 μ l auf Eis gelagertes EDTA-Blut wurden mit 20 μ l an Phycoerythrin gebundene Anti-HLA-DR-Antikörper sowie an Peridin Chlorophyll gebundene Anti-CD14-Antikörper (Quantibrite, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, USA) in dunkler Umgebung bei Raumtemperatur für 30 Minuten gelagert. Nach Zentrifugation

bei 200g für fünf Minuten wurden die Proben mit 0,5 ml einer FACS[®]-Lysing-Solution weitere 30 min bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubiert, um Erythrozyten zu lysieren. Nach erneuter Zentrifugation bei 200g für 5 min erfolgte die Waschung der Zellen mit 1 ml FACS- Pufferlösung. Die Analyse wurde an einem FACS-Calibur[™] Durchflusszytometer mit Hilfe der CellQuest[™]-Software. Es folgte eine 17 „QuantiBRITE[™] PE-Kit“-Kalibrierung für eine 1:1 Quantifizierung und eine Bestimmung der monozytären HLA-DR-Expression anhand des Programms QuantiCALC[™] (BD).

Das Prinzip der Durchflusszytometrie (Abbildung 6) beruht auf der Emission von optischen Signalen einer zuvor markierten Zelle. Durch eine Kapillare werden in Lösung befindliche Zellen in einer laminaren, nicht-turbulenten Strömung einzeln im Sensor modul an einem Argon-Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm vorbeigeführt. Die Zellen streuen einen Teil des Lichtes, welches mittels zwei rechtwinklig zueinander angeordneter Photomultiplier nachgewiesen wird. Das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter [FSC]) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und hängt vom Volumen der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (Sideways Scatter [SSC]) ist ein Maß für die Berechnung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität der Zelle, der Größe und Struktur des Zellkerns und der Menge der Vesikel in einer Zelle beeinflusst wird. Durch die Verwendung Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper ist zudem eine weitere Differenzierung der Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenantigene möglich. So konnten CD4+ und CD8+-Zellen differenziert und die monozytäre HLA-DR-Expression bestimmt werden.

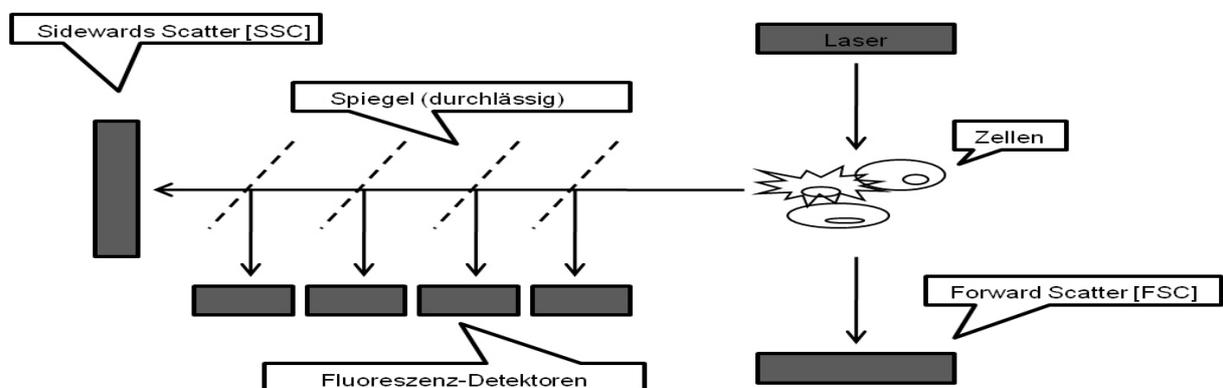


Abbildung 7: Schematischer Aufbau einer durchflusszytometrischen Apparatur (modifiziert nach Leuthold J.)¹³¹

3.3.4 Massenspektrometrische Bestimmung von Tryptophan- und Metabolitenserumspiegel, errechnete IDO-Aktivität

Zur Bestimmung der Tryptophan-Konzentration, der Metaboliten und der IDO-Aktivität mittels Tandem-Massenspektrometrie wurde an den Tagen 1 (Studieneinschluss), 5 und 9 (nach Therapie) 100 µl heparinisertes Plasma asserviert. Die Plasmagewinnung erfolgte innerhalb von zehn Minuten durch Kühlzentrifugierung bei 2000 U/min für drei Minuten. Das gewonnene Plasma wurde aliquotisiert und eingefroren bei -80°C. Die Berechnung der IDO-Aktivität erfolgte unter Zuhilfenahme der in der Literatur von verschiedenen Autoren beschriebenen Formel (IDO-Aktivität = $Kyn \times 100 / Trp$).¹³²

Bei der Tandem-Massenspektrometrie handelt es sich um eine Weiterentwicklung der klassischen Sektorfeld-Massenspektrometrie, deren Trennprinzip darauf beruht, dass geladene Teilchen - welche im Hochvakuum unter Hitze in Ionen (Ionenquelle) überführt und beschleunigt werden - durch ein elektromagnetisches Feld unterschiedlich stark abgelenkt werden. Die Ablenkung beruht auf der Tatsache, dass ungleich schwere Ionen in einem elektromagnetischen Feld unterschiedlich stark abgelenkt werden und ist proportional zum Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z). Zur Ionisierung wird die Probe durch eine feine Nadel versprüht, an der eine Hochspannung anliegt (Elektrospray-Ionisierung). Die geladenen Ionen werden ladungsabhängig in einem elektrischen Feld beschleunigt und in ein erstes Quadrupolmassenspektrometer überführt, das die Ionen nach Masse/Ladungs-Quotienten auftrennt.

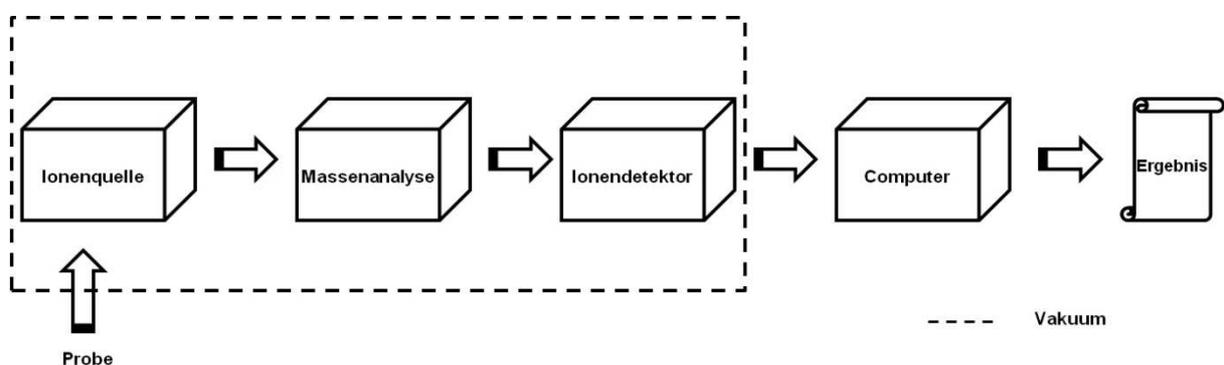


Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Massenspektrometers

Im verwendeten Tandem-Massenspektrometer wurden zwei Quadrupole hintereinander geschaltet. Diese Anordnung erlaubt, aus einer komplexen Probe, wie Spektren von Metaboliten, in der ersten Einheit die Selektion einer definierten Masse. Die vorselektierten Molekül-Ionen werden nach Zerfall durch Kollision mit Gasmolekülen (Stickstoff) in einem weiteren Quadrupolmassenspektrometer aufgetrennt und einem Detektor zugeführt. Für die Beurteilung benutzt man neben den gemessenen absoluten Konzentrationen (bestimmt aus der relativen Signalintensität im Vergleich zum internen Standard), auch die Verhältnisse einzelner Metaboliten zueinander.¹³³

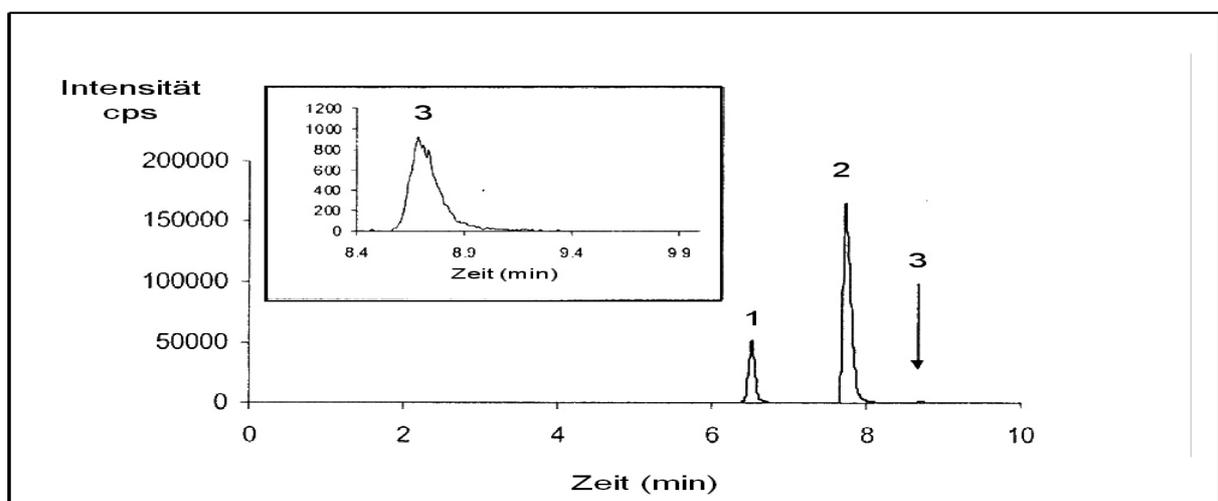


Abbildung 9: Bsp. Messergebnis Tryptophan-Metabolismus (1 = Kynurenin, 2 = Tryptophan, 3 = Kynureninsäure)¹³⁴

3.4 Statistik

Die statischen Analysen der erhobenen Daten wurden unter Verwendung der Software MedCalc 10.1.3. (MedCalc, Mariakerke, Belgien) durchgeführt. Als statische Methoden kamen zum Einsatz: Varianzanalyse für wiederholte Messungen (Analysis of Variance [ANOVA], Student's t-Test für verbundene und nicht verbundene Stichproben und der Fisher's Exact Test. Die Analyse von Subgruppen erfolgte mittels ANOVA mit post hoc Test. Alle Daten wurden auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test überprüft. Die Ergebnisse wurden in der Form: „Mittelwert \pm Standardfehler (SEM)“ dargestellt. Ein Ergebnis wurde als statistisch signifikant betrachtet, wenn $p < 0.05$ war.

4 Ergebnisse

4.1 Allgemeiner Teil: Studienpopulation – Studieneinschluss

Insgesamt 135 kaukasische Patienten wurden hinsichtlich der Einschlusskriterien geprüft. Nach Ausschluss von 97 Patienten (30 Patienten: fehlende monozytäre Immunsuppression, 28 Patienten: Vorliegen einer Neoplasie, 14 Patienten: Zustand nach Transplantation, 11 Patienten: Zustand nach akutem Myokardinfarkt innerhalb der letzten 72 Stunden, 5 Patienten: Systemische Steroidgabe, 3 Patienten: Vorliegen einer „do-not-resuscitate“-Verfügung, 2 Patienten: Zustand nach kardio-pulmonaler Reanimation in den letzten 72 Stunden, 1 Patient: HIV-Erkrankung, 3 Patienten: fehlende Einwilligung) konnten 38 konsekutive Patienten eingeschlossen werden. Die Charakteristik der Studiengruppen ist in Tabelle 3 (Studieneinschluss) bzw. Tabelle 4 (nach Therapie) dargestellt. Die durchschnittliche Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation bis zum Studieneinschluss betrug in der Interventionsgruppe 6.0 ± 3.3 Tage und in der Kontrollgruppe 8.47 ± 1.8 Tage. Die Studienarme unterschieden sich bei Studieneinschluss nicht signifikant hinsichtlich Geschlechtsverteilung, Alter, BMI und Krankheitsdauer mit intensivmedizinischer Aufenthaltsdauer und Therapie. Kein signifikanter Unterschied konnte bezüglich des Schweregrads, der Ätiologie und des Erregers der schweren Sepsis bzw. des septischen Schocks bei Studieneinschluss evaluiert werden (mittlerer APACHE-II-Score 21.9 ± 6.3). Ätiologisch waren Pneumonie und Peritonitis die häufigsten zugrunde liegenden Ursachen der schweren Sepsis/des septischen Schocks. Bei 14 Patienten (37%) konnten gram-positive Infektionen, bei acht Patienten (21%) gram-negative Infektionen, bei zwölf Patienten gemischt gram-positive/ gram-negative Infektionen und bei drei Patienten (8%) Pilzinfektionen nachgewiesen werden. Begleiterkrankungen bei Studienbeginn waren: arterielle Hypertonie (57%), Hyperlipoproteinämie (34%), Diabetes mellitus (32%), chronisch obstruktive Lungenerkrankung (21%), koronare Herzkrankheit (18%) und chronische Niereninsuffizienz (18%). Die Verteilung der Nebenerkrankungen war zwischen den Gruppen statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

| Parameter | GM-CSF Gruppe | Placebo Gruppe | P-Wert |
|--|-----------------------|----------------------|--------|
| Geschlecht | 16/19 männlich (84 %) | 15/19 männlich (79%) | NS |
| Alter | 64.0 ± 13.6 | 63.3 ± 14.2 | NS |
| BMI(kg/m ²) | 27.4 ± 6.3 | 26.5 ± 4.8 | NS |
| Ursachen der Sepsis: | | | |
| Pneumonie | 11/19 (58%) | 10/19 (52%) | NS |
| Peritonitis | 6/19 (32%) | 5/19 (26%) | NS |
| Andere | 2/19 (11%) | 4/19 (21%) | NS |
| Aufenthaltsdauer bis Studieneinschluss | 6.0 ± 3.3 | 8.47 ± 8.9 | NS |
| APACHE-II Score: | | | |
| Studientag 1 | 21.3 ± 6.1 | 22.5 ± 6.6 | NS |
| SOFA-Score: | | | |
| Studientag 1 | 7.2 ± 4.0 | 9.5 ± 3.7 | NS |
| SAPS II-Score | | | |
| Studientag 1 | 38.8 ± 8.9 | 45.6 ± 13.4 | NS |
| TISS-28-Score | | | |
| Studientag 1 | 42.4 ± 9.5 | 46.5 ± 9.9 | NS |

Tabelle 3: Studienpopulation zum Einschlusszeitpunkt aus Meisel, Schefold, Pschowski (2009)¹³⁵

4.2 Charakterisierung des Patientenkollektivs

Insgesamt 35 der 38 Patienten beendeten das neuntägige Behandlungsintervall. Eine Dosis-Eskalation von 4 µg/kg/KG auf 8 µg/kg/KG erfolgte protokollkonform bei zwei Patienten der GM-CSF Gruppe aufgrund einer HLA-DR-Expression < 15.000 Moleküle/Zelle an Tag 5 (Teilresponder). In der Placebogruppe wurden zwei Patienten aufgrund einer vermuteten Protokollverletzung sowie des Verdachts des Auftretens eines schwerwiegenden unerwünschten Ereignisses [severe adverse event, SAE] ausgeschlossen. Ein Patient des Kontrollarms verstarb aufgrund eines septisch induzierten Kreislaufversagens (Behandlungstag 8). 36 Patienten konnten bezüglich der Wiederherstellung der monozytären Immunkompetenz und des Trp-Metabolismus ausgewertet werden.

Die Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation sowie die Gesamtaufenthaltsdauer im Krankenhaus waren in der Verumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant reduziert. Die durchschnittliche Beatmungsdauer betrug: 147 ± 102.8 Stunden in der Verumgruppe versus 207 ± 57.2 Stunden in der Kontrollgruppe (p = 0.04). Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich der Gesamtaufenthaltsdauer evaluiert werden. So betrug die durchschnittliche Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation im Mittel 40.9 ± 26.1 bzw. in der Kontrollgruppe 52.1 ± 39.6 (p = NS) Tage. Der durchschnittliche gesamte klinische Aufenthalt betrug 58.8 ± 32.6 Tage bzw. in der Kontrollgruppe 68.9 ± 45.6 Tage (p = NS). Initial benötigten die

Patienten der GM-CSF Gruppe bei Studieneinschluss vermehrt Vasopressoren (Noradrenalin), welche nach erfolgter Intervention im Vergleich zur Kontrollgruppe niedriger war. Die durchschnittliche Noradrenalinosis betrug $0.19 \pm 0.17 \mu\text{g/kg/min}$ in der Verumgruppe und $0.18 \pm 0.17 \mu\text{g/kg/min}$ in der Kontrollgruppe. Am Studientag 9 ergab sich ein Noradrenalin im Mittel von $0.12 \pm 0.13 \mu\text{g/kg/min}$ und $0.18 \pm 0.17 \mu\text{g/kg/min}$ in der Kontrollgruppe. Über die Interventionszeit konnte der Noradrenalin-Verbrauch in der GM-CSF-Gruppe um 37% und in der Kontrollgruppe um 22% gesenkt werden. Die Notwendigkeit zur Nierenersatztherapie unterschied sich in beiden Studienarmen nicht.

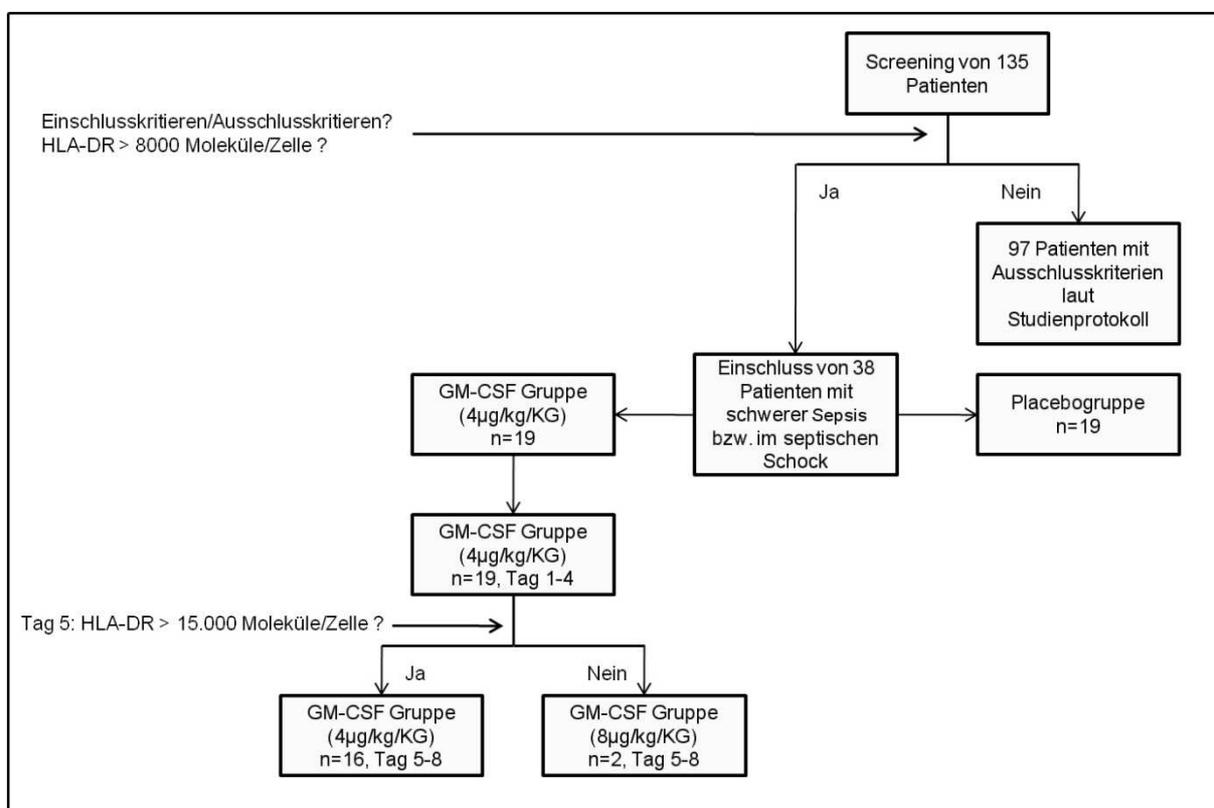


Abbildung 10: Screening und Randomisierung der GM-CSF Studie

Es wurde beobachtet, dass die mittleren klinischen Schweregradskalen (APACHE II, SOFA-Score, SAPS-II, TISS-28) sich in beiden Studienarmen über das Behandlungsintervall verbesserten. Tendenziell konnte eine deutlichere Abnahme der Skalen in der GM-CSF Gruppe beobachtet werden, bei minimal höheren Ausgangswerten der Kontrollgruppe. Eine statistische Signifikanz wurde für keinen Score erreicht. Der APACHE-II-Score war in der GM-CSF Gruppe ($p = 0.02$) am Studientag 9 im Vergleich zum Studientag 1 signifikant reduziert. In der

Kontrollgruppe konnte kein signifikanter Unterschied des APACHE-II evaluiert werden.

| Parameter | GM-CSF Gruppe | Placebo Gruppe | P-Wert |
|----------------------------------|---------------|----------------|--------|
| 28 Tage Mortalität | 3/19 (16%) | 4/19 (21%) | NS |
| Tage auf der Intensivstation | 40.9 ± 26.1 | 52.1 ± 39.6 | NS |
| Tage intrahospital | 58.8 ± 32.6 | 68.9 ± 45.6 | NS |
| Akutes Nierenversagen | 12/19 (63%) | 11/19 (58%) | NS |
| Nierenersatztherapie (Tage) | 14.4 ± 10.2 | 11.5 ± 10.2 | NS |
| Beatmung gesamt (Stunden) | 147 ± 102.8 | 207.2 ± 57.2 | 0.037 |
| Katecholamintherapie (µg/kg/min) | | | |
| Noradrenalin Studientag 1 | 0.19 ± 0.17 | 0.18 ± 0.17 | NS |
| Noradrenalin Studientag 9 | 0.12 ± 0.13 | 0.14 ± 0.13 | NS |
| Tag 1 zu Tag 9 | NS | NS | |
| APACHE-II Score: | | | |
| Studientag 1 | 21.3 ± 6.1 | 22.5 ± 6.6 | NS |
| Studientag 9 | 16.7 ± 5.9 | 20.8 ± 7.4 | 0.06 |
| Tag 1 zu Tag 9 | P = 0.02 | NS | |
| SOFA-Score: | | | |
| Studientag 1 | 7.2 ± 4.0 | 9.5 ± 3.7 | NS |
| Studientag 9 | 5.2 ± 3.4 | 7.5 ± 5.3 | NS |
| Tag 1 zu Tag 9 | NS | NS | |
| SAPS II-Score | | | |
| Studientag 1 | 38.8 ± 8.9 | 45.6 ± 13.4 | NS |
| Studientag 9 | 37.3 ± 10.6 | 45.0 ± 14.9 | NS |
| Tag 1 zu Tag 9 | NS | NS | |
| TISS-28-Score | | | |
| Studientag 1 | 42.4 ± 9.5 | 46.5 ± 9.9 | NS |
| Studientag 9 | 38.1 ± 13.8 | 42.7 ± 11.2 | NS |
| Tag 1 zu Tag 9 | NS | NS | |

Tabelle 4: Studienpopulation nach Therapie aus Meisel, Schefold, Pschowski (2009)¹³⁶

4.2.1 Verlauf ausgewählter löslicher Entzündungsmediatoren

In der GM-CSF Gruppe wurden folgende signifikante Veränderungen über den Studienzeitraum beobachtet: Plasmaspiegel PCT-Spiegel (Referenzbereich: <0.5 µl/L) bei Studieneinschluss 17.3 ± 43.8 µg/L und 5.2 ± 2.1 µg/L am Studientag 9 ($p = 0.13$). Eine statistische Signifikanz zur Kontrollgruppe war nicht zu beobachten. Einzelheiten zum Verlauf von PCT und IL-10 können der Tabelle 5 entnommen werden.

Die Ex-vivo-TNF- α -Freisetzung nach LPS-Stimulation war in der Interventionsgruppe signifikant höher im Behandlungszeitraum Tag 2-6 ($p < 0.5$ bis $p < 0.01$). Einzelheiten bezüglich des Verlaufs weiterer Entzündungsparameter können aus Meisel, Schefold, Pschowski und Mitarbeiter (2009) „Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression.“ entnommen werden.¹³⁷

| Parameter | Studientag 1 | Studientag 5 | Studientag 9 | P Value (1 vs.9) |
|-----------------------|-------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| Procalcitonin (µg/L) | | | | |
| GM-CSF | 17.3 ± 43.8 | 5.3 ± 14.2 | 5.2 ± 2.1 | 0.13 |
| Placebo | 8.7 ± 18.2 | 3.1 ± 6.0 | 4.4 ± 9.4 | NS |
| IL-10 (pg/ml) | | | | |
| GM-CSF | 27.4 ± 64.9 | 22.9 ± 44.4 | 26.4 ± 52.6 | NS |
| Placebo | 17.8 ± 19.5 | 12.8 ± 9.5 | 16.0 ± 19.6 | NS |
| mHLA-DR (mAk/Zelle) | | | | |
| GM-CSF | 5.609 ± 3.628 | $43.676 \pm 24,517$ | $50.907 \pm 28,56$ | < 0.0001 |
| Placebo | 5.659 ± 3.332 | 7.814 ± 5.787 | 10.426 ± 8.424 | NS |
| GM-CSF Spiegel(pg/ml) | | | | |
| GM-CSF | 2.1 ± 2.2 | 40.3 ± 77.1 | 25.5 ± 62.9 | 0.12 |
| Placebo | 2.1 ± 2.0 | 1.9 ± 2.4 | 1.8 ± 1.4 | NS |

Tabelle 5: Entzündungsmediatoren, HLA-DR-Expression und GM-CSF-Spiegel aus Meisel, Schefold, Pschowski (2009) ¹³⁸

4.2.2 HLA-DR-Expression und GM-CSF-Spiegel

In der Interventionsgruppe konnten folgende signifikante Veränderungen zwischen Studientag 1 und Therapieende in der Interventionsgruppe eruiert werden: Monozytäre HLA-DR-Expression Studientag 1: 5609 ± 3628 mAk/Zelle, Studientag 9: 50907 ± 28568 ($p < 0.0001$) bzw. in der Kontrollgruppe Studientag 1: 5659 ± 3332 mAk/Zelle, Studientag 9: 10426 ± 8424 mAk/Zelle ($p = NS$). Im Vergleich zwischen der Interventionsgruppe und der Kontrollgruppe konnten folgende statistisch signifikanten Unterschiede evaluiert werden: Monozytäre HLA-DR-Expression am Studientag 5: 43676 ± 24517 bzw. in der Kontrollgruppe: 7814 ± 5787 mAk/Zelle ($p <$

0.001) und am Studientag 9: 50907 ± 28568 bzw. in der Kontrollgruppe: 10426 ± 8424 mAk/Zelle ($p < 0.0001$). Ein signifikanter Anstieg der HLA-DR-Expression wurde bei den Patienten in der GM-CSF-Gruppe nach einem Behandlungstag beobachtet. Die HLA-DR-Expression blieb über den gesamten Expressionszeitraum bei 19/19 GM-CSF behandelten Patienten (100%) im Normbereich. 3/19 Patienten (16%) der Kontrollgruppe normalisierten sich während des Interventionsintervall (Tabelle 5).

Der GM-CSF-Serum-Spiegel Referenzbereich: <2.5 pg/ml) stieg in der Interventionsgruppe auf 25.5 ± 62.9 bzw. in der Kontrollgruppe: 1.8 ± 1.4 . Vergleichend zur Baseline zeigte sich eine statistisch signifikante Steigerung in der Interventionsgruppe ($p=0.12$). Der GM-CSF-Spiegel zeigte vergleichend zwischen den beiden Studienarmen signifikante Unterschiede bereits am Studientag 5 mit: 40.3 ± 77.1 bzw. in der Kontrollgruppe: 1.9 ± 2.4 pg/ml ($p = 0.05$) und am Studientag 9: 25.5 ± 62.9 ($p = 0.12$) bzw. in der Kontrollgruppe: 1.8 ± 1.4 ($p = 0.03$). Der Serumspitzenspiegel von GM-CSF wurde am Behandlungstag 5 erreicht (Tabelle 5).

Folgende signifikante Veränderungen konnten mit Rekonvaleszenz des HLA-DR-Expression durch die Gabe von GM-CSF in der Granulozyten-Makrophagen-Linie im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten beobachtet werden: 1.: Signifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozyten ab dem Studientag 2. 2.: Signifikanter Anstieg der Monozyten-Zahl ab dem 4. Behandlungstag. 3. Signifikanter Anstieg der CD4+T-Lymphozyten ab dem Studientag 6. 4.: Signifikanter Anstieg der CD8+T-Lymphozyten ab dem Studientag 4.

4.2.3 Nachbeobachtungszeitraum

Der 28 Tage lange Nachbeobachtungszeitraum wurde für die Substudie nicht evaluiert. Folgende Beobachtungen konnten im Rahmen der GM-CSF-Studie beobachtet werden: Die 28-Tage-Mortalität konnte durch die Gabe von GM-CSF statistisch nicht verbessert werden. Insgesamt starben sieben Patienten im 28-Tage-Beobachtungszeitraum (sechs Patienten stationär, ein Patient poststationär). Hiervon drei Patienten (16%) des GM-CSF Behandlungsarmes, vier Patienten (21%) der Kontrollgruppe. Die Scoring-Systeme (APACHE-II, SAPS-II, SOFA und TISS-28)

verbesserten sich bei den Beobachtungsgruppen ohne statistisch signifikanten Unterschied. Nebenwirkungen, welche nach Gabe von GM-CSF zu erwarten wären, konnten nicht beobachtet werden.

4.3 Tryptophan-Metabolismus in den Studiengruppen

4.3.1 Tryptophan und Tryptophan-Metaboliten

Die Trp-Serumspiegel waren in beiden Studiengruppen über den neuntägigen Studienzeitraum unverändert (Abbildung 13). Die Trp-Metaboliten Plasmaspiegel Kyn und Kyna zeigten in den beiden Studiengruppen unterschiedliche Verläufe (Abbildung: 14). Ein statistisch signifikant erhöhter Plasmaspiegel von Kyn in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Interventionsgruppe konnte an Tag 9 beobachtet werden ($p = 0.009$). Ein reduzierter Kyna Plasmaspiegel konnte im Interventionsarm bei tendenziell steigendem Kyna Plasmaspiegel in der Placebogruppe beobachtet werden. Ein statistisch signifikant verminderter Plasmaspiegel des Trp-Metaboliten Quin in der Interventionsgruppe im Vergleich zur Placebogruppe konnte an Tag 9 erfasst werden ($p = 0.04$) (Abbildung 15). Unveränderte Plasmaspiegel der Metabolite des Serotoninwegs 5-HTP und 5-HT wurden über den gesamten Studienzeitraum beobachtet (Abbildung 16).

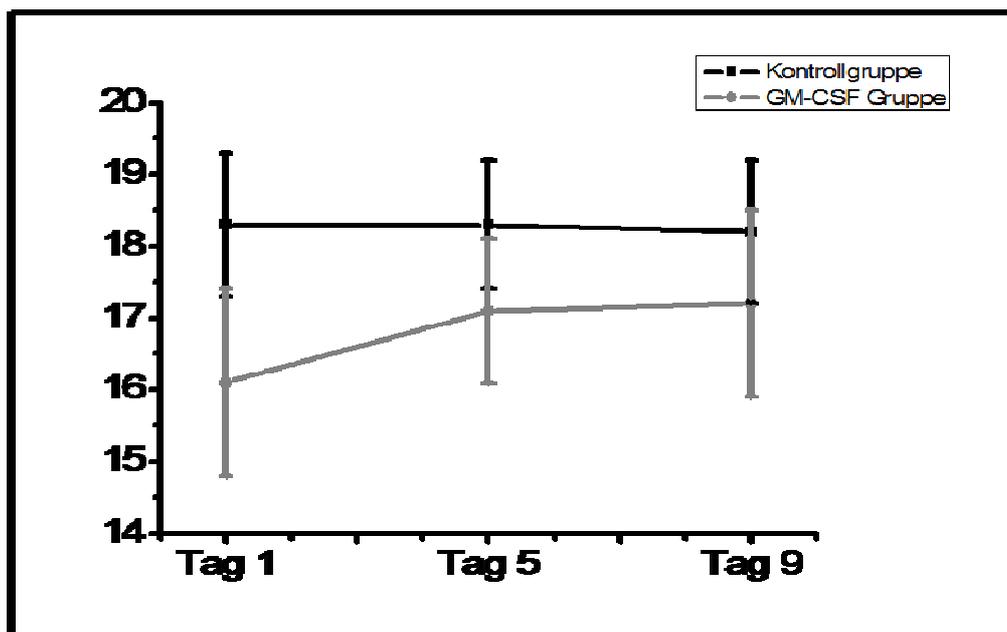


Abbildung 11: Verlauf Tryptophan-Plasmaspiegel

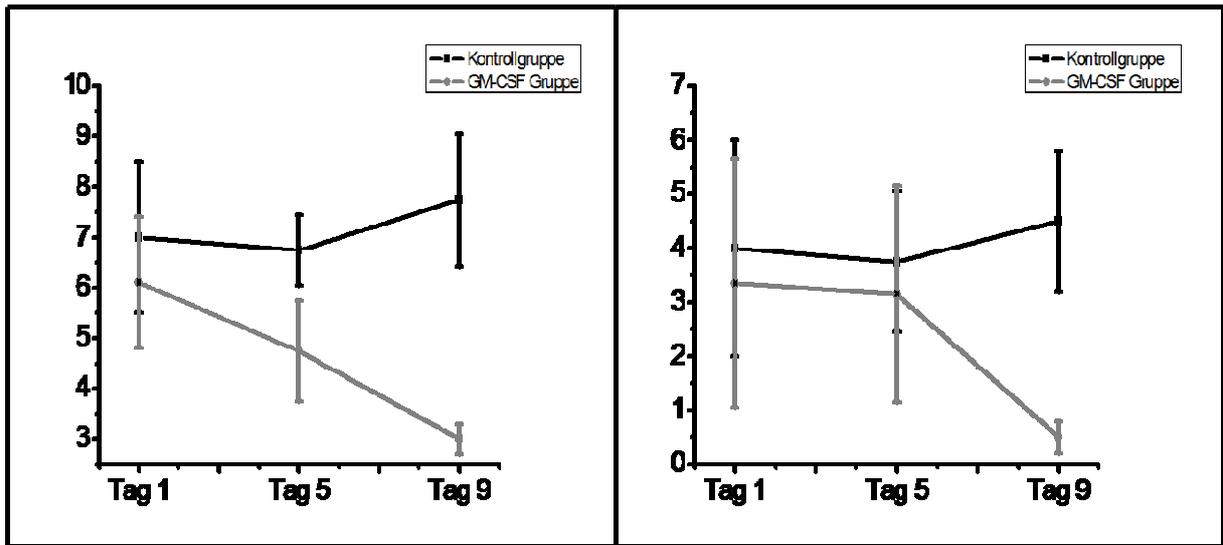


Abbildung 12: Kyn-Plasmaspiegel (rechts), Kyna-Plasmaspiegel (links)

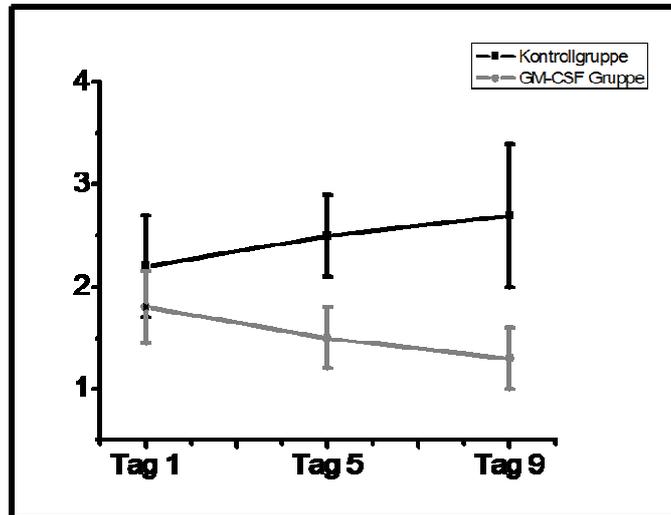


Abbildung 13: Quin-Plasmaspiegel

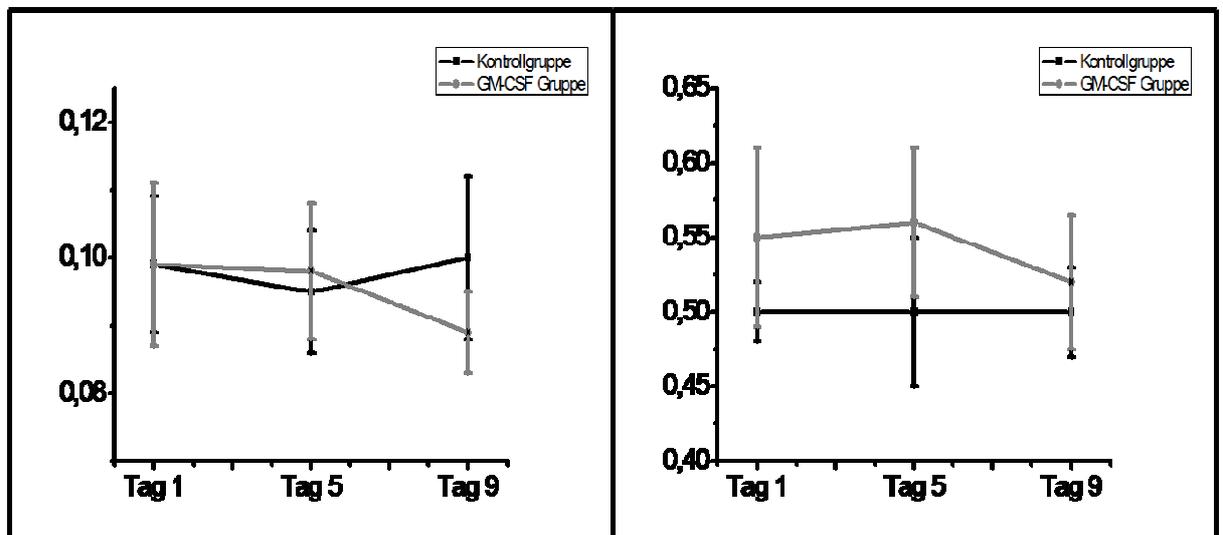


Abbildung 14: 5-HTP-Plasmaspiegel (links), 5-HT (rechts)

4.3.2 Verlauf der Indolamin-2,3-Dioxygenase-Aktivität

Als Indikator der IDO-Aktivität dient die Kyn/Trp Ratio.¹³⁹ Die Aktivität des Enzyms IDO ist in der schweren Sepsis bzw. im septischen Schock um den Faktor 3 erhöht.^{140 141 142} Diese Beobachtung von anderen Autoren konnten wir bestätigen. So zeigte sich in unserem Kollektiv eine 3-5-fach gegenüber der Norm verstärkte IDO-Aktivität bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock. Im Interventionsarm wurde ein signifikanter Rückgang der IDO-Aktivität (Baseline: 35.2 ± 21.0 , Studientag 9: 21.6 ± 9.9 , $p = 0.02$) unter GM-CSF Therapie beobachtet. In die Kontrollgruppe war eine Zunahme der IDO-Aktivität zu verzeichnen. Ein statistischer Unterschied zwischen beiden Studienarmen war am Studientag 9 festzustellen ($p = 0.03$) (Abbildung 17)

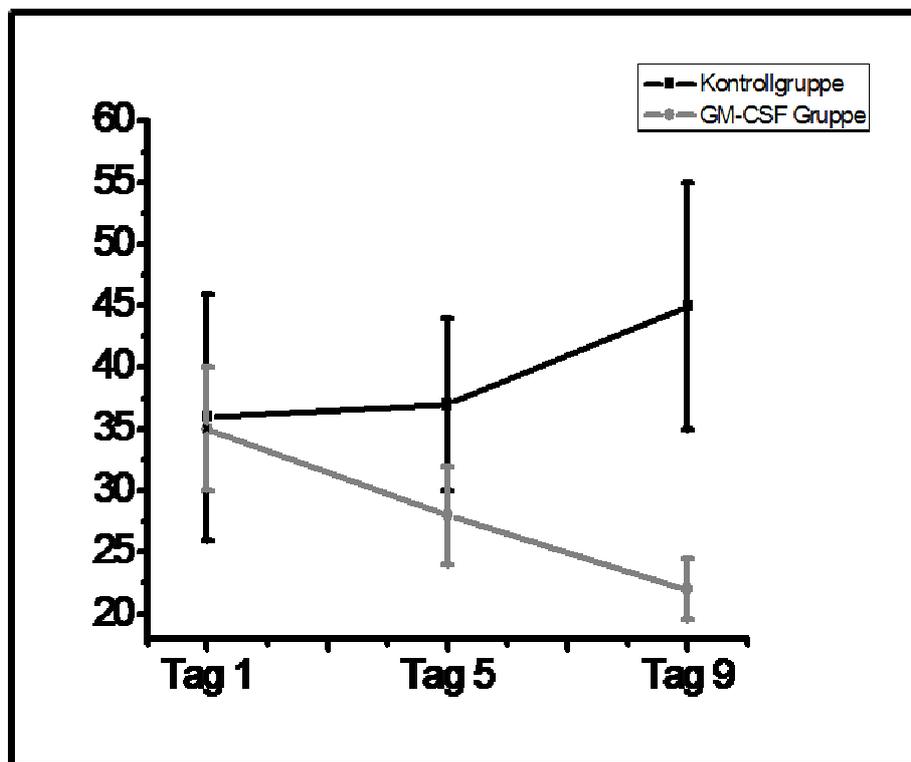


Abbildung 15: Indoleamine-2,3-Dioxygenase-Aktivität

4.3.3 IDO-Aktivität in Korrelation zur HLA-Expression

Die Analyse von 108 Patientenproben zeigte eine inverse Korrelation der HLA-DR-Expression mit der IDO-Aktivität. $r=-0.28$ (95% CI -0.44 bis -0.1), $p=0.005$ (Abbildung 18). Dieses Ergebnis wurde mittels Rangsummen-Analyse bestätigt ($p<0.0001$, Spearman's Rangkorrelationskoeffizient -0.43 (95% CI -0.57 bis - 0.25))

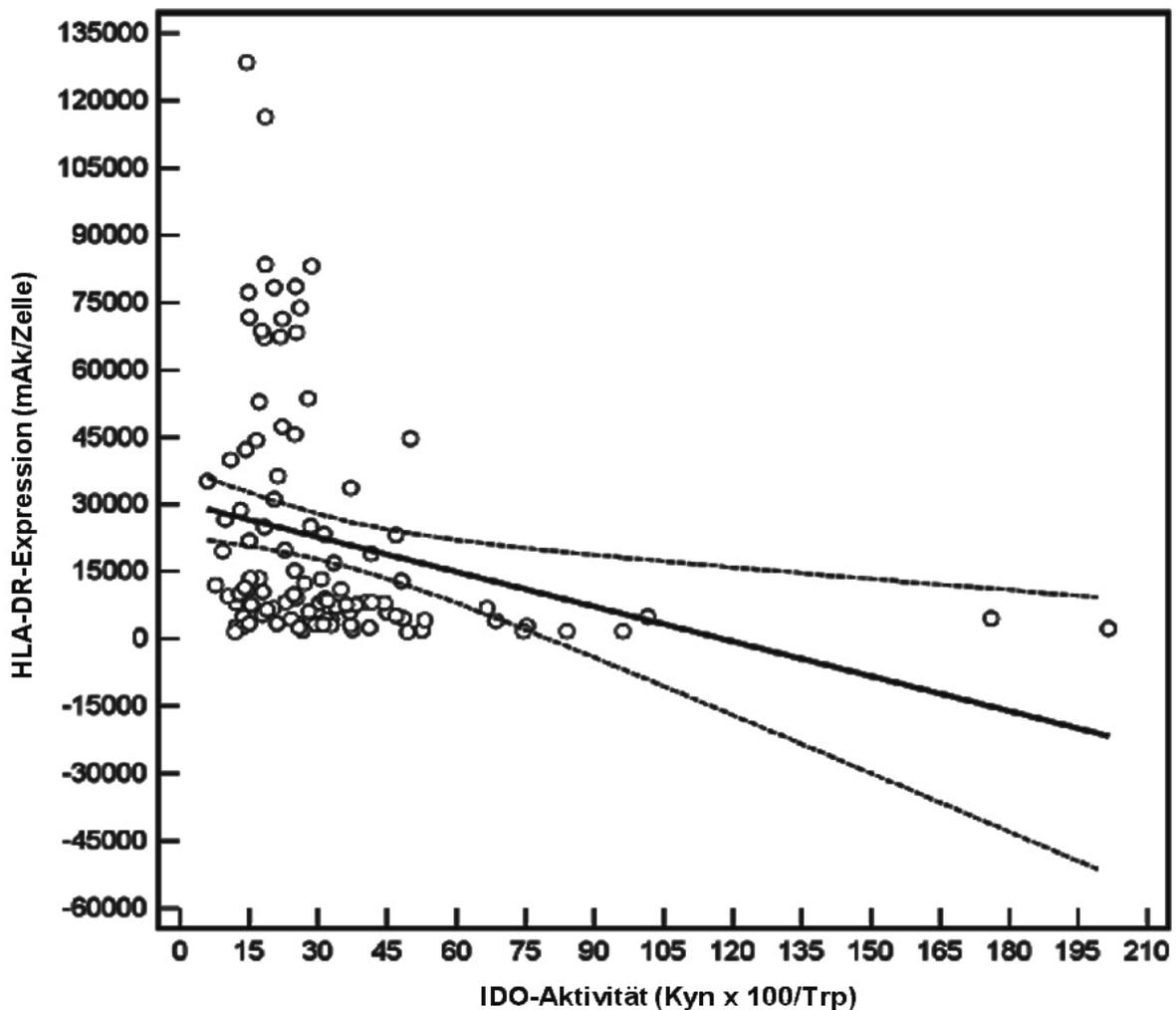


Abbildung 16: Streudiagramm: IDO-Aktivität mit HLA-DR-Expression

4.3.4 IDO-Aktivität in Korrelation zu löslichen Entzündungsmediatoren

Eine signifikante Korrelation der IDO-Aktivität mit LPS-induzierter TNF- α -Freisetzung von Monozyten konnte identifiziert werden. ($p = 0.029$), $r = -0.27$ (95% CI -0.49 bis -0.029). IL-10 zeigte eine signifikante Korrelation mit der IDO-Aktivität ($p = 0.0001$) am Studientag 9 (Daten nicht gezeigt). Die Metaboliten Kyn, Kyna und Quin zeigten eine signifikante Korrelation mit dem IL-10 Level am Studientag 5 ($p < 0.001$) sowie am Studientag 9 ($p < 0.04$). Der Procalcitonin-Serumspiegel korreliert mit der IDO Aktivität ($p < 0.0001$), $r = 0.56$ (95% CI 0.44 zu 0.68) (Abbildung 19).

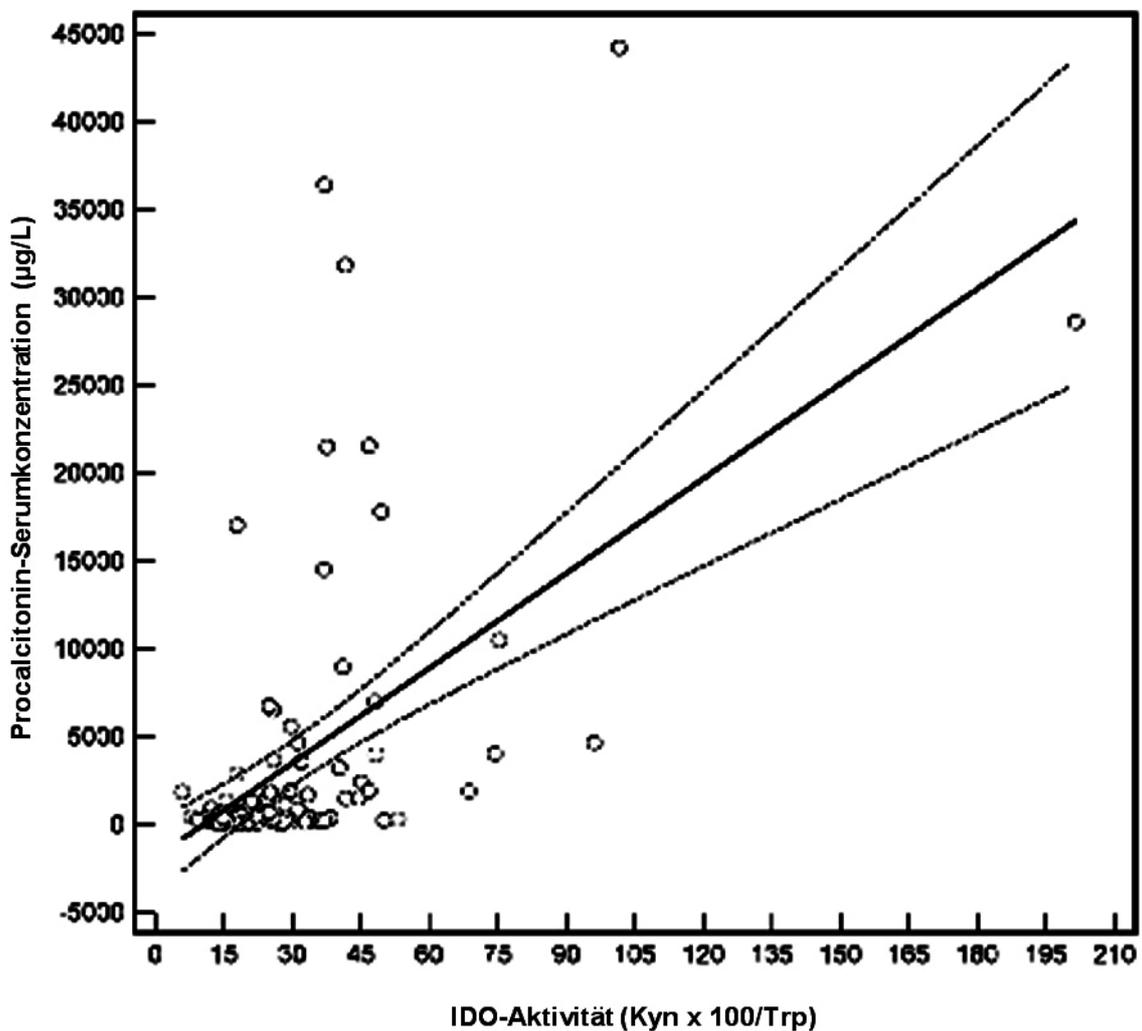


Abbildung 17: Streudiagramm: IDO Aktivität mit PCT-Spiegel

5 Diskussion

Die Gabe von GM-CSF führte in der vorliegenden Studie zu einer signifikanten Reduktion der IDO-Aktivität bei Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock und Sepsis-assoziiertes Immunsuppression. Eine statistisch signifikant reduzierte IDO-Aktivität wurde bei den behandelten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe am Studientag 9 beobachtet ($p=0.03$). Zudem wurde beobachtet, dass die Plasmaspiegel von Kynureninen, nicht jedoch die Spiegel von Serotonin-Stoffwechselwegprodukten in der GM-CSF-Gruppe signifikant im Vergleich zur Kontrolle abfielen. Die IDO-Aktivität korrelierte signifikant mit der HLA-DR-Expression auf Monozyten ($p=0.005$, $r=-0,28$), der LPS-induzierten TNF- α -Freisetzung von Monozyten ($p = 0.029$, $r=-0.27$) und dem PCT-Serumspiegel ($p=0.0001$, $r=0,56$). Ein signifikanter Anstieg der CD4- und CD8-T-Lymphozytenzahl wurde innerhalb des Studienzeitraums beobachtet ($p=0.05$). In der Behandlungsgruppe konnte eine signifikant kürzere Beatmungsdauer, eine nicht signifikant verkürzte Liegedauer auf der Intensivstation und eine nicht signifikant verkürzte Dauer des gesamten klinischen Aufenthalts bei den Patienten der Interventionsgruppe beobachtet werden.

Im Verständnis der Pathogenese der Sepsis scheint die Entstehung der Sepsis-assoziierten Immunsuppression mit Verlust der zellvermittelten Immunität durch die IDO vermittelte Tryptophandepletion mit daraus resultierender T-Zell-Anergie frühzeitig induziert zu werden.^{143 144 145 146} Bisherige Daten suggerieren, dass die IDO-Aktivität eine regulatorische Rolle zwischen der Ausschüttung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen einnimmt.¹⁴⁷ Mit der Tryptophan-Depletion fallen vermehrt die Metaboliten Kynurenin, Kynureninsäure und Quinolinsäure an. Kynureninsäure induziert in einigen Lymphozyten-Subpopulationen (u.a. TH-1-Zellen) eine CD-95L-unabhängige Apoptose und bewirkt einen Shift zu einer TH-2-Zell-Antwort, welche die Sepsis-assoziierte Immunsuppression verstärken kann.¹⁴⁸
^{149 150 151 152 153 154} Kynurenine sind zudem als potente vasodilatative Mediatoren bekannt.¹⁵⁵

Die vorliegenden Daten zeigen erstmals, dass die Gabe von GM-CSF zu signifikanten Veränderungen des Trp-Metabolismus bzw. der errechneten IDO-Aktivität in vivo führt. Die Veränderung der errechneten IDO-Aktivität korreliert mit der Abnahme des PCT-Spiegels als Surrogat-Parameter für den Grad der

Bakteriämie.¹⁵⁶ ¹⁵⁷ Die beobachtete signifikante Reduzierung der IL-10-Plasmaspiegel in Korrelation mit der Regeneration der monozytären HLA-DR-Expression und der Normalisierung der IDO-Aktivität weisen auf eine Erholung der Immunkompetenz hin. Des Weiteren könnten die reduzierten 3-Kynurenin-, Kynureinsäure- und Quinolinsäure-Plasmaspiegel auf ein Shift zugunsten einer TH-1-Zell-Antwort mit proinflammatorischem Zytokinprofil und daraus resultierender Rekonvaleszenz der Immunkompetenz deuten. Tendenziell korreliert mit diesen Beobachtungen eine klinische Rekonvaleszenz gemessen anhand klinischer Scores. Limitierend ist jedoch anzumerken, dass hier nur Assoziationen gezeigt werden können; ein etwaiger mechanistischer Zusammenhang muss in Folgeuntersuchungen geprüft werden.

Spekulativ könnte sich die beobachtete Reduzierung des Trp-Metaboliten Kyn günstig auf die Hämodynamik der mit GM-CSF behandelten Patienten auswirken. Bislang konnte an septischen Patienten gezeigt werden, dass der Grad der Hypotension invers mit der Höhe der Kynurenin-Spiegel korreliert. Neben dem signifikant reduzierten Kyn-Serumspiegel in der Behandlungsgruppe über den Behandlungszeitraum konnte ein nicht signifikant geringerer Gebrauch an Katecholaminen in der Interventionsgruppe verzeichnet werden. Übereinstimmend konnten in einer kürzlich publizierten Arbeit Wang und Mitarbeiter an mit Endotoxin bzw. Malaria-Parasiten infizierten Mäusen eine erhöhte Kynurenin-Konzentration mit konsekutiver Hypotonie beobachten. Durch Gabe von IDO-Inhibitoren konnte der Blutdruck der systemisch infizierten Mäuse dosisabhängig gesteigert werden. In IDO-defizienten Mäusen konnte kein blutdruckregulierender Effekt erzielt werden.¹⁵⁸ Hypothetisch kann der Tryptophan-Metabolismus als mögliches therapeutisches Target zur Regulation des Gefäßtonus betrachtet werden.

Aktuell werden die errechnete IDO-Aktivität und der Kynureninplasmaspiegel als mögliche sensitive Diagnoseparameter einer beginnenden Sepsis diskutiert. Pellegrin et al. konnten an Patienten mit schwerem Polytrauma, die ein septisches Krankheitsbild entwickelten, bereits am Tag 2 nach klinischer Aufnahme eine rechnerisch gesteigerte IDO-Aktivität evaluieren.¹⁵⁹ Löttgers et al. beobachteten, dass Patienten mit schwerem Trauma und hohem Kynureninspiegel am Tag 2 der Krankenhausaufenthaltsdauer im weiteren Verlauf eine Sepsis entwickelten.¹⁶⁰ Diese Ergebnisse konnten durch weitere Arbeitsgruppen jedoch bisher noch nicht bestätigt

werden. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen von GM-CSF in Bezug auf die Regulation derIDO-Aktivität konnten in dieser Arbeit nicht weiterführend untersucht werden. Die vorgelegten Daten unterstreichen jedoch die Bedeutung vonIDO im Rahmen der Immundysregulation bei Patienten mit schwerer Sepsis bzw. im septischen Schock.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse müssen jedoch Limitationen der Studie berücksichtigt werden:

1. Im Rahmen der vorliegenden Analysen wurde die Aktivität der TDO nicht bestimmt. Das ausschließlich hepatisch exprimierte Enzym TDO reguliert zusätzlich zu IDO die systemische L-Tryptophan-Homöostase. TDO ist nach heutigem Kenntnisstand nicht durch immunologische Mediatoren induzierbar und spielt in der Sepsis vermutlich eine untergeordnete Rolle.

2. Häufig tritt im Rahmen eines septischen Krankheitsbildes ein akutes Nierenversagen auf. Bisherige Daten zeigen, dass Nierenerkrankungen mit einer Aktivierung der IDO-Aktivität und der Tryptophan-Metabolite einhergehen.¹⁶¹ Hämodialyse hat keinen Einfluss auf die IDO-Aktivität und führt zu einer mäßigen Beeinflussung der Kyn, Kyna und Quin sowie des 5-HTP-Spiegels. Das Vorliegen von akutem Nierenversagen und Dialysepflicht könnten die hier dargestellten Serumspiegel von Trp und Trp-Metabolite somit beeinflusst haben. Da sich Verum- und Placebogruppe jedoch nicht in der Schwere der Niereninsuffizienz, Häufigkeit des Vorliegens von akutem Nierenversagen oder Häufigkeit der Dialysetherapie unterscheiden, spielt dieser Aspekt vermutlich eine untergeordnete Rolle.

3. Patienten, welche in der frühen hyperinflammatorischen „Schockphase“ der schweren Sepsis bzw. des septischen Schocks versterben, wurden durch das gewählte Studiendesign nicht erfasst. Somit konnten in der vorliegenden Studie nur Aussagen bezüglich einer Subpopulation septischer Patienten getroffen werden.

Die gezeigten Studienergebnisse bedürfen der Verifizierung durch größer angelegte Folgeuntersuchungen. Zielführend zur Aufklärung der Wirkungseffizienz von GM-CSF auf den Trp-Metabolismus wäre weiterhin die differenzierte Betrachtung unterschiedlicher T-Zell-(Sub-)Populationen. Des Weiteren wäre ein möglicher Einfluss von GM-CSF auf die enzymatische Aktivität von TDO zu klären.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die GM-CSF Therapie bei Patienten mit Sepsis-assoziiertes Immunsuppression zu signifikanten Veränderungen im Trp- undIDO-Metabolismus führt. Dies ist mit einem verminderten Grad der Bakteriämie (gemessen am Surrogat-Parameter PCT) assoziiert. Obwohl ein mechanistischer Zusammenhang hier nicht bewiesen werden kann, unterstreichen unsere Daten die Rolle des Trp-Metabolismus und der IDO-Aktivität im Rahmen der Immunregulation bei Sepsis.

6 Anhang

6.1 Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|--|----|
| Abbildung 1: | Anzahl der Todesfälle pro Jahr in Deutschland | 2 |
| Abbildung 2: | Hypothetischer Verlauf einer Immunreaktion in der Sepsis | 4 |
| Abbildung 3: | Tryptophan-Metabolismus und Sepsis-assoziierteIDO-Aktivität..... | 10 |
| Abbildung 4: | Therapie der Sepsis | 14 |
| Abbildung 5: | Studiendesign der GM-CSF Studie | 17 |
| Abbildung 6: | ELISA | 20 |
| Abbildung 7: | Schematischer Aufbau einer durchflusszytometrischen Apparatur | 21 |
| Abbildung 8: | Schematische Darstellung eines Massenspektrometers | 22 |
| Abbildung 9: | Bsp. Messergebnis Tryptophan-Metabolismus | 23 |
| Abbildung 10: | Screening und Randomisierung der GM-CSF Studie | 26 |
| Abbildung 11: | Verlauf der Tryptophan-Plasmaspiegel | 30 |
| Abbildung 12: | Verlauf Kyn und Kyna-Plasmaspiegel | 31 |
| Abbildung 13: | Verlauf Quinolinsäure-Plasmaspiegel | 31 |
| Abbildung 14: | Verlauf 5-HTP- und 5-HT-Plasmaspiegel | 31 |
| Abbildung 15: | Indolamin-2,3-Dioxygenase-Aktivität | 32 |
| Abbildung 16: | Streudiagramm: IDO-Aktivität mit HLA-DR-Expression | 33 |
| Abbildung 17: | Streudiagramm: IDO-Aktivität mit PCT-Spiegel | 34 |

6.2 Tabellenverzeichnis

| | | |
|------------|--|----|
| Tabelle 1: | Diagnosekriterien der Sepsis, schweren Sepsis und des septischen Schocks | 1 |
| Tabelle 2: | Einschlusskriterien | 18 |
| Tabelle 3: | Studienpopulation zum Einschlusszeitpunkt | 25 |
| Tabelle 4: | Studienpopulation nach Therapie | 27 |
| Tabelle 5: | Entzündungsmediatoren, HLA-DR-Expression und GM-CSF-Spiegel ... | 28 |

6.3 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herr Prof. Dr. med. H.D. Volk, ärztlicher Direktor des Instituts für medizinische Immunologie, danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Promotionsarbeit und die zielführenden Diskussionen.

Frau Prof. Dr. med. P. Reinke danke ich herzlichst für die Überlassung des Themas und die vielfältigen Anregungen.

Besonderen Dank schulde ich Herrn PD. Dr. med. J.C. Schefold. Ich danke ihm für die stets hervorragende und unermüdliche Betreuung. Insbesondere die konstruktiven fachlichen und menschlichen Diskussionen und wertvollen Anregungen sowie die wegweisende Förderung der eigenverantwortlichen Arbeitsweise waren Grundbausteine die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Dr. C. Meisel danke ich für die Vermittlung von immunologischen Wissen und zahlreichen täglichen Hilfestellungen im Rahmen der Durchführung der Promotion.

Zudem danke ich allen Ärztinnen und Ärzten, Krankenschwestern und Pflegern der Intensivstationen der Charité – Universitätsmedizin Berlin, die mich bei der Durchführung der klinischen Studie unterstützt haben. Besonderen Dank schulde ich Frau OÄ Dr. med. H. Zuckermann-Becker sowie Herrn OA. Dr. med. D. Hasper für die wohlwollende Unterstützung meiner Arbeit.

Last but not least – danke ich meiner Familie und Anja Scholz. Ohne ihre Unterstützung wäre der erfolgreiche Abschluss dieser Dissertation nicht möglich gewesen.

6.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich, René Pschowski, erkläre an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Der Einfluss von Granulozyten-Makrophagen Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) auf den Tryptophan-Metabolismus und die Indoleamin-2,3-Dioxygenase-Aktivität bei Patienten mit schwer Sepsis/ septischem Schock und Sepsis-assoziiertes Immunsuppression" 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:

6.5 Lebenslauf

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

6.6 Publikationsverzeichnis

2010

- Schefold JC, Zeden JP, **Pschowski R**, Hammoud B, Fotopoulou C, Hasper D, Fusch G, Von Haehling S, Volk HD, Meisel C, Schütt C, Reinke P. Treatment with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is associated with reduced indoleamine 2,3-dioxygenase activity and kynurenine pathway catabolites in patients with severe sepsis and septic shock. *Scand J Infect Dis*. **2010** Mar;42(3):164-71. PMID: 19958238
- Graf MG, Sinner B, Zink W. Anästhesie bei alten Menschen. (**2010**) Thieme. ISBN 978-3-13-148451-2 (Buchbeitrag: Kapitel 6.6 Gefäßerkrankungen: **Pschowski R**, Motsch J.)

2009

- **Pschowski R**, Schefold JC, Walther A, Hofer S. Transfusionsstrategien: Leitliniengerechte Diagnostik und Therapie. *Intensivmedizin up2date5* (2009)
- Meisel C, Schefold JC, **Pschowski R**, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med*. **2009** Oct 1;180(7):640-8. Epub 2009 Jul 9. PMID: 19590022
- Schefold JC, Zeden JP, Fotopoulou C, von Haehling S, **Pschowski R**, Hasper D, Volk HD, Schuett C, Reinke P. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. *Nephrol Dial Transplant*. **2009** Jun;24(6):1901-8. Epub 2009 Jan 20. PMID: 19155537

2008

- **Pschowski R**, Motsch J. [The postoperative pain therapy] *Wien Med Wochenschr*. **2008**;158(21-22):603-9. German. PMID: 19052705
- Schefold JC, Boldt LH, **Pschowski R**, Reinke P, Hasper D. Risk management after cardiopulmonary resuscitation--what is the real threat? *Crit Care Med*. **2008** Nov;36(11):3130-1; author reply 3131. No abstract available. Erratum in: *Crit Care Med*. 2009 Jan;37(1):401

- Schefold JC, Storm C, Bercker S, **Pschowski R**, Oppert M, Krüger A, Hasper D. Inferior vena cava diameter correlates with invasive hemodynamic measures in mechanically ventilated ICU patients with sepsis. J Emerg Med. 2008 Mar 31. [Epub ahead of print]PMID: 18385005

2007

- Schefold JC. Hasper D. Storm C. Corsepilus M. **Pschowski R**. Reinke P. Die extrakorporale Therapie septischer Patienten. Gibt es eine extrarenale Indikation? (2007) Intensivmedizin und Notfallmedizin. Springer Berlin/Heidelberg. Volume 44, Number 2:57-63

7 Literaturverzeichnis

- 1 Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM, Septic shock. *Lancet*2005 ;365(9453):63-78.
- 2 Schefold JC. Measurement of monocytic HLA-DR (mHLA-DR) expression in patients with severe sepsis and septic shock: assessment of immune organ failure. *Intensive Care Med.*2010(36)1810-2.
- 3 Huttunen R, Syriänen J, Aittoniemi J, Oja SS, Raitala A, Laine J, et al. High activity of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. *Shock*2009(33)149-154.
- 4 Logters TT, Laryea MD, Altrichter J, Sokolowski J, Cinatl J, Reipen J, et al. Increased plasma kynurenine values and kynurenine-tryptophan ratios after major trauma are early indicators for the development of sepsis. *Shock*2009(32)29-34.
- 5 Schefold JC, Zeden JP, Fotopoulou C, von Haehling S, Pschowski R, Hasper D et al. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uremic symptoms. (2009) *Nephrol Dial Transplant*2009(24)1901-8.
- 6 Bone RC, Balk RA, Cerra FB et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in Sepsis. The ACCP/SCCMK Consensus Conference Committee. *American Care Medicine. Chest* (1992)101: 1644-55.
- 7 Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis, 1. Revision der S-2 Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) 2010
- 8 Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003(4):1250-6.
- 9 Bone RC, Balk RA, Cerra FB et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in Sepsis. The ACCP/SCCMK Consensus Conference Committee. *American Care Medicine. Chest* 1992;101: 1644-55.
- 10 Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis, 1. Revision der S-2 Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) 2010
- 11 Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. Epidemiology of sepsis in Germany: results

-
- from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* 2007 Apr;33(4):606-18. Epub 2007 Feb 24.
- 12 Graf J, Brunkhorst F.M, Reinhart K, Langzeitfolgen und sozialökonomische Bedeutung der Sepsis. *Med Welt* 2007;58:311-316
- 13 Moerer O, Burchardi H. Kosten der Sepsis. *Anaesthesist* 2006(55):S36-42
- 14 Statistisches Bundesamt.
<http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/Sites/destatis/Internet/DE/Content/Publikationen/Querschnittsveroeffentlichungen/WirtschaftStatistik/Gesundheitswesen/Todesursachen2004,property=file.pdf> (10.03.2010).
- 15 http://www.gbe-bund.de/gbe10/pkg_isgbe5.prc_isgbe?p_uid=gasts&p_aid=&p_sprache=D (10.04.2011)
- 16 Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol.* 1997 Feb;9(1):4-9. Review.
- 17 Agnello D, Lankford CS, Bream J, Morinobu A, Gadina M, O'Shea JJ, Frucht DM. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J Clin Immunol.* 2003 May;23(3):147-61.
- 18 Teufel F. Kretz F.J. *Anästhesie und Intensivmedizin.* Springer Verlag ISBN-10:3-540-62739-1
- 19 Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003 Jan 9;348(2):138-50.
- 20 Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl 1:S124-8
- 21 Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med.* 2000 Apr;28(4 Suppl):N3-12
- 22 Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003 Jan 9;348(2):138-50.
- 23 Saenz JJ, Izura JJ, Manrique A, Sala F, Gaminde I. Early prognosis in severe sepsis via analyzing the monocyte immunophenotype. *Intensive Care Med.* 2001 Jun;27(6):970-7.
- 24 Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003 Jan 9;348(2):138-150.
- 25 Schefold JC, Hasper D, Volk HD, Reinke P. Sepsis: Time has come to focus on the later stages. *Medical Hypotheses* 2008 71:203-208

-
- 26 Landelle C, Lepape A, Voirin N, Tognet E, Venet F, Bohé J, Vanhems P, Monneret G. Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock. *Intensive Care Med.* 2010 Nov;36(11):1859-66. Epub 2010 Jul 23.
- 27 Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohé J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 2006 Aug;32(8):1175-83. Epub 2006 Jun 2.
- 28 Hopkins FG, Cole SW. A contribution to the chemistry of proteids: Part I. A preliminary study of a hitherto undescribed product of tryptic digestion. *J Physiol.* 1901 Dec 23;27(4-5):418-28.
- 29 Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology* (2003) 81:247-265
- 30 Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook GA, Lowry CA. Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. *Expert Rev Mol Med.* 2006 Aug 31;8(20):1-27.
- 31 Takikawa O. Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated L-tryptophan metabolism. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Dec 9;338(1):12-9. Epub 2005 Sep 15.
- 32 Hofmann F. Ido brings down the pressure in systemic inflammation. *Nature Medicine* (2010) 16:265-266
- 33 Liao M, Pabarcus MK, Wang Y, Hefner C, Maltby DA, Medzihradzsky KF, Salas-Castillo SP, Yan J, Maher JJ, Correia MA. Impaired dexamethasone-mediated induction of tryptophan 2,3-dioxygenase in heme-deficient rat hepatocytes: translational control by a hepatic eIF2alpha kinase, the heme-regulated inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Dec;323(3):979-89. Epub 2007 Aug 29.
- 34 Shimizu T, Nomiya S, Hirata F, Hayaishi O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *J Biol Chem.* 1978 Jul 10;253(13):4700-6.
- 35 Schmidt SK, Müller A, Heseler K, Woite C, Spekker K, MacKenzie CR, Däubener W. Antimicrobial and immunoregulatory properties of human tryptophan 2,3-dioxygenase. *Eur J Immunol.* 2009 Oct;39(10):2755-64.
- 36 Hayaishi O, Hirata F, Fujiwara M, Senoh S, Tokuyama T. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Note II. Biological function. *Acta Vitaminol Enzymol.* 1975;29(1-6):291-3. *Acta Vitaminol Enzymol.* 1975;29(1-6):291-3.
- 37 Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology* (2003) 81:247-265

-
- 38 Shimizu T, Nomiya S, Hirata F, Hayaishi O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *J Biol Chem*. 1978 Jul 10;253(13):4700-6.
- 39 Stone TW. Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev*. 1993 Sep;45(3):309-79.
- 40 O'Connor JC, André C, Wang Y, Lawson MA, Szegedi SS, Lestage J, Castanon N, Kelley KW, Dantzer R. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha mediate the upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and the induction of depressive-like behavior in mice in response to bacillus Calmette-Guerin. *J Neurosci*. 2009 Apr 1;29(13):4200-9.
- 41 Müller A, Heseler K, Schmidt SK, Spekter K, Mackenzie CR, Däubener W. The missing link between indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects. *J Cell Mol Med*. 2008 Oct 13.
- 42 Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol*. 2000 Apr 1;164(7):3596-9.
- 43 Fallarino F, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Gizzi S, Asselin-Paturel C, Fioretti MC, Trinchieri G, Grohmann U, Puccetti P. Ligand and cytokine dependence of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in plasmacytoid dendritic cells. *Int Immunol*. 2005 Nov;17(11):1429-38. Epub 2005 Sep 19.
- 44 Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K, Broide DH, Carson DA, Raz E. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest*. 2004 Jul;114(2):270-9.
- 45 Fallarino F, Puccetti P. Toll-like receptor 9-mediated induction of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism. *Eur J Immunol*. 2006 Jan;36(1):8-11.
- 46 Burkin DJ, Kimbro KS, Barr BL, Jones C, Taylor MW, Gupta SL. Localization of the human indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) gene to the pericentromeric region of human chromosome 8. *Genomics*. 1993 Jul;17(1):262-3.
- 47 Hassanain HH, Chon SY, Gupta SL. Differential regulation of human indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression by interferons-gamma and -alpha. Analysis of the regulatory region of the gene and identification of an interferon-gamma-inducible DNA-binding factor. *J Biol Chem*. 1993 Mar 5;268(7):5077-84.
- 48 Ball HJ, Yuasa HJ, Austin CJ, Weiser S, Hunt NH. Indoleamine 2,3-dioxygenase 2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Mar;41(3):467-71.

-
- 49 Ball HJ, Yuasa HJ, Austin CJ, Weiser S, Hunt NH. Indoleamine 2,3-dioxygenase 2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Mar;41(3):467-71.
- 50 Puccetti P, Grohmann U. IDO and regulatory T cells: a roles for reverse signaling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat Rev Immunol* (2007) 7(10):817-823
- 51 Heikenwalder M, Polymenidou M, Junt T, Sigurdson C, Wagner H, Akira S, et al. Lymphoid follicle destruction and immunosuppression after repeated CpG oligodeoxynucleotide administration. *Nat Med* 2004(10):187-92
- 52 Hissong BD, Carlin JM. Potentiation of interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase mRNA in human mononuclear phagocytes by lipopolysaccharide and interleukin-1. *J Interferon Cytokine Res.* 1997 Jul;17(7):387-93.
- 53 Byrne GI, Lehmann LK, Landry GJ. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect Immun.* 1986 Aug;53(2):347-51.
- 54 Byrne GI, Lehmann LK, Kirschbaum JG, Borden EC, Lee CM, Brown RR. Induction of tryptophan degradation in vitro and in vivo: a gamma-interferon-stimulated activity. *J Interferon Res.* 1986 Aug;6(4):389-96. *J Interferon Res.* 1986 Aug;6(4):389-96.
- 55 Hill M, Tanguy-Royer S, Royer P, Chauveau C, Asghar K, Tesson L, Lavainne F, Rémy S, Brion R, Hubert FX, Heslan M, Rimbert M, Berthelot L, Moffett JR, Josien R, Grégoire M, Anegon I. IDO expands human CD4+CD25high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2007 Nov;37(11):3054-62.
- 56 MacKenzie CR, Hadding U, Däubener W. Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. *J Infect Dis.* 1998 Sep;178(3):875-8.
- 57 Brown J, Howie SE, Entrican G. A role for tryptophan in immune control of chlamydial abortion in sheep. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001 Sep 28;82(1-2):107-19.
- 58 Däubener W, MacKenzie CR. IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv Exp Med Biol.* 1999;467:517-24.
- 59 Däubener W, Spors B, Hucke C, Adam R, Stins M, Kim KS, Schrotten H. Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun.* 2001 Oct;69(10):6527-31.
- 60 Hayashi T, Rao SP, Takabayashi K, Van Uden JH, Kornbluth RS, Baird SM, Taylor MW, Carson DA, Catanzaro A, Raz E. Enhancement of innate immunity

-
- against *Mycobacterium avium* infection by immunostimulatory DNA is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun.* 2001 Oct;69(10):6156-64
- 61 Okamoto T, Toné S, Kanouchi H, Miyawaki C, Ono S, Minatogawa Y. Transcriptional regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) by tryptophan and its analogue : Down-regulation of the indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) transcription by tryptophan and its analogue. *Cytotechnology.* 2007 Jun;54(2):107-13. Epub 2007 Jun 19.
- 62 Heseler K, Spekker K, Schmidt SK, MacKenzie CR, Däubener W. Antimicrobial and immunoregulatory effects mediated by human lung cells: role of IFN-gamma-induced tryptophan degradation. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 Mar;52(2):273-81. Epub 2008 Jan 16.
- 63 Spekker K, Czesla M, Ince V, Heseler K, Schmidt SK, Schares G, Däubener W. Indoleamine 2,3-dioxygenase is involved in defense against *Neospora caninum* in human and bovine cells. *Infect Immun.* 2009 Oct;77(10):4496-501. Epub 2009 Jul 20.
- 64 Heseler K. Die Indolamin 2,3-Dioxygenase als antimikrobieller und immunregulatorischer Effektormechanismus: Bedeutung in der Infektions- und Transplantationsimmunologie (2009) Inaugural-Diss. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf S: 10-19
- 65 Adams O, Besken K, Oberdörfer C, MacKenzie CR, Rüssing D, Däubener W. Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes Infect.* 2004 Jul;6(9):806-12.
- 66 Adams O, Besken K, Oberdörfer C, MacKenzie CR, Rüssing D, Däubener W. Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes Infect.* 2004 Jul;6(9):806-12.
- 67 Thomas SM, Garrity LF, Brandt CR, Schobert CS, Feng GS, Taylor MW, Carlin JM, Byrne GI. IFN-gamma-mediated antimicrobial response. Indoleamine 2,3-dioxygenase-deficient mutant host cells no longer inhibit intracellular *Chlamydia* spp. or *Toxoplasma* growth. *J Immunol.* 1993 Jun 15;150(12):5529-34.
- 68 Wood H, Roshick C, McClarty G. Tryptophan recycling is responsible for the interferon-gamma resistance of *Chlamydia psittaci* GPIC in indoleamine dioxygenase-expressing host cells. *Mol Microbiol.* 2004 May;52(3):903-16.
- 69 Xie G, Bonner CA, Jensen RA. Dynamic diversity of the tryptophan pathway in chlamydiae: reductive evolution and a novel operon for tryptophan recapture. *Genome Biol.* 2002 Aug 29;3(9)
- 70 Müller A, Heseler K, Schmidt SK, Spekker K, Mackenzie CR, Däubener W. The missing link between indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects. *J Cell Mol Med.* 2009 Jun;13(6):1125-35.

-
- 71 Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med*. 1999 May 3;189(9):1363-72.
- 72 Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology*. 2002 Dec;107(4):452-60.
- 73 Müller A, Heseler K, Schmidt SK, Spekker K, Mackenzie CR, Däubener W. The missing link between indoleamine 2,3-dioxygenase mediated antibacterial and immunoregulatory effects. *J Cell Mol Med*. 2009 Jun;13(6):1125-35.
- 74 Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*. 2002 Aug 19;196(4):459-68
- 75 Terness P, Bauer TM, Röse L, Duffer C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*. 2002 Aug 19;196(4):447-57.
- 76 Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ*. 2002 Oct;9(10):1069-77.
- 77 Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Calcinaro F, Falorni A, Candeloro P, Belladonna ML, Bianchi R, Fioretti MC, Puccetti P. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):1097-101.
- 78 Terness P, Bauer TM, Röse L, Duffer C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*. 2002 Aug 19;196(4):447-57.
- 79 Hill M, Tanguy-Royer S, Royer P, Chauveau C, Asghar K, Tesson L, Lavainne F, Remy S, Brion R, Hubert FX et al. IDO expands human CD4⁺CD24^{high} regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur J Immunol* 2007, 37(11):3054-3062.
- 80 Huttunen R, Syrjänen J, Aittoniemi J, Oja SS, Raitala A, Laine J, Pertovaara M, Vuento R, Huhtala H, Hurme M. High activity of indoleamine 2,3 dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. *Shock*. 2010 Feb;33(2):149-54.
- 81 Huttunen R, Syrjänen J, Aittoniemi J, Oja SS, Raitala A, Laine J, et al. High activity of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. (2009) *Shock*.

-
- 82 Logters TT, Laryea MD, Altrichter J, Sokolowski J, Cinatl J, Reipen J, et al. Increased plasma kynurenine values and kynurenine-tryptophan ratios after major trauma are early indicators for the development of sepsis. (2009) *Shock* (32) 29-34.
- 83 Schefold JC, Zeden JP, Fotopoulou C, von Haehling S, Pschowski R, Hasper D et al. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uremic symptoms. (2009) *Nephrol Dial Transplant*; 24:1901-8.
- 84 Wang Y, Liu H, McKenzie G, Witting PK, Stasch JP, Hahn M, Changsirivathanathamrong D, Wu BJ, Ball HJ, Thomas SR, Kapoor V, Celermajer DS, Mellor AL, Keaney JF Jr, Hunt NH, Stocker R. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nat Med*. 2010 Mar;16(3):279-85.
- 85 Trevor W. Stone, L. Gail Darlington Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery* (2002)1:609-620
- 86 Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology* (2003) 81:247-265
- 87 Grant SM, Heel RC. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rGM-CSF). A review of its pharmacological properties and prospective role in the management of myelosuppression. *Drugs*. 1992 Apr;43(4):516-60.
- 88 Goodall GJ, Bagley CJ, Vadas MA, Lopez AF. A model for the interaction of the GM-CSF, IL-3 and IL-5 receptors with their ligands. *Growth Factors*. 1993;8(2):87-97
- 89 Grant SM, Heel RC. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rGM-CSF). A review of its pharmacological properties and prospective role in the management of myelosuppression. *Drugs*. 1992 Apr;43(4):516-60.
- 90 Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity (2008). *Nat Rev Immunol* 8 (7):533-44
- 91 Demetri GD, Griffin JD. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*. 1991 Dec 1;78(11):2791-808.
- 92 Sakamoto KM, Golde DW, Gasson JC. The biology and clinical applications of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Pediatr*. 1991 Mar;118(3):S17-20
- 93 Dombret H, Chastang C, Fenaux P, Reiffers J, Bordessoule D, Bouabdallah R, Mandelli F, Ferrant A, Auzanneau G, Tilly H, et al. A controlled study of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in elderly patients

-
- after treatment for acute myelogenous leukemia. AML Cooperative Study Group. *N Engl J Med*. 1995 Jun 22;332(25):1678-83.
- 94 Bilgin K, Yaramiş A, Haspolat K, Taş MA, Günbey S, Derman O. A randomized trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neonates with sepsis and neutropenia. *Pediatrics*. 2001 Jan;107(1):36-41.
- 95 Nierhaus A. et al Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* (2003) 29:646-651
- 96 Ballinger MN, Paine R III, Serezani CH, Aronoff DM, Choi ES, Standiford TJ, Toews GB, Moore BB. Role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor during gram-negative lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Cell Mol Biol* (2006);34:766-774.
- 97 Baleeiro CE, Christensen PJ, Morris SB, Mendez MP, Wilcoxon SE, Paine R III. GM-CSF and the impaired pulmonary innate immune response following hyperoxic stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2006);291:L1246-L1255
- 98 Lieschke GJ, Stanley E, Grail D, Hodgson G, Sinickas V, Gall JA, Sinclair RA, Dunn AR: Mice lacking both macrophage- and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor have macrophages and coexistent osteopetrosis and severe lung disease. *Blood* 1994;84:27-35.
- 99 Paine R III, Preston AM, Wilcoxon S, Jin H, Siu BB, Morris SB, Reed JA, Ross G, Whitsett JA, Beck JM. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the innate immune response to *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *J Immunol* 200;164:2602-2609.
- 100 Armitage JO. Emerging applications of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 1998 Dec 15;92(12):4491-508. Review.
- 101 Demuyneck H, Zachée P, Verhoef GE, Schetz M, Van den Berghe G, Lauwers P, Boogaerts MA. Risks of rhG-CSF treatment in drug-induced agranulocytosis. *Ann Hematol*. 1995 Mar;70(3):143-7.
- 102 Verhoef G, Boogaerts M. Treatment with granulocyte-macrophage colony stimulating factor and the adult respiratory distress syndrome. *Am J Hematol*. 1991 Apr;36(4):285-7.
- 103 Chevallier B, Chollet P, Merrouche Y, Roche H, Fumoleau P, Kerbrat P, Genot JY, Fargeot P, Olivier JP, Fizames C, et al. Lenograstim prevents morbidity from intensive induction chemotherapy in the treatment of inflammatory breast cancer. *J Clin Oncol*. 1995 Jul;13(7):1564-71.
- 104 Reinhart K, Meisner M et al. Markers for sepsis diagnosis: what is useful? *Crit Care Clin* 2006; 22: 503–19, ix-x

-
- 105 Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med* 2008;36:941-52.
- 106 De Kruif MD, Lemaire LC, Giebelen IA, Struck J, Morgenthaler NG, Papassotiriou J, et al. The influence of corticosteroids on the release of novel biomarkers in human endotoxemia. *Intensive Care Med* 2008;34:518-22.
- 107 Dandona P, Nix D, Wilson MF, Aljada A, Love J, Assicot M, et al. Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79(6):1605-8.
- 108 Simon L, Gauvin F, Amre DK, Saint-Louis P, Lacroix J. Serum procalcitonin and C-reactive protein levels as markers of bacterial infection: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2004 Jul 15;39(2):206-17.
- 109 Pettila V, Hynninen M, Takkunen O, Kuusela P, Valtonen M. Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with suspected sepsis. *Intensive Care Med*. 2002 Sep;28(9):1220-5.
- 110 Jones, S.A. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. (2005) *J Immunol* 175:3463-8.
- 111 Heinrich, P.C. et al. Principles of Interleukin (IL)-6-type signalling and its regulation. (2003) *Biochem J* 374:1-20.
- 112 C. P. Fischer. Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?. In: *Exerc Immunol Rev* 12, 2006, S. 6–33.
- 113 Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling--regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med*. 2000 Apr;28(4 Suppl):N3-12.
- 114 Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis*. 2003;35(9):535-44.
- 115 Pilz G, Fraunberger P, Appel R, Kreuzer E, Werdan K, Walli A, Seidel D. Bedeutung erhöhter TNF-Rezeptor-Spiegel bei herzchirurgischen Risikopatienten. *Infusionsther Transfusionsmed* (1996) 23 [Suppl 4]:29-34
- 116 Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM. Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol*. 2005 Oct;5(10):793-806.
- 117 Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006 Aug;32(8):1175-83.
- 118 Hoeflich C, Volk HD. [Immunomodulation in sepsis]. *Chirurg*. 2002 Nov;73(11):1100-4.

-
- 119 Docke WD, Hoflich C, Davis KA, Rottgers K, Meisel C, Kiefer P, et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem.* 2005 Dec;51(12):2341-7.
- 120 Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med.* 2006 Aug;32(8):1175-83.
- 121 Döcke WD, Höflich C, Davis KA, Röttgers K, Meisel C, Kiefer P, Weber SU, Hedwig-Geissing M, Kreuzfelder E, Tschentscher P, Nebe T, Engel A, Monneret G, Spittler A, Schmolke K, Reinke P, Volk HD, Kunz D. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem.* 2005 Dec;51(12):2341-7. Epub 2005 Oct 7.
- 122 Lefering R, Dicke S, Böttcher B, Neugebauer E. Apache II score and prognosis of intensive care patients after trauma--results of a quality assurance study of 939 patients *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 1997;114:1387-9.
- 123 Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* 1996 Jul;22(7):707-10.
- 124 Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2004 Mar;32(3):858-73.
- 125 Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Gerlach H, Gründling M, Kreyman G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A, Peckelsen C, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stüber F, Weiler N, Welte T, Werdan K, S2-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung der Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI), Stuttgart:Thieme;2007.
- 126 Lipiner-Friedman D, Sprung CL, Laterre PF et al. Adrenal function in sepsis: the retrospective Corticus cohort study. (2007) *Crit Care Med* 35:1012-1018.
- 127 Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis, 1. Revision der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) 2010
- 128 Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl 1:S124-8.
- 129 Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated

-
- immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Oct 1;180(7):640-8. Epub 2009 Jul 9.
- 130 Sernetz M, Giese C, Hauptmann U, Hild D. *Klinische Laboratoriumsdiagnostik* (2000). Gießen, 13. Auflage 2000 URL: <http://www.uni-giessen.de/~gi38/publica/labor/homepage.html> (abgerufen: 26. Februar 2011)
- 131 Leuthold, J. *Untersuchungen zur Qualität von peripheren Blutstammzellpräparaten - ultrastrukturelle Studien zur Beurteilung der Kryoprotektion* (2003) Promotion. HU-Berlin. S.47
- 132 Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology* (2003) 81:247-265
- 133 Schneider H, Steimer W. Tandem mass spectrometry in drug monitoring: experience and pitfalls in application (2006) *LaboratoriumsMedizin.* (30) 428–437
- 134 Amirkhani A, Heldin E, Markides KE, Bergquist J. Quantitation of tryptophan, kynurenine and kynurenic acid in human plasma by capillary liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry *Journal of Chromatography B*, 780 (2002) 381–387
- 135 Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Oct 1;180(7):640-8. Epub 2009 Jul 9. PMID: 19590022
- 136 Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Oct 1;180(7):640-8. Epub 2009 Jul 9. PMID: 19590022
- 137 Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Oct 1;180(7):640-8. Epub 2009 Jul 9. PMID: 19590022
- 138 Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, Volk HD. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled

-
- multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009 Oct 1;180(7):640-8. Epub 2009 Jul 9. PMID: 19590022
- 139 Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology* (2003) 81:247-265
- 140 Huttunen R, Syrijanen J, Aittoniemi J, Oja SS, Raitala A, Laine J, et al. High activity of indolamine 2,3-dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. (2009) *Shock*.
- 141 Logters TT, Laryea MD, Altrichter J, Sokolowski J, Cinatl J, Reipen J, et al. Increased plasma kynurenine values and kynurenine-tryptophan ratios after major trauma are early indicators for the development of sepsis. (2009) *Shock* (32) 29-34.
- 142 Schefold JC, Zeden JP, Fotopoulou C, von Haehling S, Pschowski R, Hasper D et al. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uremic symptoms. (2009) *Nephrol Dial Transplant*; 24:1901-8.
- 143 Huttunen R, Syrijanen J, Aittoniemi J, Oja SS, Raitala A, Laine J, et al. High activity of indolamine 2,3-dioxygenase enzyme predicts disease severity and case fatality in bacteremic patients. (2009) *Shock*.
- 144 Logters TT, Laryea MD, Altrichter J, Sokolowski J, Cinatl J, Reipen J, et al. Increased plasma kynurenine values and kynurenine-tryptophan ratios after major trauma are early indicators for the development of sepsis. (2009) *Shock* (32) 29-34.
- 145 Schefold JC, Zeden JP, Fotopoulou C, von Haehling S, Pschowski R, Hasper D et al. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uremic symptoms. (2009) *Nephrol Dial Transplant*; 24:1901-8.
- 146 Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology* (2003) 81:247-265
- 147 Hill M, Tanguy-Royer S, Royer P, Chauveau C, Asghar K, Tesson L, Lavainne F, Remy S, Brion R, Hubert FX et al. IDO expands human CD4⁺CD24^{high} regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur J Immunol* 2007, 37(11):3054-3062.
- 148 Sas, K., et al., Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *J Neurol Sci*, 2007. 257(1-2): p. 221-39.
- 149 Kwidzinski, E. and I. Bechmann, IDO expression in the brain: a double-edged sword. *J Mol Med*, 2007. 85(12): p. 1351-9.

-
- 150 Schwarcz, R., W.O. Whetsell, Jr., and R.M. Mangano, Quinolinic acid: an endogenous metabolite that produces axon-sparing lesions in rat brain. *Science*, 1983. 219(4582): p. 316-8.
- 151 Smith, A.J., T.W. Stone, and R.A. Smith, Neurotoxicity of tryptophan metabolites. *Biochem Soc Trans*, 2007. 35(Pt 5): p. 1287-9.
- 152 Zeden JP, Fusch G, Holtfreter B, Schefold JC, Reinke P, Domanska G, Haas JP, Gruending M, Westerholt A, Schuett C. Excessive tryptophan catabolism along the kynurenine pathway precedes ongoing sepsis in critically ill patients. *Anaesth Intensive Care*. 2010 Mar;38(2):307-16.
- 153 Heyes MP, Lackner A. Increased cerebrospinal fluid quinolinic acid, kynurenic acid, and L-kynurenine in acute septicemia. *J Neurochem*. 1990 Jul;55(1):338-41.
- 154 Schefold JC, Zeden JP, Fotopoulou C, von Haehling S, Pschowski R, Hasper D, Volk HD, Schuett C, Reinke P. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Jun;24(6):1901-8. Epub 2009 Jan 20.
- 155 Hofmann F.IDO brings down the pressure in systemic inflammation. *Nature medicine*. 2010 (16):265-266
- 156 Reinhart K, Meisner M et al. Markers for sepsis diagnosis: what is useful? *Crit Care Clin* 2006; 22: 503–19, ix-x
- 157 Becker KL, Snider R, Nylan ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations. *Crit Care Med* 2008;36:941-52.
- 158 Wang Y, Liu H, McKenzie G, Witting PK, Stasch JP, Hahn M, Changsirivathanathamrong D, Wu BJ, Ball HJ, Thomas SR, Kapoor V, Celermajer DS, Mellor AL, Keaney JF Jr, Hunt NH, Stocker R. Kynurenine is an endothelium-derived relaxing factor produced during inflammation. *Nat Med*. 2010 Mar;16(3):279-85. Epub 2010 Feb 28.
- 159 Pellegrin, K., et al., Enhanced enzymatic degradation of tryptophan by indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to the tryptophan-deficient state seen after major trauma. *Shock*, 2005. 23(3): p. 209-15
- 160 Lögters TT, Laryea MD, Altrichter J, Sokolowski J, Cinatl J, Reipen J, Linhart W, Windolf J, Scholz M, Wild M. Increased plasma kynurenine values and kynurenine-tryptophan ratios after major trauma are early indicators for the development of sepsis. *Shock*. 2009 Jul;32(1):29-34.

-
- ¹⁶¹ Schefold JC, Zeden JP, Fotopoulou C, von Haehling S, Pschowski R, Hasper D, Volk HD, Schuett C, Reinke P. Increased indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) activity and elevated serum levels of tryptophan catabolites in patients with chronic kidney disease: a possible link between chronic inflammation and uraemic symptoms. *Nephrol Dial Transplant*. 2009 Jun;24(6):1901-8. Epub 2009 Jan 20.