

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

DISSERTATION

**Charakterisierung der Funktion Antigen-präsentierender Zellen
unter immunstimulatorischer Therapie mit
Granulozyten Monozyten Kolonie-stimulierendem Faktor
(GM-CSF)
in Patienten mit schwerer Sepsis und Immunparalyse**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Tycho Stephan Baumann
aus Heidelberg

Datum der Promotion:
27.02.2015

Meinem einzigartigen Bruder Achim

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	8
Abstract	9
Abkürzungsverzeichnis	10
1 Einleitung	14
1.1 Immunantwort	15
1.1.1 Angeborene und adaptive Immunantwort	15
1.1.2 Systemische Immunantwort und Sepsis	20
1.1.3 Immunpathogenese der Sepsis	20
1.1.4 Systemische Antiinflammation	23
1.1.5 Immunstatus mit Immunparalyse und immunmodulatorische Therapieansätze in der Sepsis.....	25
1.2 Granulozyten Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)	28
2 Problemstellung	30
3 Material und Methoden	32
3.1 Materialien	32
3.2 Methoden	37
3.2.1 Patienten	37
3.2.2 Studiendesign und Behandlungsschema	38
3.2.3 Laborbestimmungen.....	39
3.2.4 Klinische Datenerhebung (intensivmedizinische Scores)	39
3.2.5 Durchflusszytometrie (FACS).....	43
3.2.5.1 Grundlagen	43
3.2.5.2 Durchführung der FACS-Messungen	43
3.2.5.3 FACS-Auswertung	45
3.2.6 Funktionelle Charakterisierung Antigen-präsentierender Zellen (APC)	47
3.2.6.1 LPS	48
3.2.6.2 Pam3Cys	48
3.2.6.3 CpG-DNA.....	48
3.2.7 Monozytäre <i>ex vivo</i> -TNF- α -Sekretionskapazität	48
3.2.8 Bestimmung humoraler Faktoren mittels „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA).....	49
3.2.8.1 Bestimmung humoraler Faktoren mittels Immulite.....	49
3.2.8.2 Bestimmung humoraler Faktoren mittels Cytometric Bead Array (CBA).....	50
3.2.8.3 Bestimmung von Procalcitonin (PCT) mittels PCT-LIA	50
3.3 Statistische Auswertung	51
4 Ergebnisse	52
4.1 Studienpopulation	52

4.2	Patienten-Allokation, Randomisierung und Behandlungsschema.....	53
4.3	Hauptthese: Monozytäre HLA-DR-Expression	54
4.4	Sekundärthese: LPS induzierte TNF-α-Produktion	56
4.5	Veränderungen im Differentialblutbild.....	57
4.5.1	Neutrophile Granulozyten	57
4.5.2	Monozyten.....	58
4.5.3	Lymphozyten.....	59
4.5.3.1	T-Lymphozyten	59
4.5.3.1.1	CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -T-Lymphozyten.....	59
4.5.3.2	B-Lymphozyten und NK-Zellen.....	61
4.5.4	Thrombozyten	62
4.6	Zirkulierende inflammatorische Mediatoren	62
4.6.1	Messung von IL-6 im Plasma.....	63
4.6.2	Messung von IL-10 im Plasma.....	63
4.6.3	Messung von Procalcitonin (PCT) im Plasma	64
4.6.4	Messung von TNF- α im Plasma.....	64
4.6.5	Messung von GM-CSF im Plasma.....	64
4.7	Phänotypische Charakterisierung Antigen-präsentierender Zellen (APC).....	64
4.7.1	Monozyten.....	65
4.7.1.1	CD14 ⁺ CD16 ⁻ -(„klassische“) Monozyten.....	65
4.7.1.2	Pro-inflammatorische CD14 ⁺ CD16 ⁺ -Monozyten.....	66
4.7.2	Dendritische Zellen (DC)	68
4.7.2.1	Myeloide CD33 ⁺ -dendritische Zellen (MDC)	68
4.7.2.2	Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC).....	70
4.8	Funktionelle Charakterisierung Antigen-präsentierender Zellen (APC)	74
4.8.1	Zytokin-Produktion durch Monozyten und MDC nach Stimulation mit Endotoxin/LPS (TLR-4).....	74
4.8.2	Zytokin-Produktion durch Monozyten und MDC nach Stimulation mit Pam3Cys (TLR-2)	76
4.8.3	Zytokin-Produktion durch PDC nach Stimulation mit CpG-A-ODN (TLR-9)	78
4.9	Klinischer Verlauf	79
5	Diskussion.....	82
5.1	Der Effekt von GM-CSF auf die zelluläre Immunität	83
5.1.1	Phänotyp, Frequenz und Funktion Antigen-präsentierender Zellen (APC) unter GM-CSF-Therapie	83
5.2	Veränderungen des Differentialblutbildes unter GM-CSF-Therapie	100
5.3	Zirkulierende inflammatorische Mediatoren unter GM-CSF-Therapie	101
5.4	Effekt von GM-CSF auf den klinischen Verlauf in der schweren Sepsis.....	103
6	Zusammenfassung und Ausblick	106

7 Literaturverzeichnis	108
Lebenslauf	116
Publikationsliste	117
Eidesstattliche Versicherung	119
Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	120
Danksagung.....	121

Zusammenfassung

Die schwere Sepsis und der septische Schock stellen, trotz großen Ressourceneinsatzes, immer noch eine der Haupttodesursachen in den Industrienationen dar. Die modellhaft als biphasisches Geschehen betrachtete Immunantwort in der Sepsis, imponiert als frühe hyperinflammatorisch dominierte Phase, der sich eine hypoinflammatorisch dominierte Reaktion anschließt. Von zentraler Bedeutung ist eine immunpathologisch als globale Dysfunktion des zellulären Immunsystems definierte Situation („Immunparalyse“), die mit erhöhter Disposition für sekundär infektiöse Komplikationen und einer Verschlechterung des klinischen Outcomes korreliert. In diesem Kontext ergibt sich die völlig neue Rationale zur Durchführung klinischer Studien mit immunstimulatorischem Ansatz und dem Ziel einer Rekonstitution der defizienten Immunfunktion des septischen Patienten. Erstmals wird hier in einer Biomarker-basierten, prospektiven, randomisierten, doppelblind Placebo-kontrollierten klinischen Phase-II-Studie gezeigt, dass mittels immunstimulatorischer Therapie mit Granulozyten Monozyten-Kolonie stimulierendem Faktor (GM-CSF) in Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock im Zustand der Immunparalyse eine sichere und effektive Wiederherstellung der monozytären Immunkompetenz erreicht wird. Das spiegelt sich in einer Normalisierung der initial supprimierten HLA-DR-Expression sowie des Anstiegs proinflammatorischer Zytokinplasmaspiegel nach *ex vivo* LPS-Stimulation wider. Weiterhin wurden monozytäre Subpopulationen (CD14⁺CD16⁻ und CD14⁺CD16⁺) und dendritische Zellen (MDC und PDC) als Repräsentanten der Antigen-präsentierenden Zellen (APC) durchflusszytometrisch und mittels *ex vivo*-Stimulationsassays untersucht und durch das Expressionsmuster co-stimulatorischer Oberflächenmoleküle (CD40, CD80 und CD86) phänotypisch und funktionell unter GM-CSF-Therapie charakterisiert. Während sich dabei eine signifikante Aktivierung monozytärer Zellen ergab, war der aktivierende Einfluss auf dendritische Zellen eher gering. Im Hinblick auf klinische Parameter zeigte sich – trotz begrenzter Teststärke (n=38) einer *proof of concept*-Studie– ein positiver Effekt im Sinne einer Reduzierung der Dauer der künstlichen Beatmung wie auch der intensivmedizinischen Betreuung und der Gesamthospitalisierung; die 28 Tage-Mortalität wurde aufgrund der geringen n-Zahl erwartungsgemäß nicht statistisch signifikant gesenkt. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse scheint die Durchführung einer kontrollierten Phase IIb-Multicenter-Studie mit klinischen Endpunkten wie Mortalität zur Wirksamkeit einer immunstimulatorischen Therapie bei schwerer Sepsis und Immunparalyse gerechtfertigt.

Schlüsselwörter: Sepsis – Immunparalyse – Immunstimulatorische Therapie – HLA-DR – GM-CSF – Monozyten – APC – Co-stimulatorische Moleküle

Abstract

Despite substantial clinical, investigational and financial efforts, severe sepsis and septic shock remain a major cause of death in the western world. The biphasic model of the immune response in sepsis comprises an early predominantly hyperinflammatory phase and a subsequent predominantly hypoinflammatory reaction. The global dysfunction of cellular immunity („immunoparalysis“) is of crucial pathophysiological importance as it correlates with an increased risk of secondary infectious complications and worsening of clinical outcome. This sets the stage for clinical studies with a novel immunostimulatory approach aiming at the reconstitution of the deficient immunofunction in septic patients.

The present study shows for the first time in a biomarker-based, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical phase-II trial that the immunostimulatory therapy with granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) leads to a safe and effective reconstitution of monocyte function in patients with severe sepsis or septic shock and sepsis-associated immunosuppression. In this respect, a normalization was observed of the initially suppressed expression of HLA-DR as well as the increase of proinflammatory cytokine plasma levels after *ex vivo* stimulation with LPS. Additionally, monocyte subpopulations (CD14⁺CD16⁻ and CD14⁺CD16⁺) and dendritic cells (MDC and PDC) as representatives of antigen-presenting cells (APC) were assessed by flow cytometry (FACS) and *ex vivo*-stimulation assays thus allowing a phenotypical characterization by expression of costimulatory molecules (CD40, CD80 and CD86) as well as an estimation of their functional status under therapy with GM-CSF. While observing a lesser influence on dendritic cells, a significant activation of monocytes was shown.

Despite a limited test power (n=38) of a proof of concept study with regard to clinical parameters, a shorter time of mechanical ventilation and a shorter length of both intensive care unit and intrahospital stay were observed indicating a beneficial effect of GM-CSF. As could be expected due to the low case number, no statistically significant reduction in the 28-day mortality was shown. Based on the current results a controlled phase IIb multicenter trial powered to detect improvements of clinical parameters and mortality as primary endpoints seems justified.

Key words: sepsis – immunoparalysis – immunostimulatory therapy – HLA-DR – GM-CSF – monocytes – APC – co-stimulatory molecules

Abkürzungsverzeichnis

Ab	engl.: antibody
ANOVA	engl.: analysis of variance
APACHE	engl.: acute physiology and chronic health evaluation
APC	Allophycocyanin
APC	engl.: antigen presenting cell
Aqua dest	latein.: aqua destillata
BDCA	engl.: blood dendritic cell antigen
BMI	engl.: body mass index
C	Celsius
CARS	engl.: compensatory anti- inflammatory response syndrome
CD	engl.:cluster of differentiation
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Desoxycytosin–Desoxyguanosin
CRP	C-reaktives Protein
DC	Dendritische Zelle
DNA	engl.: deoxyribonuclid acid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl.: enyzme linked immunosorbent assay
et al.	latein.: et alii
FACS	engl.: flouescence activated cell sorting
FCS	engl.: fetal calf serum
FiO ₂	Fraktion des inhalierten Sauerstoffs
FITS	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	engl.: forward scatter
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GM-CSF	engl.: granulocyte macrophage-colony stimulating factor
Gpt	10 ⁹ Zellen
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	engl. : human leukocyte antigen

HRP	engl.: horseradish peroxidase
HSP	engl.: heat shock protein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1-RA	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
IRAK	engl.: interleukin-1 receptor-associated kinase
ITS	Intensivstation
ITT	engl.: intention to treat
IU	engl.: international unit
JAK	Janus Kinase
kD	Kilodalton
l	Liter
L	Ligand
LBP	engl.: lipopolysaccharid- binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	engl.: lipoteichoic acid
MAC	engl.: membrane attack complex
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MAPK	engl.: mitogen-activated protein kinases
MARS	engl.: mixed antagonistic response syndrome
MCP	engl.: monocyte chemotactic protein
MDC	myeloide dendritische Zelle
MFI	engl.: mean fluorescence intensity
m	Milli
MHC	engl.: major histocompatibility complex
min	Minute
MIP	engl.: macrophage inflammatory protein
mmHg	Millimeter Quecksilber
MODS	engl.: multiple organ dysfunction syndrome
MOV	Multiorganversagen
MWU	Mann-Whitney-U
MyD88	engl.: myloid differentiation primary response gene 88
μ	Mikro

NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumbikarbonat
NF-KB	engl.: nuclear factor- kappa B
n	Nano
NK	engl.: natural killer
NO	Stickstoffmonoxid
ns	nicht signifikant
ODN	Oligodesoxynukleotid
Pa	Partialdruck
PAMP	engl.: pathogen associated molecular pattern
Pam3Cys	S-[2,3-Bis(palmitoxyloxy)-(2-RS)-popyl]-N-palmitoyl-(R)-cystein
PCT	Procalcitonin
PDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PIRO	engl.: predisposition insult response organ failure
PMT	Photomultiplikator
PP	engl.: per protocol
PRR	engl.: pattern recognition receptor
R	Rezeptor
rh	engl.: recombinant human
RNA	engl.: ribonucleic acid
ROS	engl.: reactive oxygen species
s	soluble
SAE	engl.: serious adverse event
SAPS	engl.: simplified acute physiology score
SGA	engl.: small for gestational age
SIRS	engl.: systemic inflammatory response syndrome
SOFA	engl.: sequential organ failure assessment
SSC	engl.: side scatter
STAT	engl.: signal transducer and activator of transcription
TGF	engl.: transforming growth factor

TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor
TLR	Toll-Like-Rezeptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNM	engl.: tumor nodes metastasis
TRAF	engl.: tumor necrose factor-receptor-associated factor
TSST	engl.: toxic shock syndrome toxin
V	Visite
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Trotz großer Fortschritte im pathophysiologischen Verständnis und der intensivmedizinischen Behandlung stellt die Sepsis immer noch eine Haupttodesursache in den Industrienationen dar.

In Nordamerika beträgt die jährliche Inzidenz der schweren Sepsis ca. 300/100.000 Einwohner und liegt damit höher als die von Darm- oder Brustkrebs. Aufgrund der quantitativen Zunahme operativer Eingriffe auch bei Risikopatienten, steigender Invasivität in der Intensivmedizin sowie demographischer Veränderungen im Sinne einer alternden Gesellschaft ist die Sepsis ein zunehmend häufigeres Phänomen im klinischen Alltag.¹⁻³ Die Mortalität ist in den USA der des akuten Myokardinfarkts vergleichbar (ca. 200.000 pro Jahr).⁴

Bei für Deutschland geltenden vergleichbaren epidemiologischen Daten ist die intensivmedizinische Behandlung septischer Krankheitsbilder ein wesentlicher Kostenfaktor im Gesundheitswesen. Zudem entstehen der Gesellschaft hohe indirekte Kosten durch Arbeitsausfall bei langer Krankenhausverweildauer.⁵ Angesichts der beträchtlichen klinischen und gesundheitsökonomischen Relevanz sind laut der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. septische Krankheitsbilder in medizinischen Fachgesellschaften unterrepräsentiert.⁶

Die 1992 von einer Konsensus-Konferenz festgelegte Definition der Sepsis und ihrer Schweregrade⁷ wurde 2001 von einer erneut einberufenen Expertenkommission bestätigt.⁸ Sepsis ist ein systemisches Entzündungssyndrom (SIRS – systemic inflammatory response syndrome) als Folge einer Infektion in Abwesenheit anderer potentieller Ursachen für die Symptome des SIRS. SIRS wird dabei wie folgt definiert:

1. SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*), mindestens zwei der folgenden vier typischen Symptome (möglichst für >24h):
 - Hyperthermie >38°C oder Hypothermie <36°C
 - Tachykardie mit Herzfrequenz >90 Schläge/Minute
 - Tachypnoe mit Atemfrequenz >20/Minute oder arterieller CO₂-Partialdruck [Pa(CO₂)] <32 mmHg
 - Leukozytose >12 Gpt/l oder Leukopenie <4 Gpt/l oder >10% unreife Vorläuferzellen („Linksverschiebung“ im Differentialblutbild).

Von einer *schweren Sepsis* spricht man bei Auftreten von Zeichen einer Sepsis-assoziierten Organdysfunktion. Die schwerste Form der Sepsis, der *septische Schock*, ist charakterisiert durch eine therapie-refraktäre Hypotonie trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution.

Diese Formen der Sepsis können im Verlauf der Erkrankung ineinander übergehen. Das

1 Einleitung

Eintreten eines „Multiple Organ Dysfunction Syndrome“ (MODS) mit Funktionseinschränkungen mehrerer Organsysteme (z. B. Lunge, Nieren, Leber) bis hin zum Multiorganversagen (MOV) ist trotz maximaler intensivmedizinischer Betreuung immer noch mit einer Letalität von ca. 50-60% verbunden, wobei vor allem Vorerkrankungen und zunehmendes Lebensalter prognostisch ungünstig sind.^{9,10}

1.1 Immunantwort

1.1.1 Angeborene und adaptive Immunantwort

Die normale Reaktion des Körpers auf eine Infektion ist die Induktion einer schützenden Entzündungsreaktion, deren Ziel die Bekämpfung und Eindämmung des eingedrungenen Pathogens sowie die Initiierung von Wundheilungs- und Regenerationsprozessen am Ort des infektiösen Geschehens ist.

Erste Abwehr durch Mastzellen, Gewebs-Makrophagen und Komplement-System

Protagonisten der lokalen Entzündung sind Zellen des angeborenen Immunsystems, Mastzellen und Gewebs-Makrophagen sowie das Komplement-System.

Die Aktivierung des Komplement-Systems erfolgt über den klassischen Weg durch IgG- und IgM enthaltende Immunkomplexe, über den so genannten Lectin-Weg durch Mannose-Reste auf Bakterien und über den alternativen Weg durch Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer Bakterien. Die drei Wege konvergieren zum einen in der Bildung von Anaphylatoxinen (Faktoren C3a und C5a) mit lokaler chemotaktischer und vasodilatierender Wirkung sowie andererseits in der Formierung des „membrane attack complex, MAC“ (Faktoren C5b bis 9); beides führt physiologischerweise zu einer lokalen Begrenzung der Entzündungsreaktion.¹¹

Die vor allem in Haut und Mucosa lokalisierten Mastzellen bilden einen Schutz gegen invadierende Erreger. Ihre Aktivierung erfolgt über so genannte „Pattern Recognition Rezeptoren“ (PRR) und Fc-ε-Rezeptoren. PRR sind evolutionär alte Moleküle, die hoch konservierte chemische Strukturen von Mikroorganismen erkennen, so genannte „Pathogen-Associated Molecular Patterns“ (PAMP). Zur Gruppe der PAMP zählt beispielsweise LPS. PAMPs finden sich nicht auf Zellen von Säugetieren und dienen so der Unterscheidung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“. Nach Aktivierung der PRR durch die erwähnten Strukturen respektive Quervernetzung der Fc-ε-Rezeptoren durch IgE kommt es über intrazelluläre Signalkaskaden zur Ausschüttung von Histamin, Proteasen und Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)- α .¹² In den vergangenen Jahren ist der „Selbst/Nichtselbst-Hypothese“ die „Danger-Theorie“ gegenübergestellt worden, die als grundlegend für die Initiierung einer Immunreaktion die

1 Einleitung

Alarmierung des Systems durch endogene Gefahr-Mediatoren wie mammale DNA/RNA-Moleküle oder Heat Shock Proteine (HSP) ansieht.¹³

Makrophagen sind residente Monozyten, die aus dem Blutstrom in die unterschiedlichen Gewebe eingewandert sind und dort als Zellen der lokalen Abwehr fungieren. Sie finden sich in großer Zahl im Bindegewebe, im Gastrointestinaltrakt, in der Lunge, der Leber und der Milz. Sie dienen der Zell-Homöostase durch Phagozytose alter und apoptotischer Zellen. Unter immunologischem Gesichtspunkt besteht ihre Aufgabe innerhalb der Gewebe in erster Linie in der Phagozytose von Mikroorganismen.¹⁴ Die Erkennung der Erreger erfolgt über Oberflächenrezeptoren der PRR-Klasse; z.B. über Toll-Like-Rezeptoren (TLR) wie den für die Erkennung von LPS verantwortlichen TLR-4.^{12,15}

Neben der Phagozytose kommt es zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und Chemokine wie IL-8 durch die Makrophagen. Diese und weitere Entzündungsmediatoren (z.B. Prostaglandine, Stickstoffmonoxid NO, Sauerstoffradikale) führen im Zusammenspiel mit dem von Mastzellen freigesetzten Histamin zu einer lokalen Vasodilatation, erhöhten Gefäßpermeabilität und Aktivierung der Gerinnungskaskade. Unter den pro-inflammatorischen Zytokinen ist vor allem TNF- α ein starker Endothel-Aktivator. Es kommt durch erhöhte endotheliale Expression von Adhäsionsmolekülen¹⁶ sowie Entstehung eines chemotaktischen Gradienten (IL-8) zur Diapedese von Leukozyten (zuerst Granulozyten, später auch Monozyten und Lymphozyten) in das Entzündungsgebiet. Neben einer Akkumulation findet gleichzeitig eine Aktivierung der rekrutierten Zellen statt.^{12,17,18}

Klinisch kommt es zu den bereits in der Antike von Celsus und Galen beschriebenen Kardinalzeichen der Entzündung: Rubor, Calor, Tumor, Dolor und Functio laesa.¹²

Durch diese Mechanismen der angeborenen (*innate*) Immunität gelingt eine lokale Begrenzung des Erregers. Gleichzeitig wird der internalisierte Erreger von Phagozyten (vor allem Dendritischen Zellen, DC) über die Lymphwege in die lokalen Lymphknoten transportiert, wo eine adaptive Immunantwort initiiert wird.

Antigen-präsentierende Zellen (APC)

Zellen, die in der Lage sind, durch Antigenpräsentation die adaptive Immunantwort zu aktivieren, nennt man Antigen-präsentierende Zellen (APC). Zur Gruppe der APC gehören Makrophagen, Monozyten, DC und B-Lymphozyten. Wichtiges Charakteristikum der APC ist neben der bei kernhaltigen Körperzellen konstitutiven Expression von Hauptgewebekompatibilitätskomplexen (*major histocompatibility complex*, MHC) der Klasse I ihre gleichzeitige Expression von MHC-II-Molekülen. Sie sind folglich fähig, CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen zu aktivieren.¹²

1 Einleitung

Tabelle 1: Ausgewählte Subpopulationen von Monozyten und dendritischen Zellen. Nach Poehlmann, 2009.¹⁹

Zell-Population	Oberflächenmarker	Eigenschaften
Klassische Monozyten	CD14 ⁺ CD16 ⁻	Mehrzahl der zirkulierenden Monozyten
Pro-inflammatorische Monozyten	CD14 ⁺ CD16 ⁺	Hohe Produktion pro-inflammatorischer Zytokine; erhöhte Zahl in Sepsis
PDC	Lineage ⁻ CD123 ⁺ HLA-DR ⁺	Hohe IFN α -Produktion nach Virus-Stimulation
MDC	Lineage ⁻ CD33 ⁺ HLA-DR ⁺	Hocheffektive Antigen-Präsentation und Produktion pro-inflammatorischer Zytokine

Neben ihren Hauptaufgaben, der Phagozytose und dem Abräumen toter Zellen, können aktivierte Makrophagen die bei endosomaler Lyse entstehenden Peptidfragmente über MHC der Klasse II (wie z.B. HLA-DR) den CD4⁺-T-Lymphozyten präsentieren. Auf diesem Wege werden naive Zellen (vorwiegend antigenspezifische T-Lymphozyten) aktiviert.

Innerhalb des Blutes findet sich neben der klassischen Population der über ihre hohe Expression von CD14⁺definierten Monozyten eine 1989 erstmals von Passlick et al. beschriebene Sub-Population CD14⁺CD16⁺-Monozyten, die unter normalen Bedingungen nur ca. 10% des gesamten Pools ausmachen, siehe Tabelle 1.^{19,20} Im Vergleich imponiert diese Untereinheit, auf Grund signifikant höherer Expression von HLA-DR, durch verbesserte Antigen-Präsentation und produziert nach TLR-Stimulation durch mikrobielle PAMPs deutlich größere Mengen pro-inflammatorischer Zytokine.^{21,22} Es konnte gezeigt werden, dass die Population „pro-inflammatorischer“ CD14⁺CD16⁺-Monozyten in der Sepsis zahlenmäßig zunimmt.²³

Die effektivsten APC sind DC, die mit der Aufnahme und Präsentation antigenen Materials eine Schlüsselposition in der Verbindung von angeborenem Immunsystem und adaptiver Immunität einnehmen. Nach Phagozytose von Antigenen am Infektionsort wandern naive DC in die lokalen Lymphorgane, wo sie T-Zellen hocheffektiv aktivieren. Als Teil des angeborenen Immunsystems werden DC selbst von chemischen Strukturen („danger“-Signale) der Pathogene via PRR aktiviert (z.B. durch Proteoglykane via Toll-Like-Rezeptor (TLR)-2 oder durch LPS via TLR-4).¹⁵

1 Einleitung

Innerhalb des DC-Vorläuferzell-Pools des peripheren Bluts unterscheidet man zwei phänotypisch und funktionell unterschiedliche Zellpopulationen: myeloide (MDC) und plasmazytoide (PDC) dendritische Zellen.²⁴ Während MDC eine Aktivierung durch LPS über TLR-4 erfahren und über ein pro-inflammatorisches Zytokin-Repertoire (TNF- α , IL-1 und IL-12) sowie die Möglichkeit hoch effizienter Antigen-Präsentation verfügen, erfolgt die Aktivierung der PDC durch DNA-Fragmente über den intrazellulären TLR-9 und mündet in der Sekretion von IFN- α im Sinne einer verstärkten anti-viralen Abwehr.^{15,24}

Die Aktivierung bzw. Reifung der APC geht mit einer Änderung von Phänotyp und Funktion einher. Co-stimulatorische Moleküle wie CD80/CD86 oder CD40 werden heraufreguliert, und sind gemeinsam mit dem auf MHC präsentierten Antigen unabdingbar zur Aktivierung der T-Zellen via Interaktion mit CD28 oder CD40-Ligand (CD40-L) und konsekutiven Initiierung einer adaptiven Immunantwort.²⁵ Ebenso werden bei Aktivierung MHC-Moleküle vermehrt exprimiert. Im Falle einer alleinigen Antigen-Präsentation über MHC (ohne gleichzeitige Co-Stimulation) wird bei der Antigen-spezifischen T-Zelle eine Anergie induziert.¹²

T-Lymphozyten

Nach erfolgreicher Aktivierung exprimieren T-Zellen eine Vielzahl spezifischer Oberflächenmolekülen, die für klonale Vermehrung und Differenzierung sorgen. Ein solches Molekül ist der CD40-Ligand, der an das auf APC exprimierte Oberflächenmolekül CD40 bindet. Diese Bindung führt einerseits zur Aktivierung der T-Zelle und provoziert andererseits auch eine weitere Heraufregulierung co-stimulatorischer Moleküle auf APC, was wiederum zu einer stärkeren T-Zell-Aktivierung führt. Wichtigstes Produkt der T-Zell-Aktivierung und Mediator der klonalen Expansion ist die Synthese und Sekretion von IL-2 sowie die Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors. Es kommt so zur autokrinen Stimulation und Vermehrung des initial aktivierten T-Zell-Klons.¹²

Die von den APC durch zwei simultane Signale aktivierten T-Zellen lassen sich in CD4⁺-T-Helfer- und CD8⁺-T-Effektorzellen unterteilen.

Naive CD8⁺-T-Zellen differenzieren sich nach Aktivierung zu CD8⁺-zytotoxischen Killerzellen. Diese sind in der Abwehr intrazellulärer Pathogene, z.B. Viren und Pilze, sowie in der Tumorabwehr durch Lyse der Zielzelle von Bedeutung.¹²

Klassischerweise unterscheidet man nach Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen zwei Differenzierungslinien, die sogenannten Th1- und Th2-Zellen. Beide Linien verfügen über ein unterschiedliches Zytokin-Repertoire und unterscheiden sich grundlegend in ihrer Funktion.

1 Einleitung

Zwar üben auch Th1-Zellen einen gewissen Einfluss auf das humorale, B-lymphozytäre System aus (Klassen-Switch von IgG2 und IgG3); dennoch steht aber der überwiegend zellulären Antwort mit Makrophagen-Aktivierung (Th1-Antwort) die Induktion einer humoralen Immunantwort mit vorwiegender B-Zell-Aktivierung (Th2-Antwort) gegenüber. Das zum Zeitpunkt der Aktivierung nach Art des eingedrungenen Erregers differente vorherrschende Zytokin-Milieu sowie die Menge des präsentierten Antigens sind maßgeblich für die Polarisierung der CD4⁺-Zelle.²⁶ So regen intrazelluläre Bakterien und Viren vor allem Antigen-präsentierende Zellen, insbesondere DC zur Produktion von IFN- γ und IL-12 an; diese ihrerseits sorgen dafür, dass sich proliferierende T-Zellen zu Th1-Zellen entwickeln. Th1-Zellen wiederum produzieren bevorzugt IFN- γ , so dass eine Amplifizierung des eingeschlagenen Weges erfolgt. Aus funktioneller Hinsicht führt IFN- γ zu einer Aktivierung der Phagozytose und des intrazellulären „killings“ phagozytierter Mikroorganismen durch oxidativen „burst“ in neutrophilen Granulozyten. Durch in den Th1-Zellen simultan erfolgende Produktion von TNF- α und Granulozyten Monozyten-Kolonie Stimulierender Faktor (GM-CSF) ergibt sich ein aktivierender Effekt auf die Expression von MHC-I- und MHC-II-Molekülen und, durch erhöhte Antigen-Präsentation und TNF- α -Produktion, eine Verstärkung der pro-inflammatorischen Potenz des Monozyten-Makrophagen-Systems.

Andere Mikroorganismen (wie extrazelluläre Bakterien oder Parasiten) regen NKT-Zellen zur Produktion von IFN- γ , IL-4 und IL-10 an. Durch diesen Stimulus proliferieren vor allem Th2-Zellen, die in großen Mengen IL-4, IL-5 und IL-10 produzieren. IL-4 und IL-5 sind wichtige Zytokine zur Aktivierung, Proliferation und Differenzierung von B-Zellen im Rahmen der Generierung einer durch Antikörper vermittelten humoralen Immunantwort.

Zusätzlich zur Verstärkung der eigenen Subpopulation ergibt sich jeweils durch die sezernierten Zytokine eine starke Hemmung der anderen Untergruppe, so hemmt IFN- γ suffizient Th2-Zellen, IL-10 hingegen Zellen des Th1-Weges; das System reguliert sich wechselseitig.^{12,27,28}

Kontrolle der Entzündungsantwort

Wie die meisten biologischen Systeme unterliegt auch die Entzündungsreaktion regulatorischen Mechanismen, die eine überschießende Reaktion und dadurch eine Gefährdung des Organismus verhindern sollen. Lokal spielen hierbei autokrine und parakrine Faktoren eine Rolle. Ein wichtiger Regulationsfaktor ist der pro-inflammatorische Protagonist TNF- α selbst. Nach der Produktion durch Makrophagen/Monozyten bewirkt TNF- α in der selben Zelle die eigene Abschaltung durch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10.^{29,30} Weiterhin wirken die Phagozytose apoptotischer Zellen und entstandener Immunkomplexe hemmend auf die

Produktion pro-inflammatorischer Zytokine.

1.1.2 Systemische Immunantwort und Sepsis

Eine systemische Entzündungsreaktion des Körpers, SIRS (*systemic inflammatory response syndrome*), ist ein auf Intensivstationen (ITS) häufig zu beobachtendes Phänomen. SIRS kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Dazu zählen neben lokal nicht zu beherrschenden Infektionen auch nicht-infektiöse Ursachen wie schwere Traumata, Operationen, Strahlen- und Verbrennungsschäden, die sterile Pankreatitis oder extrakorporale Verfahren wie die Herzlungenmaschine. Unabhängig vom Typ des Primärstimulus erfolgt im Rahmen der angeborenen Immunität die Auslösung einer Entzündungskaskade als gemeinsame Endstrecke.⁸ Erfolgt durch die lokale Immunantwort keine ausreichende Bekämpfung und Eindämmung des Erregers, führt eine persistierende Infektion zur fortlaufenden Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6. Diese induzieren bei systemisch wirksamen Konzentrationen eine systemische Entzündungsantwort: in der Leber die Produktion von Akute-Phase-Proteinen (z.B. C-reaktives Protein (CRP), Fibrinogen, *LPS-binding protein* (LBP)); im ZNS eine veränderte Thermoregulation (Fieber) und die Induktion einer neuroendokrinen Stressreaktion; im Knochenmark die schnellere Ausreifung und Ausschüttung unspezifischer Abwehrzellen (Granulozyten und Monozyten mit Linksverschiebung im Differentialblutbild); aus dem Fett-, Leber- und Muskelgewebe durch eine katabole Stoffwechsellage eine erhöhte Bereitstellung von Energielieferanten. Andererseits ist die Eskalation der an sich sinnvollen Abwehrreaktion SIRS zur schweren Sepsis mit (multiplem) Organversagen oder zum septischen Schock mit lebensbedrohlichem Herz-Kreislauf-Versagen möglich.^{18,31}

Die für die lokale Entzündungsreaktion beschriebenen Reaktionen treten unter septischen Bedingungen im gesamten Organismus auf. Komplementsystem, Mastzellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten werden systemisch aktiviert, der Organismus gerät in einen hyperinflammatorischen Zustand. Die hohen pro-inflammatorischen Zytokin-Spiegel führen zu generalisierter Vasodilatation durch Wirkung auf den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur (z.B. Eikosanoide und NO), zur Steigerung der Gefäßpermeabilität (z.B. Histamin) und Aktivierung des Gerinnungssystems. In der Folge kommt es durch Verbrauchskoagulopathie, Volumenmangel und Schock bis zum Multiorganversagen.³¹

1.1.3 Immunpathogenese der Sepsis

In den 80-er Jahren wurden mittels tierexperimenteller Arbeiten pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α als Protagonisten des septischen Geschehens identifiziert. Durch Bolusinjektionen

1 Einleitung

großer Mengen an Bakterien oder Endotoxin wie auch durch intravenöse oder intraperitoneale Injektion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β ließen sich die Symptome eines septischen Schocks auslösen. Gleichzeitig war es möglich, durch Gabe neutralisierender anti-TNF- α -Antikörper, diese Symptome zu verhindern.^{32,33}

Die molekularen Zusammenhänge der beschriebenen Phänomene konnten weiter zum Verständnis der Pathophysiologie beitragen. So wurde gezeigt, dass Makrophagen/Monozyten durch bakterielle Strukturen PAMPs wie das Endotoxin/Lipopolysaccharid (LPS) der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien^{34,35} und Peptidoglykan oder Lipoteichonsäure (LTA) als Bestandteile der Wand Gram-positiver Bakterien³⁶ über Toll-Like-Rezeptoren (TLR) aktiviert werden und pro-inflammatorisch reagieren. Eine weitere Rolle in der Aktivierung von Immunzellen spielen außerdem Exotoxine Gram-positiver Bakterien, wie das *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1), das als funktionelles Superantigen über die unspezifische Bindung und Vernetzung von MHC II- Molekülen und der V β - Domäne des T-Zell-Rezeptors zu einer massiven T-Zell-Aktivierung und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN- γ führt.³⁷

Am besten untersucht ist diese Wirt-Pathogen-Interaktion für die durch Endotoxin (LPS) Gram-negativer Bakterien induzierte Sepsis. Freies LPS wird im Organismus an das im Rahmen der akuten Phase in der Leber gebildete *LPS-binding protein* (LBP) gebunden und dockt als LPS-LBP-Komplex an den monozytären Membranrezeptor CD14.³⁸ Da CD14 keine intrazelluläre Domäne aufweist, war der Mechanismus der eigentlichen Aktivierung der Zelle über die Signalkaskade lange unklar; siehe Abb. 1.

1 Einleitung

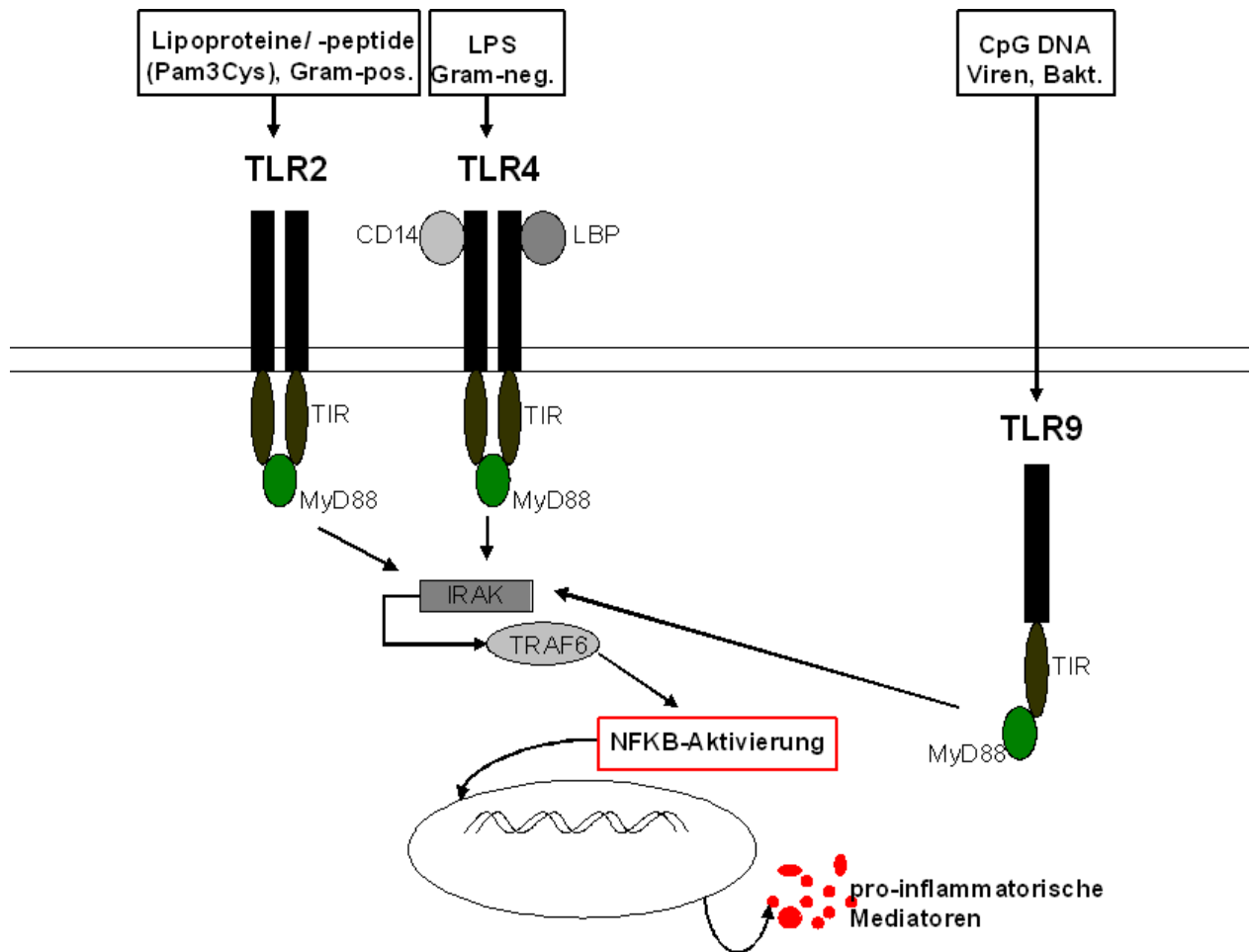


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung einiger Toll-like Rezeptoren (TLR) sowie ausgewählter Liganden und Signalkaskaden. Nach Stimulation durch den jeweiligen Liganden wird das intrazelluläre „signalling“ durch Bindung der intrazellulären Domäne des TLR, die Toll/IL-1 Rezeptor homologe Domäne (TIR), an eine IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) initiiert. Dieser Prozess wird durch das myeloide Differenzierungs-Protein MyD88 beschleunigt. Im Folgenden wird neben weiteren Zwischenschritten NF-KB über den TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) aktiviert. Die Translokation von NF-KB in den Zellkern ermöglicht die Transkription der Gene pro-inflammatorischer Zytokine. Nach: van der Poll, 2001, Cohen, 2002 und Leaver, 2007.^{35,39,40}

Die Identifizierung des an CD14 assoziierten Toll-Like-Rezeptors (TLR)-4 als transmembranären Signaltransduktionsrezeptor erlaubte es, den intrazellulären Signalweg bis hin zur Aktivierung von Nuclear Factor-Kappa B (NF-KB) nachzuvollziehen.⁴¹ Durch die Aktivierung von NF-KB wird die Expression und Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 gesteigert; siehe Abb. 1.

Andere Vertreter der Toll-Familie dienen der Erkennung weiterer PAMPs; so werden beispielsweise Strukturen der Zellwand Gram-positiver Bakterien über TLR-2⁴² und mikrobielle DNA-Fragmente über den intrazellulär lokalisierten TLR-9 erkannt;⁴³ siehe Tabelle 2.

Durch die beschriebenen Mechanismen kommt es zur Initiierung der angeborenen Immunantwort als Voraussetzung für die Aktivierung adaptiver Immunität.

1 Einleitung

Tabelle 2: Expressionsrepertoire ausgewählter Toll-Like-Rezeptoren (TLR) und deren Liganden auf Antigen-präsentierenden Zellen. Nach Iwasaki, 2004 und Leaver, 2007.^{15,40}

	Expression auf			Liganden	
	Monozyten	MDC	PDC	Mikrobiell	Synthetisch
TLR-2	++	++	-	Lipopeptide (Gram-positiv) Lipoteichonsäure (LTA)	Pam3Cys
TLR-4	++	+/-	-	Endotoxin (LPS) (Gram-negativ)	Taxol
TLR-9	-	-	++	CpG-reiche DNA (Bakterien/Viren)	CpG-ODN

In weiteren Versuchen wurde erkannt, dass Mäuse mit Defizienzen des TNF-Rezeptors⁴⁴ oder Mutationen von TLR-4⁴⁵ zwar relativ resistent sind gegenüber der Endotoxin-Toxizität, jedoch sind sie unfähig, eine Infektion mit lebenden Bakterien zu kontrollieren.

Gleichzeitig konnte in klinischen Untersuchungen gezeigt werden, dass Patienten mit septischem Multiorganversagen häufig nur geringe oder nicht detektierbare Mengen an TNF α und anderen Entzündungsmediatoren im Plasma haben.⁴⁶

1.1.4 Systemische Antiinflammation

Wie bereits für die lokale Entzündungsreaktion beschrieben, spielen regulatorische Mechanismen in ähnlicher Weise auch bei der homöostatischen Kontrolle der systemischen Inflammation eine Rolle. Der systemischen Antiinflammation (*compensatory anti-inflammatory response syndrome; CARS*) wird eine physiologische Rolle in der Begrenzung pro-inflammatorischer Zustände zugeschrieben. Mediatoren sind hierbei anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10, löslicher TNF- α -Rezeptor (sTNF- α -R), IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1-RA), Transforming Growth Factor (TGF)- β und IL-4.

Weiterhin ist ein differenziertes Zusammenspiel von Immunsystem und Nervensystem von großer Bedeutung. Sensorische parasymphatische Neurone detektieren erhöhte Spiegel pro-inflammatorischer Zytokine im entzündeten Gewebe und vermitteln nach Stimulation immunmodulatorischer Zentren des Hypothalamus eine Aktivierung der Hypothalamus-

1 Einleitung

Hypophysen-Nebennieren-Achse, des sympathischen Nervensystems und des afferenten Schenkel des Nervus Vagus. Hierdurch kommt es zu Freisetzung von Stressmediatoren wie Glukokortikoiden, Katecholaminen und Acetylcholin, die zu einer Hemmung pro-inflammatorischer Aktivität direkt und indirekt über erhöhtes IL-10 führen.^{35,47-50}

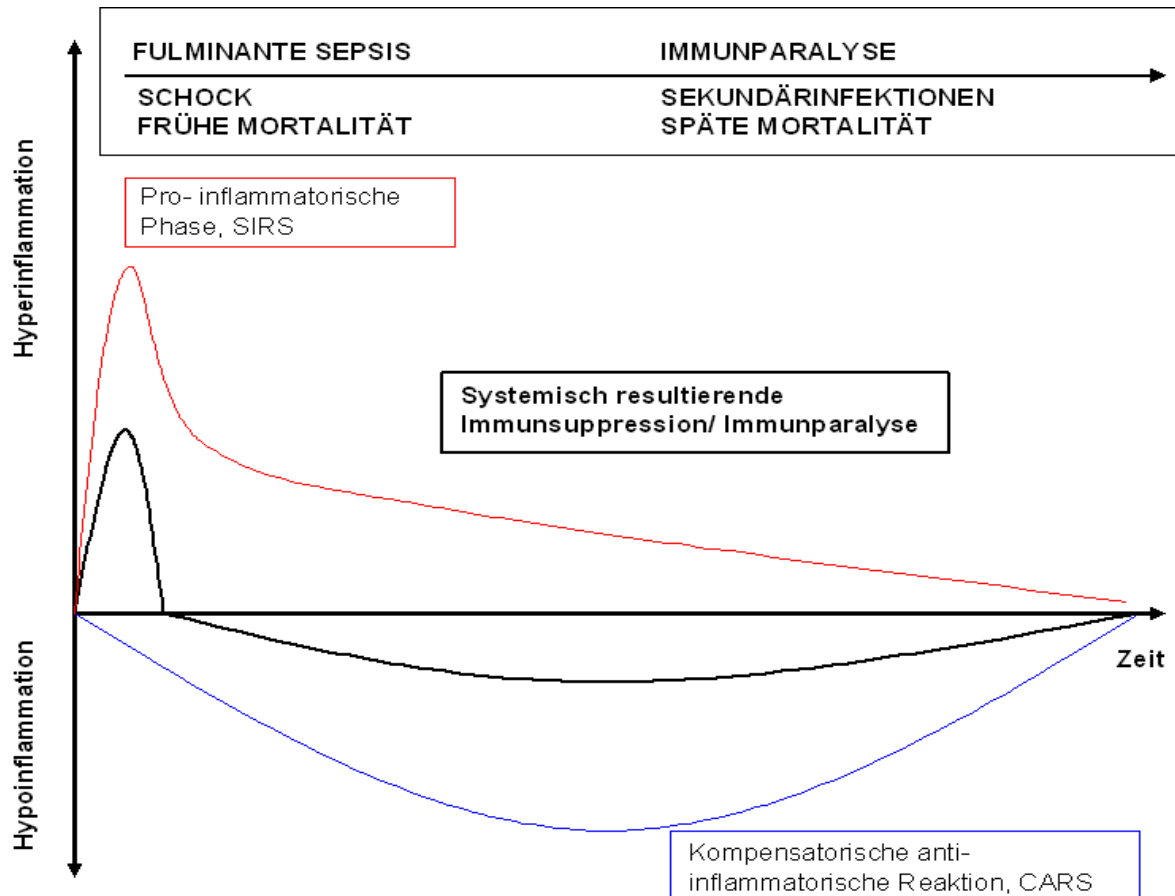


Abbildung 2: Immunologische Phasen der Sepsis: im zeitlichen Verlauf einer Sepsis unterscheidet man die frühe Phase einer systemischen Immunaktivierung (SIRS) mit Dominanz pro-inflammatorischer Mediatoren von einer späteren Phase der kompensatorischen Dämpfung der Immunreaktion (CARS). Nach: van der Poll, 2001 und Monneret, 2008.^{39,51}

Nach heutigem Verständnis ist die Immunantwort des Organismus demnach ein komplexes Geschehen biphasischen Charakters, wobei einer frühen inflammatorischen Phase (SIRS) eine späte anti-inflammatorische Komponente (CARS) folgt; hierbei sind auch zeitliche Überlappungen möglich mit einem gleichzeitigen Nebeneinander beider Phänomene. Kommt es im Zeitverlauf zum Überwiegen des CARS mit einem anti-inflammatorischen „Nettoeffekt“, kann eine Hypoinflammation, mit der verminderten Fähigkeit des Immunsystems gegen Infektionen wirkungsvoll anzugehen, die Folge sein, siehe Abb. 2.

Für das in der klinischen Praxis häufig anzutreffende Phänomen des Nebeneinander von Inflammation und Antiinflammation prägte Bone den Ausdruck des „mixed antagonistic

response syndrome“ (MARS).⁴⁷

1.1.5 Immunstatus mit Immunparalyse und immunmodulatorische Therapieansätze in der Sepsis

Wie vorangehend erläutert, werden die komplexen pathophysiologischen Zusammenhänge in der Sepsis durch ein biphasisches Modell erklärt. Einer initialen Phase der Hyperinflammation (SIRS) als Reaktion auf infektiöse Invasion, mit der Gefahr des Organversagens bis hin zum Tode, folgt im Falle des Überlebens innerhalb der sogenannten „Spät“phase bereits nach Stunden oder wenigen Tagen ein Status der kompensatorischen Immundeaktivierung (CARS). Nach heutigem Wissensstand scheinen Pro- und Antiinflammation schon sehr früh im Krankheitsprozess nebeneinander abzulaufen, wie Untersuchungen des leukozytären Transkriptoms zeigen.⁵² Bei Persistenz der (erworbenen) Immundepression besteht ein hohes Risiko für infektiöse Sekundärkomplikationen.^{8,31,35,39,47,49}

Dank der Implementierung frühzeitiger intensivmedizinischer Maßnahmen konnte die Mortalität der frühen Sepsis in den vergangenen Jahren gesenkt werden; das Problem der Spätmortalität der schweren Sepsis ist, trotz intensiver supportiver Therapien, bislang ungelöst.^{35,53–55} Auch adjunktive Therapiestrategien wie der Einsatz niedrig-dosierten Hydrocortisons bei (relativer) Nebenniereninsuffizienz,^{56,57} die konventionelle bzw. intensivierete Insulintherapie^{58–60} konnten bisher zu keiner nennenswerten Verbesserung führen. Nach initialer Zulassung des rekombinierten aktivierten Proteins C im Jahr 2001 für die Behandlung eines Hochrisiko-Patientenkollektivs der schweren Sepsis^{53,61} zeigte eine spätere Meta-Analyse der Cochrane-Datenbank mangelnde Wirksamkeit und erhöhtes Blutungsrisiko bei Gabe des Medikaments;⁶² hierauf wurde das Medikament im Jahr 2011 vom Markt zurückgezogen.

Unbefriedigende Ergebnisse bisheriger Therapiestrategien sowie Fortschritte im Verständnis der Immunpathogenese der schweren Sepsis waren seit Mitte der 1980er Jahre ausschlaggebend für erste immunmodulatorische klinische Studien im Rahmen des Spektrums der Sepsis-Therapie. Auf Grundlage des pathophysiologischen Verständnisses der Sepsis als einer überschießenden Aktivierung der Immunantwort und der im Tierversuch beobachteten Reduzierung der Mortalität^{32,33} wurden seit Mitte der 80-er Jahre eine Vielzahl klinischer Studien mit anti-inflammatorischer Ausrichtung durchgeführt; Substanzen wie anti-Endotoxin-Antikörper,⁶³ anti-TNF- α -Antikörper,^{64–66} anti-IL1-Antikörper^{67,68} und Hochdosis-Kortikoide⁶⁹ brachten jedoch nicht den erhofften Erfolg für eine Verbesserung der Gesamtmortalität. Es zeigte sich, dass das pathophysiologische Konzept einer reinen Hyperinflammation eine zu vereinfachte Sichtweise war und, dass die Tiermodelle mit Bolusinjektionen von Bakterien oder Endotoxin den

1 Einleitung

komplexen Vorgang der Sepsis nur ungenügend abbildeten.

Auf der Suche nach Erklärungen konnten Tiermodelle wie die durch Ligation und Punktion des Zäkums induzierte peritonitische Sepsis entwickelt werden, die ähnlich wie in den vorangegangenen klinischen Studien eine erhöhte Mortalität bei anti-inflammatorischen Therapie-Ansätzen zeigten.⁷⁰⁻⁷² Die kritische Interpretation der erzielten Ergebnisse machte zunehmend den biphasischen Charakter des septischen Prozesses deutlich. Die in der frühen Phase der Hyperinflammation im Tierexperiment günstig wirkenden anti-inflammatorischen Therapiekonzepte wurden zunehmend als kontraproduktiv im Szenario der Hypoinflammation und immunologischen Defizienz in der sich rasch einstellenden Spätphase des septischen Patienten erkannt.^{39,47,54,73}

Zu den die zelluläre Immunität betreffenden Veränderungen im Rahmen der Spätphase des septischen Geschehens existieren umfangreiche Untersuchungen insbesondere auf dem Gebiet der monozytären Funktion. Sowohl das *in vitro*-Modell der LPS-Desensibilisierung^{74,75} als auch *in vivo*-Untersuchungen bilden die während der Sepsis stattfindenden phänotypischen und funktionellen Veränderungen in Monozyten ab. Charakteristisch sind die Herunterregulierung der Expression von HLA-DR^{76,77} mit konsekutiv verminderter Phagozytose und Antigen-Präsentation. Weiterhin zeigen Monozyten eine verminderte Fähigkeit zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6 und IL-12, wobei die Kapazität zur Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 oder IL-1-RA deutlich weniger kompromittiert ist.⁷⁸⁻⁸¹ Diese Phänomene sind einerseits auf lokale auto- und parakrine Rückkopplungsmechanismen wie IL-10 und PGE₂, andererseits auf systemische Kontrollmechanismen durch Stressmediatoren zurückzuführen.

Im Zusammenhang mit diesem Wechsel von einem pro- in ein anti-inflammatorisches Aktionsmuster als Antwort auf einen sekundären bakteriellen Stimulus spricht man von einer Umprogrammierung der Monozyten, um den Effekt der funktionellen Deaktivierung zu verdeutlichen.^{14,29,48,74,82}

In der klinischen Diagnostik wird die Messung der monozytären HLA-DR-Expression als Surrogatparameter der monozytären Zytokin-Produktion und Fähigkeit zur Antigen-Präsentation genutzt.^{51,77,83}

Darüber hinausgehend konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass eine andauernde Verminderung der monozytären HLA-DR-Expression im Sinne einer Persistenz der kompromittierten Immunfunktion mit einer Prognose-Verschlechterung in der schweren Sepsis korreliert ist.^{51,77,83}

1 Einleitung

Neben der Deaktivierung monozytärer Zellen ist der globale Immundefekt der Spätphase der Sepsis durch einen deutlichen Effekt auf das lymphozytäre System gekennzeichnet. So findet sich eine durch Apoptose-Induktion verursachte Lymphopenie sowohl in lymphatischen Organen wie Lymphknoten und Milz als auch im peripheren Blut.⁸⁴ Weiterhin lässt sich eine Selektivität der Apoptose für Effektorzellen mit Abnahme der Zahlen von CD4⁺- und B-Zellen im peripheren Blut feststellen. Die Frequenz CD4⁺CD25⁺-regulatorischer Zellen hingegen zeigt sich stabil, in manchen Untersuchungen wird eine Erhöhung beobachtet.⁸⁴⁻⁸⁷ Neben den Effekten auf die Zellzahl verschiedener Lymphozyten-Populationen ist die Sepsis zudem durch eine Th1/Th2-Dysbalance charakterisiert mit Vorherrschen der Produktion anti- inflammatorischer Zytokine wie IL-4 und IL-10.⁸⁸ Von besonderem Interesse ist, dass Ausmaß der Lymphopenie⁸⁹ und Th1/Th2-Dysbalance^{26,88} prognostisch mit erhöhtem Risiko für infektiöse Sekundärkomplikationen und Outcome korreliert sind.

Zusammenfassend gründet die Lymphopenie und gestörte T-Zell-Funktion sowohl auf direkter Schädigung durch Mediatoren als auch auf indirekten Einflüssen durch verminderte T-Zell-Stimulation aufgrund kompromittierter APC-Funktion.⁸⁸

Dendritische Zellen (DC) als essentielle Vertreter Antigen-präsentierender Zellen (APC) an der Schnittstelle von angeborener und adaptiver Immunität unterliegen in der Sepsis ebenso einer erhöhten Apoptoserate und Dysfunktion ihrer Fähigkeit zur effektiven T-Zell-Aktivierung.⁹⁰ Guisset et al. fanden eine inverse Korrelation zwischen DC-Frequenz im peripheren Blut septischer Patienten mit klinischem Verlauf und Überleben.⁹¹ In eine ähnliche Richtung weisen post-mortem-Untersuchungen von Hotchkiss et al., die eine deutliche Verminderung der Zahl von DC in der Milz septischer Patienten fanden.⁹²

Auf die Identifizierung des septischen Geschehens als in der Spätphase dominierend hypo-inflammatorischen Prozess mit zur globalen Immunparalyse führenden Defekten der zellulären Immunität folgten in unserer Arbeitsgruppe *in vitro*-Arbeiten von Randow et al. und Schröder et al. als auch tierexperimentelle Untersuchungen durch Bundschuh et al.⁹³⁻⁹⁵ Diese Arbeiten zeigen die funktionelle Revertierung der Monozytenfunktion durch IFN- γ und GM-CSF, wodurch sich die Möglichkeit der Stimulation des Immunsystems als therapeutische Option ergibt.

Bereits 1997 konnten Döcke et al. erstmals das Prinzip der Immunstimulation in der Sepsis durch Rekonstitution der monozytären Funktion innerhalb einer Pilotstudie mit neun immunparalytischen Patienten durch IFN- γ -Therapie vorstellen.⁸³ 2003 gelang in Hamburg durch Nierhaus et al. im Rahmen einer "open-label"-Pilotstudie mit begrenzter Patientenzahl in der

Sepsis adulter Patienten durch GM-CSF ein vergleichbarer Nachweis der Immunrestitution, gemessen als Wiederherstellung der monozytären HLA-DR-Expression.⁹⁶

Unabdingbare Voraussetzung für den Erfolg immunstimulatorischer Interventionsstudien ist die systematische Erhebung des Immunstatus, um eine individualisierte Immuntherapie garantieren zu können;⁵¹ hierbei konnte die monozytäre HLA-DR-Expression als Surrogatparameter des monozytären Aktivierungsstandes und als Gradmesser der Immunparalyse im Rahmen einer Multicenter-Studie etabliert werden.⁷⁶

1.2 Granulozyten Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF)

GM-CSF ist ein von Monozyten/Makrophagen, T-Lymphozyten, Fibroblasten sowie einer Vielzahl von Stromazellen produziertes endogenes 23-kD Glykoprotein.⁹⁷ Der aus zwei Untereinheiten bestehende GM-CSF-Rezeptor wird vor allem auf Zellen der myeloiden Reihe, wie Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie auf CD34⁺-Progenitor-Zellreihen exprimiert. Unter normalen Bedingungen ist GM-CSF im Serum nur in außerordentlich geringen Mengen zu finden.⁹⁸

Ursprünglich wurde GM-CSF als Wachstumsfaktor über seine Fähigkeit definiert, Zellen der myeloiden Reihe wie Granulozyten und Monozyten über Apoptose-inhibierende Mechanismen zu Wachstum und Differenzierung anzuregen.⁹⁹ Zudem ist GM-CSF essentiell für die *in vitro*-Entstehung dendritischer Zellen (DC) aus Knochenmark-Vorläuferzellen. Aus Monozyten können *in vitro* Makrophagen entstehen; ebenso ist durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 die *in vitro*-Kultivierung Antigen-präsentierender DC möglich.^{98,100}

Heute ist bekannt, dass GM-CSF neben seinen Proliferations-induzierenden Eigenschaften ebenso myeloide Effektorzellen auf funktioneller Ebene maßgeblich beeinflusst und somit eine wichtige Rolle in der Regulation der Entzündungsantwort spielt. Zusammen mit anderen Zytokinen führt GM-CSF einerseits zu einer direkten Aktivierung von Effektorzellen, andererseits kommt es in der Folge indirekt über eine gesteigerte Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren zu einer Amplifizierung des Prozesses.⁹⁷

Die funktionelle Aktivierung beinhaltet eine Erhöhung der Produktion reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) und Verbesserung der Phagozytose und des intrazellulären Killings durch neutrophile Granulozyten und Monozyten, eine Hochregulation von Adhäsionsmolekülen auf Monozyten, eine gesteigerte Produktion pro-inflammatorischer Moleküle durch Monozyten sowie eine verbesserte Antigen-Präsentation durch vermehrte MHC-Klasse II-Expression.^{97,98}

Im Endotoxin-Toleranz-Modell der Immunparalyse konnte durch GM-CSF-Gabe sowohl *in*

1 Einleitung

vitro^{93,94} als auch im Tiermodell⁹⁵ die Erholung der monozytären TNF- α -Produktions-Kapazität in zuvor inaktivierten Monozyten gezeigt werden.

In klinischer Anwendung führt GM-CSF aufgrund seiner proliferativen Eigenschaften primär zu erhöhten Zahlen von Neutrophilen, Monozyten und in geringerem Ausmaß auch von Eosinophilen, Lymphozyten sowie Thrombozyten. GM-CSF wird eingesetzt in der Erholung von Chemotherapie-induzierten Neutropenien, zum Wiedererstarken der Hämatopoese nach Knochenmarktransplantation, zur Behandlung invasiver Pilzinfektionen sowie als Adjuvans bei Anti-Tumor-Vakzinen.⁹⁸

Basierend auf den Erkenntnissen der möglichen Revertierung eines immunparalytischen Zustandes im Endotoxin-Toleranz-Modell durch GM-CSF wurden erste klinische Pilotstudien bei Sepsispatienten im „open-label-Design“ durchgeführt. Hierbei konnte eine ausreichende Sicherheit der Substanz gezeigt werden.^{96,101,102} Weitergehend war es möglich, die *in vitro*- und im Tiermodell beobachteten Ergebnisse der leukozytären Reaktivierung im humanen System zu bestätigen. So zeigte sich eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD11b auf zirkulierenden Neutrophilen und Monozyten¹⁰³ sowie eine deutliche Erholung der Expression von HLA-DR-Molekülen auf Monozyten. Damit einher ging eine Wiederherstellung der Produktion von TNF- α , als Parameter einer Rekonstitution der Monozyten-Funktion.^{96,104} Im Hinblick auf die Mortalität in der Sepsis-Theapie neutropener Neonaten existieren widersprüchliche Berichte; während Bilgin et al. einen positiven Effekt auf die Mortalität bei Neonaten feststellten,¹⁰⁵ konnten in neueren Untersuchungen Carr et al. lediglich eine schnellere Überwindung der Neutropenie konstatieren, während sich ein günstiger Effekt auf den klinischen Verlauf in Form von Erholung aus der Sepsis oder verbessertem Überleben bei Sepsis in *small for gestational age* (SGA)-Neonaten nicht beobachten ließ.¹⁰⁶

Mögliche Nebenwirkungen unter der Therapie mit GM-CSF sind vorwiegend auf eine Rekonstitution der Immunfunktion zurückzuführen und äußern sich durch Grippe-ähnliche Beschwerden mit Fieber, Übelkeit, Müdigkeit, Knochen- und Kopfschmerzen sowie Myalgien. Zudem wurden vereinzelt unspezifische Reaktionen wie Thoraxschmerzen, Dyspnoe, Stomatitis, Hautjucken, Schwindel, periphere Ödeme und Parästhesien beschrieben.

Als seltene schwere Nebenwirkungen (SAE) gelten Anaphylaxie, Herzinsuffizienz, Capillary-Leak-Syndrom, Stevens-Johnson-Syndrom, Perikard- und Pleuraerguss, Lungenödem und Synkope.⁹⁸

2 Problemstellung

Trotz intensiver Therapie und intensiven Ressourceneinsatzes besteht weiterhin eine schlechte Prognose für den septischen Patienten. Die Mortalität liegt für die schwere Sepsis bei 20-40%, für den septischen Schock je nach Untersuchung gar bei 40-80%.^{2-4,55}

Die Diskrepanz zwischen der beträchtlichen epidemiologischen und sozioökonomischen Bedeutung der schweren Sepsis einerseits und der bisher trotz erheblicher Anstrengungen weitgehend unbefriedigenden therapeutischen Möglichkeiten motiviert für Studien mit neuen methodischen Ansätzen.⁵³

Entscheidend ist in diesem Zusammenhang die Identifizierung des pathophysiologischen Geschehens der Sepsis als ein in seiner Spätphase dominierend hypoinflammatorischer Prozess mit den als Immunparalyse charakterisierten globalen Defekten der zellulären Immunität.

Nachdem Voruntersuchungen die Möglichkeit der funktionellen Revertierung einer experimentell induzierten Immunparalyse *in vitro*^{93,94} und im Tierversuch⁹⁵ durch IFN- γ und GM-CSF gezeigt hatten, wurde mit der Durchführung erster klinischer Studien mit immunstimulatorischem Ansatz begonnen. So konnten Döcke et al. 1997 in einer Pilotstudie erstmals das Prinzip der Immunstimulation durch Rekonstitution der monozytären Funktion durch IFN- γ -Therapie in der Sepsis vorstellen.⁸³ 2003 gelang durch Nierhaus et al. in einer "open-label"-Pilotstudie mit begrenzter Patientenzahl ein vergleichbarer Nachweis der Immunrekonstitution in der Sepsis adulter Patienten durch GM-CSF;⁹⁶ siehe Kapitel 1.1.5.

Das simultane Monitoring des Funktionszustandes des Immunsystems ist eine unabdingbare Voraussetzung für den Erfolg immunstimulatorischer Interventionsstudien, da es sich bei der Sepsis um einen hoch dynamischen Prozess handelt. Nur durch die sichere Identifizierung eines defizienten Immunstatus können Patienten sinnvoll für eine immunstimulatorische Therapie rekrutiert werden.^{51,107} Andernfalls kann eine Immun(über)stimulation während der Frühphase der Hyperinflammation des septischen Prozesses drohen mit konsekutivem Zytokin-Sturm, Multiorganversagen und Schock. In der vorliegenden Arbeit konnte dies durch den etablierten Surrogatparameter der monozytären HLA-DR-Expression erreicht werden.⁷⁶

In einer Immunmonitoring-basierten, prospektiven, randomisierten, doppelblind Placebo-kontrollierten klinischen *proof of concept*-Phase IIa-Studie bei 38 Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock wurde mittels eines immunstimulatorischen Ansatzes der Effekt einer GM-CSF-Therapie auf folgende Parameter untersucht:

2 Problemstellung

- (1) Monozytäre HLA-DR-Expression als Maß für die Immunkompetenz von Monozyten
- (2) Funktionelle monozytäre Immunkompetenz
 - a. Bestimmung anhand der LPS-induzierten *ex vivo*-TNF- α -Produktion sowie der Produktion anderer pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach TLR-Stimulation
 - b. Durchflusszytometrische Untersuchung quantitativer Veränderungen verschiedener monozytärer Subpopulationen und des Expressionsmusters co-stimulatorischer Oberflächenmoleküle
- (3) Frequenz und Funktion dendritischer Zellen (DC) als Repräsentanten typischer Antigen-präsentierender Zellen (APC)
 - a. Messung anhand durchflusszytometrischer Untersuchungen und TLR-Stimulationsassays
- (4) Klinischer Verlauf
 - a. Beurteilung anhand gebräuchlicher intensivmedizinische Scores (APACHE II, SAPS II, SOFA)
 - b. Beurteilung anhand Ventilationsparametern und Effekt auf die 28 Tage-Mortalität

Innerhalb der Studie wurden auch Untersuchungen zur Frequenz und Funktion von T-Lymphozyten als Teil des adaptiven Immunsystems durchgeführt. Diese Aspekte sind Bestandteil einer anderen Dissertation und werden in der vorliegenden Arbeit nicht dargestellt.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Studienmedikation

Name		Konzentration	Hersteller
GM-CSF	Leukine® Liquid	500 mg/ml	Berlex, Richmond/USA
	Sargramostim	$2.8 \cdot 10^6$ IU/ml	
NaCl-Lösung			Charité Apotheke, Berlin

Verbrauchsmaterial

Name	Hersteller
Reaktionsgefäße 0.5; 1.5; 2 ml Safe seal	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße farbig, Rotilabo®	Carl Roth, Karlsruhe
Multi-Reaktionsgefäße 0.65 ml DNAse-/RNAse-frei	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen 10; 200; 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
LPS-freie Pipettenspitzen 200 µl	Eppendorf, Hamburg

Blutentnahme

Name	Zusatz	Inhalt	Hersteller
S-Monovette	Lithium Heparin	5.5 + 9 ml	Sarstedt, Nümbrecht
	Kalium-EDTA	2.7 ml	Sarstedt, Nümbrecht
	Citrat	5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
PAXgene	Stabilisierungslösung	6.9 ml Lösung	PreAnalytix
Blood RNA Tube		2.5 ml Blut	Hombrechtikon/ Schweiz
Vacutainer			Becton Dickinson,
Direct Draw Adapter			Heidelberg

3 Material und Methoden

Vollblutassay-Stimulantien

Name		Stock	Endkonzentration	Hersteller
RPMI 1640	Kulturmedium mit 2.0 g/l NaHCO ₃ ohne Glutamin very low endotoxine			Biochrom AG, Berlin
LPS	Lipopolysaccharid aus Escherichia coli, 0127:B8	5µg/ml	100 ng/ml	Sigma-Aldrich, München
CpG-A- ODN	Oligodesoxynukleotide (ODN) mit unmethylierten Desoxycytosin- Desoxyguanosin (CpG) Motiven, ODN 2336	1mg/ml	20µg/ml	Coley Pharmaceutical Group, Wellesley, USA
Pam3Cys	Pam3Cys-SKXXX. L2000	1mg/ml	20µg/ml	EMC Microcollections, Tübingen

Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Bechergläser 50, 250 ml	Simax, Czech Republic
Messzylinder Duran 100 ml	Carl Roth, Karlsruhe
Falcon Röhrchen 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Röhrchen 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Pipetten 5, 10, 25 ml	Becton Dickinson, Heidelberg

3 Material und Methoden

Färbungen am LSR II-Durchflusszytometer

Antikörper	Farbstoff	Hersteller	Emissions- maximum
CD14	ECD= Phycoerythrin-Texas Red (PE Texas Red 610)	Beckman Coulter, Krefeld	610 nm
CD16	Pacific Blue	Becton Dickinson, Heidelberg	455 nm
CD33	Phycoerythrin-Cy7 (PE-Cy7)	Becton Dickinson, Heidelberg	750-810 nm
HLA-DR	Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP)	Becton Dickinson, Heidelberg	670 nm
BDCA-2	Allophycocyanin (APC)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch- Gladbach	660 nm
CD45	Allophycocyanin-Cy7 (APC-Cy7)	Becton Dickinson, Heidelberg	750-810 nm
CD86	Phycoerythrin (PE)	Caltag Laboratories, Hamburg	575 nm
CD40	Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)	Caltag Laboratories, Hamburg	530 nm

Färbungen am FACSCalibur-Durchflusszytometer

Antikörper	Farbstoff	Hersteller	Emissions- maximum
CD14	Peridinin Chlorophyll Protein- Cy5.5 (PerCP-Cy5.5)	Becton Dickinson, Heidelberg	690 nm
HLA-DR	Phycoerythrin (PE)	Becton Dickinson, Heidelberg	580 nm

3 Material und Methoden

Geräte

Name		Hersteller
Pipetten	Pipette 10, 50, 200, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
	Pipettierhilfe Pipettus Standard	Hirschmann, Heilbronn
Zentrifugen	Kühlzentrifuge CR 422	Jouan, Saint-Herblain/Frankreich
	Tischzentrifuge Hermle Z 160 M	Neolab, Heidelberg
Absaugpumpe	Laboport	Neuberger, Freiburg
Sterilbank	Hera Safe, Heraeus	Kendro Laboratory Products, München
Brutschrank	CO ₂ -Inkubator Heraeus	Kendro Laboratory Products, München
	37° C	
	5 % CO ₂	
Tiefkühler	Hera Freeze Heraeus	Kendro Laboratory Products, München
	- 80° C	
Durchflusszytometer	LSR II	Becton Dickinson, Heidelberg
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
IMMULITE®-Mess-System		Siemens Healthcare Diagnostics
ELISA-Mess-System	für GMCSF (IL12p40/70)	
CBA Mess-System	FACS-Array™ Bioanalyzer	Becton Dickinson, Heidelberg
Rüttler	Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, USA

Kompensation des Durchflusszytometers

Name		Hersteller	
Anti-Mouse Igk	Compensation Beads	Becton Heidelberg	Dickinson,
Negative control (FBS)	Compensation Beads	Becton Heidelberg	Dickinson,

3 Material und Methoden

Lösungen für Durchflusszytometrie

Name		Hersteller
FACS-Lyse	FACS lysing solution, verdünnt 1:10 mit Aqua. dest	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS-Puffer	Falk-Lösung, plus 0.1% Na-Acid 2% FCS, endotoxinfrei	Charité-Apotheke, Berlin Serva GmbH, Heidelberg Biochrom AG, Berlin
Aqua dest.	Ampuwa für Spülzwecke	Fresenius Kabi Bad Homburg v.d.H
FACS Flow		Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Clean		Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse		Becton Dickinson, Heidelberg

Software

Name	Hersteller
CellQuest	Becton Dickinson, Heidelberg
QuantiBrite	Becton Dickinson, Heidelberg
QuantiCalc	Becton Dickinson, Heidelberg
FACS Diva	Becton Dickinson, Heidelberg
SPSS 16.0	SPSS Inc., Chicago, USA
FlowJo 8.6.3	Tree Star, Ashland, USA
MS Office	Microsoft, Redmont, USA
FCAP Array Software	Becton Dickinson, Heidelberg
MedCalc 9.0.1	MedCalc, Mariakerke, Belgien

3 Material und Methoden

Test-/Reaktions-Kits

Name	Hersteller
<i>ex vivo</i> LPS-Stimulations Kit	Milenia, Bad Nauheim
QuantiBRITE™PE-Beads	Becton Dickinson, Heidelberg
QualiBRITE™-Beads	Becton Dickinson, Heidelberg
IMMULITE® IL-6/ IL-10/ TNF- α	DPC Biermann, Bad Nauheim
PCT LIA Assay	BRAHMS Diagnostica GmbH, Berlin
Quantikine® Human GM-CSF ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden
BD Cytometric Bead Array	Becton Dickinson, Heidelberg
Human Soluble Protein Master Buffer Kit	
BD Human IL-6 Flex Set	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Human IL-8 Flex Set	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Human IL-10 Flex Set	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Human MIP-1a Flex Set	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Human MCP-1 Flex Set	Becton Dickinson, Heidelberg
BD Human TNF- α Flex Set	Becton Dickinson, Heidelberg

3.2 Methoden

3.2.1 Patienten

Von September 2005 bis Dezember 2006 wurden 38 Patienten aus drei chirurgischen bzw. medizinischen Intensivstationen (ITS) der Charité-Universitätsmedizin Berlin in die Studie eingeschlossen.

Als Einschlusskriterien an Visite 0 galten ein Alter von mindestens 18 Jahren, die Diagnose einer schweren Sepsis und/oder eines septischen Schocks nach den Kriterien der Consensus Conference von 1992 (siehe Klinische Definitionen, Kapitel 1), der Nachweis einer über 48 Stunden bestehenden Immunparalyse, definiert über eine monozytäre HLA-DR-Expression von weniger als 8000 Molekülen pro CD14⁺-Monozyten, sowie das Vorliegen einer Einwilligungserklärung.

Ausschlusskriterien waren fehlendes Einverständnis, Alter unter 18 Jahren, bekannte Überempfindlichkeit gegen GM-CSF oder gegen Hilfsstoffe des Präparates (Mannitol, Zitrat, NaHCO₃), Schwangerschaft oder Stillzeit, moribunde Patienten mit einer Lebenserwartung unter 24 Stunden, Dauertherapie mit systemischen Glukokortikoiden über mehr als 6 Monate, hämatologische Systemerkrankungen, HIV-Infektion, akuter Herzinfarkt, akute

Lungenarterienembolie, akute Pankreatitis sowie ein Zustand nach Reanimation innerhalb der letzten 72 Stunden.

3.2.2 Studiendesign und Behandlungsschema

Es handelte sich um eine prospektive, randomisierte doppelblind Placebo-kontrollierte Studie.

Beide Studienarme enthielten jeweils 19 Patienten von drei Intensivstationen der Charité mit

- schwerer Sepsis und/oder septischen Schock nach den Kriterien der Consensus Conference von 1992 (siehe Klinische Definitionen, Kapitel 1)
- sowie dem Nachweis einer über 48 Stunden bestehenden Immunparalyse, definiert über eine monozytäre HLA-DR-Expression unter 8000 Molekülen pro CD14⁺-Monozyten (siehe Kapitel 3.2.5.2).

Die Gabe der Studienmedikation rhGM-CSF/Sargramostim (Leukine®) erfolgte täglich über 8 Tage (Im Folgenden als Visiten bezeichnet), die Zeit der Patientenbeobachtung betrug insgesamt die Dauer von 28 Visiten.

Nach der an Visite 0 durch den Prüfarzt erfolgten Rekrutierung des Patienten in die Studie wurde während der Visiten 1 bis 5 täglich durch das Stationspersonal einmal Blut entnommen sowie die Studienmedikation bzw. Placebo in einer Dosierung von 4µg/kg Körpergewicht (KG) subkutan verabreicht. Bei Erholung aus der Immunparalyse (>15.000 HLA-DR/Monozyt) an Visite 5 wurde die Therapie in gleicher Form für die Visiten 6 bis 8 beibehalten. Kam es hingegen an Visite 5 nicht zu einer Normalisierung der monozytären HLA-DR-Expression (>15.000 HLA-DR/Monozyt), so wurde die Dosis des Medikaments bzw. Placebos um den Faktor 2 auf 8µg/kg KG bis zur Visite 8 erhöht („Dosis-Eskalation“). Zur Visite 8 erfolgte letztmalig die Präparatgabe. Die immunologische Diagnostik (siehe Kapitel 3.4) und das klinische Monitoring (siehe Kapitel 6.5) wurden in jedem Fall bis zur Visite 9 beibehalten.

Von Visite 10 bis 28 schloss sich die Nachbeobachtungsphase an, die mit der Erfassung des Outcomes („28 Tage-Mortalität“) an Visite 28 endet – siehe Abb. 3.

Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Charité genehmigt; Einverständniserklärungen liegen für alle Patienten in schriftlicher Form vor.

3 Material und Methoden

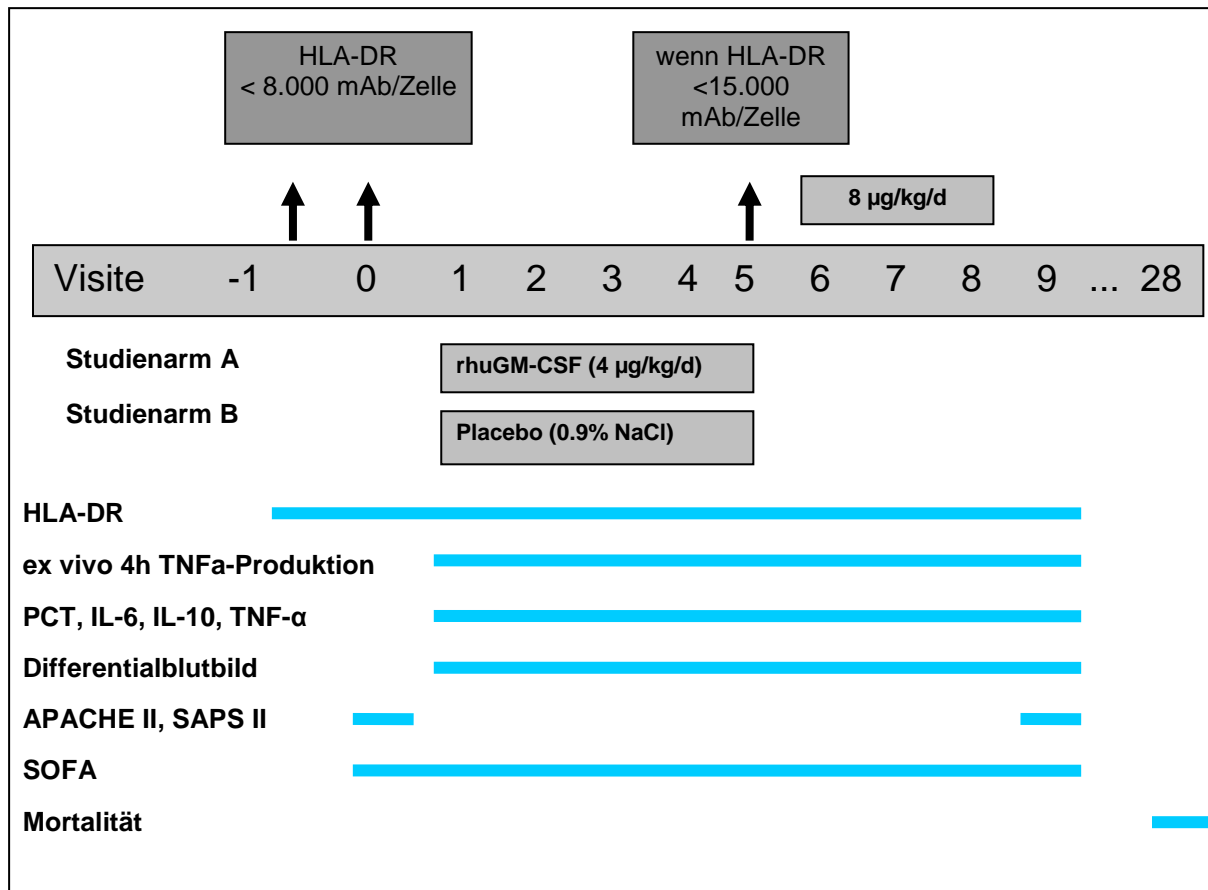


Abbildung 3: Zeitlicher Ablauf der Studie mit durchgeführten Interventionen und erhobenen Daten. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

3.2.3 Laborbestimmungen

Die Bestimmung der monozytären HLA-DR-Expression, der Plasmaspiegel von IL-6, TNF- α , Procalcitonin (PCT), IL-10, GM-CSF, sowie die 4h-TNF- α -*ex vivo*-Produktion nach Vollblutstimulation, Leukozytenzahl und Differentialblutbild erfolgte an den Visiten 1 bis 9 täglich durch das Personal des Labors des Instituts für Medizinische Immunologie.

Neben der Erhebung der täglichen Routine-Parameter wurden an den Visiten 1, 5 und 9 im Rahmen dieser Arbeit zusätzlich Antigen-präsentierende Zellen (Monozyten, DC) im peripheren Blut phänotypisch durch Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 3.2.5.2) und funktionell über Vollblutstimulationen (siehe Kapitel 3.2.6) charakterisiert.

3.2.4 Klinische Datenerhebung (intensivmedizinische Scores)

Neben der Bestimmung von Labordaten wurden klinische und paraklinische Parameter bei den Patienten erhoben. Als Aufnahmewert an Visite 0 wurden der „Acute Physiology And Chronic Health Score“ (APACHE II),¹⁰⁸ der „Simplified Acute Physiology Score“ (SAPS II)¹⁰⁹ und der „Sequential Organ Failure Assessment Score“ (SOFA)¹¹⁰ zu Grunde gelegt, die aktuelle

3 Material und Methoden

physiologische Parameter des Patienten ebenso wie Alter und Co-Morbidität abbilden. Während der Visiten 1 bis 9 wurden täglich SAPS II und SOFA erhoben, an Visite 9 zusätzlich der APACHE II. Die Dokumentation der verschiedenen Scores erfolgte mit Hilfe der Copra-Software auf den jeweiligen Intensivstationen (siehe Tabellen 3-5). Das Überleben der Patienten wurde am Studientag 28 dokumentiert (Mortalität). Weiterhin wurden die Liegedauer auf Intensivstation sowie Gesamtdauer der Hospitalisierung, Dauer von Nierenersatztherapie und mechanischer Ventilation und die Begleitmedikation wie der Einsatz von Antibiotika, nicht-steroidaler Antiphlogistika, niedrig dosierter Glukokortikoide oder adjuvanter Insulintherapie dokumentiert.

Tabelle 3: SOFA. Nach:www.MDCalc.com¹¹⁰

Organ	Parameter		Punkte			
			1	2	3	4
Lunge	PaO ₂ /FiO ₂	mmHg			≤200	≤100
			≤400	≤300	mit Beatmung	mit Beatmung
Niere	Kreatinin oder	mg/dL	1.2 - 1.9	2.0 - 3.4	3.5 - 4.9	≥5.0
	Diurese	ml/Tag	-	-	<500	<200
Leber	Bilirubin	mg/dL	1.2 - 1.9	2.0 - 5.9	6.0 - 11.9	> 12.0
Herz/Kreislauf	Blutdruck und Katecholamine	mmHg	MAP	Katechol.	Katechol.	Katechol.
			<70	niedrig*	mittel*	hoch*
Blut	Thrombozyten	1000/mm ³	≤150	≤100	≤50	≤20
ZNS	Glasgow Coma Scale		14 - 13	12 - 10	9 - 6	<6

* Katecholamindosis
niedrig - Dopamin ≤5 oder Dobutamin (jede Dosis) für mind. 1 Stunde
mittel - Dopamin >5 oder Adrenalin/Noradrenalin ≤0,1 µg/kg*min
hoch - Dopamin >15 oder Adrenalin/Noradrenalin >0,1 µg/kg*min

Tabelle 4: APACHE II. Nach: www.intensivcareunit.de¹⁰⁸

APACHE II Score Erhebungsbogen (Deutsch)

NEGATIVSTE WERTE	ERHOBENE VARIABLEN						ABWEICHUNGEN NACH OBEN						ABWEICHUNGEN NACH UNTEN						Punkte
	+4	+3	+2	+1	+0	+1	+2	+3	+4	+1	+2	+3	+4	+1	+2	+3	+4		
Temperatur – rektal (°C)	≥ 41°C	39-40,9°C		38,5-38,9°C	36-38,4°C	34-35,9°C	32-33,9°C	30-31,9°C	≤ 29,9°C										
Mittlerer arterieller Druck (mmHg)	≥ 160	130-159	110-129		70-109		50-69		≤ 49										
Herzfrequenz HF /min	≥ 180	140-179	110-139		70-109		55-69		≤ 39										
Atemfrequenz AF /min <i>Beimem und nicht beatmet</i>	≥ 50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		≤ 5										
Oxygenierung <i>Wird gemessen, aber wird die AaDO₂ arterielle Sauerstoffdifferenz</i>	≥ 500	350-499	200-349		< 200														
AaDO ₂ arterielle Sauerstoffdifferenz <i>Bei einem FiO₂ < 0,5 wird der arterielle Sauerstoffdruck (paO₂) in mmHg berücksichtigt</i>					> 70	61-70													
pH arteriell	≥ 7,7	7,6-7,69		7,5-7,59	7,3-7,49		7,2-7,32		≤ 7,15										
Natrium mmol/l	≥ 180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129		≤ 110										
Kalium mmol/l	≥ 7	6-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9		≤ 2,5										
Kreatinin mg/100ml <i>Bei akuten Nierenversagen Punkte verdoppelt</i>	≥ 3,5	2-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		< 0,6												
Hämatokrit %	≥ 60						20-29,9		< 20										
Leukozyten (x1000)	≥ 40		20-39,9				1-2,9		< 1										
Glasgow-Coma-Skala (GCS)																			

Punkte = 15 – aktueller Glasgow-Coma-Score

Punkte gesamt:

¹Sie berechnet sich aus AaDO₂ (mmHg) = pO₂-pO₂; oder wird vom BGA-Gerät zur Verfügung gestellt

Age Points: ≤ 44 Jahre = 0 Punkte 45-54 = 2 Punkte 55-64 = 3 Punkte 65-74 = 5 Punkte ≥ 75 = 6 Punkte

Durch Biopsie gesicherte Zirrhose und festgestellter portaler Hochdruck	Ja <input type="radio"/>	Nein <input type="radio"/>	
Obere gastrointestinale Blutungen in der Vorgeschichte, ausgehend von einem portalen Hochdruck	Ja <input type="radio"/>	Nein <input type="radio"/>	
Vorhergehende Episoden mit hepatischer Insuffizienz/hepatischer Enzephalopathie/hepatischem Koma	Ja <input type="radio"/>	Nein <input type="radio"/>	
Ileus/ York Health Association (IYHA) Class IV	Ja <input type="radio"/>	Nein <input type="radio"/>	
Chronische restriktive, obstruktive oder gefäßbedingte Erkrankungen, die mit einer schweren Einschränkung bei leichten Aufgaben einhergehen (z.B. Unfähigkeit Haushalt zu führen)	Ja <input type="radio"/>	Nein <input type="radio"/>	
Bekannte chronische Hypoxie, Hyperkapnie, sekundäre Polyzystämie, schwere pulmonale Hypertension (>40mmHg) oder Abhängigkeit von Beatmung	Ja <input type="radio"/>	Nein <input type="radio"/>	
chronische Dialyse	Ja <input type="radio"/>	Nein <input type="radio"/>	
Der Patient hatte eine Therapie, welche die Abwehrkraft gegen Infektionen schwächt (z.B. Immunsuppression, Chemotherapie, Bestrahlung, langfristige oder hochdosierte Steroide)	Ja <input type="radio"/>	Nein <input type="radio"/>	
Erkrankungen, die mit einer Immunschwäche einhergehen (z.B. Leukämie, Lymphom, AIDS)	Ja <input type="radio"/>	Nein <input type="radio"/>	
Nicht-operierter Patient	bei einem JA 5 Punkte		
Postoperativer Patient nach Notfall-OP	bei einem JA 5 Punkte		
Postoperativer Patient nach Elektiv-OP	bei einem JA 2 Punkte		
APACHE II Score:	+	+	=

©2004 www.IntensivCareUnit.de/Andrie Gerdes
- Ohne Gewähr -

3 Material und Methoden

Tabelle 5: SAPS II. Nach: www.dimdi.de¹⁰⁹

Parameter	Befund	Punktwert
Alter (Jahre)	<40	0
	40–59	7
	60–69	12
	70–74	15
	75–79	16
	80	18
Herzfrequenz(1/min)	<40	11
	40–69	2
	70–119	0
	120–159	4
	160	7
Systolischer Blutdruck (mmHg)	<70	13
	70–99	5
	100–199	0
	200	2
Temperatur(°C)	<39	0
	39	3
PaO ₂ / FiO ₂ (bei Beatmung) (mmHg)	<100	11
	100–199	9
	200	6
Urinausfuhr(l/d)	<0,5	11
	0,5–0,999	4
	1,0	0
Harnstoff(mg/dl)	<28	0
	84	10
Leukozyten(10 ⁹ /l)	<1,0	12
	1,0–19,9	0
	20	3
Kalium(mmol/l)	<3,0	3
	3,0–4,9	0
	5,0	3
Natrium(mmol/l)	<125	5
	125–144	0
	145	1
Bikarbonat(mmol/l)	<15	6
	15–19	3
	20	0
Bilirubin(mg/dl)	<4,0	0
	4,0–5,9	4
	6,0	9
Glasgow ComaScore	<6	26
	6–8	13
	9–10	7
Chron.Erkrankungen	Metastastasierendes Karzinom	9
	HämatologischesMalignom	10
	AIDS	17
ArtderZuweisung	GeplanteOP	0
	MedizinischeUrsache	6
	Not-OP	8

3.2.5 Durchflusszytometrie (FACS)

3.2.5.1 Grundlagen

Die Durchflusszytometrie/„fluorescence-activated-cell-sorter“ (FACS) ermöglicht die Untersuchung von Zellen oder anderen Partikeln auf ihre Größe, innere Struktur sowie Oberflächeneigenschaften. Ermöglicht wird dies durch charakteristische Eigenschaften von Streulicht und Fluoreszenz der jeweiligen Zellen.

In der zu untersuchenden Suspension müssen die Zellen einzeln vorliegen. Diese wird innerhalb des Zytometers durch eine dünne Röhre geleitet und mittels einer Mantelflüssigkeit beschleunigt, so dass eine laminare, nicht-turbulente Strömung entsteht. So kann innerhalb kürzester Zeit eine große Anzahl Zellen auf Einzelzellebene untersucht werden. Derart vereinzelt wird jede Zelle am so genannten Messpunkt durch einen Laser getroffen.

In Abhängigkeit von den physikalischen Eigenschaften einer Zelle entsteht Streulicht, das von Photomultipliern (PMT) aufgefangen und in ein digitales Signal umgewandelt wird. Es wird einerseits das von der Größe der Zelle abhängige Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) detektiert, andererseits das von der inneren Struktur und Granularität der Zelle bestimmte 90°-Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC). Durch die beiden Parameter Größe und Granularität ist es möglich, die unterschiedlichen Leukozyten-Populationen (Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten) voneinander getrennt in einem Diagramm (Scatterplot) darzustellen.

Weiterhin können Zellen über die von ihnen exprimierten Oberflächen-Antigene unterschieden werden, indem man spezifisch gegen diese gerichtete Antikörper mit Fluoreszenzfarbstoffen koppelt, man spricht von „Färbung“ der Zellen. So ist die qualitative und quantitative Untersuchung von Zellpopulationen möglich. Fluoreszenzfarbstoffe werden durch den Laser innerhalb eines charakteristischen Spektralbereichs von der absorbierten Lichtenergie angeregt und emittieren ihrerseits Licht eines definierten Wellenlängenbereiches. Das emittierte Licht gelangt über Filtersysteme zu zusätzlichen PMT, wird von diesen detektiert und in ein elektronisches Signal umgewandelt. Bei Verwendung mehrerer Farbstoffe ist es möglich, dass sich benachbarte Wellenlängen-Spektren überlappen und emittiertes Licht durch einen dem jeweiligen Farbstoff nicht zugeordneten PMT aufgenommen wird. Diesem Phänomen wird elektronisch durch die so genannte Kompensation begegnet.

3.2.5.2 Durchführung der FACS-Messungen

Messung der monozytären HLA-DR-Expression am FACSCalibur-Durchflusszytometer

Für die im Routine-Labor des Instituts für Medizinische Immunologie erfolgte tägliche Messung der monozytären HLA-DR-Expression wurde ein FACSCalibur™-Durchflusszytometer

3 Material und Methoden

verwendet.

Durch Anlegen einer Eichkurve mittels Quantibrite™-PE-Beads und der Färbung von HLA-DR-Molekülen auf Monozyten mit einem im Verhältnis von 1:1 mit PE konjugierten anti-HLA-DR-Antikörper konnte durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten die Anzahl von HLA-DR-Molekülen pro Monozyt bestimmt werden, nachdem die Frequenz der Monozyten über einen PerCP-Cy5.5 konjugierten anti-CD14-Antikörper bestimmt wurden.

Zu 50µl des auf Eis transportierten und gelagerten EDTA-Vollblut wurden 20µl Antikörpermischung gegeben; letzteres enthielt PE-konjugierte HLA-DR-Antikörper und PerCP-Cy5.5-konjugierte Antikörper gegen das auf Monozyten exprimierte Molekül CD14. Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 500µl FACS-Lysing Solution während 15 Minuten erneuter Dunkel-Inkubation bei Raumtemperatur lysiert. Nach Zentrifugation (200 g) wurde der Überstand verworfen und nach Zugabe von 1ml FACS-Puffer erneut zentrifugiert (200 g). Nach Absaugen des Überstands bis auf 100 µl, war die Probe messbereit.

Phänotypische Charakterisierung Antigen-präsentierender Zellen (APC) am LSR II-Durchflusszytometer

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit an den Visiten 1, 5 und 9 durchgeführten Färbungen zur Charakterisierung Antigen-präsentierender Zellen (APC) wurden am BD LSR II-Durchflusszytometer gemessen. Das LSR II ist mit drei Lasern der Wellenlängen 405 nm (violett), 488 nm (blau) und 633 nm (rot) ausgestattet und erlaubt eine Multicolor-Messung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit 8 Farbstoffen gearbeitet (siehe 6.1.4).

Mittels so genannter Compensation-Beads wurden vor Messung der Patientenproben die Geräteeinstellungen des LSR II-Durchflusszytometers vorgenommen. Hierbei wurden zwei Populationen von Mikropartikeln verwendet: eine Negativpopulation ohne Bindungseigenschaften zur Darstellung des Hintergrundrauschens sowie eine Population mit Bindungseigenschaften gegen Maus-Antikörper als Positivkontrolle. Die Positivpopulation wurde entsprechend dem in der Studie verwendeten Färbeprotokoll für APC behandelt. Die als Referenzwert gemessenen Negativ- und Positivpopulationen erlaubten über die FACS Diva-Software die Einstellung der Detektorenspannungen des Durchflusszytometers für die Emissionsspektren der einzelnen Farbstoffe. Die auf diese Weise erstellten Kompensationseinstellungen wurden für die Messung der Patientenproben übernommen.

In Einzelfällen wurde bei der Auswertung der Messungen eine Nach-Kompensation mit der FlowJo-Software durchgeführt.

3 Material und Methoden

Tabelle 6: Antikörpergemisch („Master-Mix“) für APC-Färbungen

Antikörper	Farbstoff	Volumen [μ l]
CD14	ECD	6
CD16	Pac.Blue	8
BDCA-2	APC	10
HLA-DR	PerCP	10
CD33	PE-Cy7	5
CD45	APC-Cy7	6
CD86	PE	5
CD40	FITC	10

Zu 100 μ l des auf Eis transportierten und gelagerten EDTA-Vollblutes wurden 60 μ l des angesetzten Antikörpergemischs (siehe Tabelle 6) gegeben.

Nach 30-minütiger Inkubation im Dunkeln bei 4°C wurde die Probe gemischt und 2 ml FACS-Lysing Solution zugegeben. Hierauf folgte eine erneute Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur, um die Erythrozyten zu lysieren. Nach Zentrifugation (400 g) für 8 Minuten bei 4°C wurde der Überstand verworfen und nach Zugabe von 2 ml FACS-Puffer erneut für 8 Minuten bei 4°C zentrifugiert (400 g). Nach Absaugen des Überstands bis auf 100 μ l war die Probe messbereit.

3.2.5.3 FACS-Auswertung

Bestimmung der monozytären HLA-DR-Expression

Durch Verwendung der QuantiBrite-Kalibrierung konnte über eine 1:1-Quantifizierung die Vergleichbarkeit im Zeitverlauf (Standardisierung) und Quantifizierung der Moleküle pro Zelle erreicht werden. Hierbei werden die mit einer jeweils definierten Anzahl von PE-Molekülen bestückten vier Test-Populationen gemessen und das Messergebnis der Molekülzahl der jeweiligen Population zugeordnet.

Die Auswertung der Messergebnisse der Patienten-Proben erfolgte mit der QuantiCalc-Software, wodurch die als geometrischer Mittelwert ausgedrückte Zahl der gebundenen HLA-DR-Antikörper pro Zelle ermittelt wurde.

Durch das beschriebene Verfahren wird ein hoher Grad an Standardisierung mit einem Inter-Assay-Variationskoeffizienten <5% erreicht.^{76,83,111}

3 Material und Methoden

Phänotypische Charakterisierung Antigen-präsentierender Zellen (APC)

Die Auswertung der an den Visiten 1, 5 und 9 am LSR II-Durchflusszytometer gemessenen Färbungen zur Charakterisierung der APC erfolgte mit der FlowJo-Software.

Untersucht wurden folgende Zellpopulationen: Monozyten und deren Subpopulationen $CD14^+CD16^+$ -doppelt positiver Monozyten und $CD14^+CD16^-$ -Monozyten sowie myeloide (MDC) und plasmazytoide dendritische Zellen (PDC). Jede dieser zur Gruppe der APC gehörenden Populationen wurde im Zeitverlauf unter GM-CSF-Therapie auf die Expression von HLA-DR sowie der co-stimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 untersucht.

Zur Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen wurde nach folgender Strategie vorgegangen: In einem ersten Schritt wurden nicht-granulozytäre Leukozyten (=mononukleäre Zellen) über die Merkmale „hohe CD45-Expression“ sowie „geringe Granularität (Sideward Scatter, SSC)“ identifiziert und auf diese Weise von Granulozyten getrennt (siehe Abb. 4).

Innerhalb dieser mononukleären Zellen konnte dann – über eine bei niedriger CD14-Expression gleichzeitig bestehende hohe CD33-Expression – die Subpopulation der MDC bestimmt werden (siehe Abb. 5).

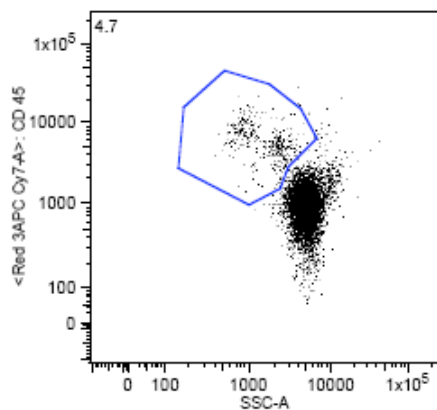


Abbildung 4: Über die hohe Expression von CD45 bei geringer SSC-Intensität werden nicht-granulozytäre Leukozyten identifiziert und zur weiteren Auswertung „gegatet“.

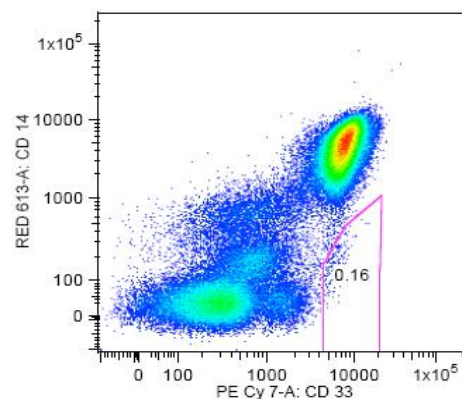


Abbildung 5: MDC zeichnen sich aus durch eine hohe Intensität von CD33 bei schwacher Expression von CD14.

Die Identifizierung von Monozyten gelang über die weitere Auftrennung monozytärer, nicht-MDC (siehe Abb. 6) gemäß ihrer starken Oberflächenexpression desmyeloiden Zell-Linien-Markers CD33. Weiter wurde über den Grad der Ausprägung des CD16-Moleküls zwischen $CD14^+CD16^+$ -doppelt positiven und $CD14^+CD16^-$ -negativen Monozyten unterschieden (siehe Abb. 6).

3 Material und Methoden

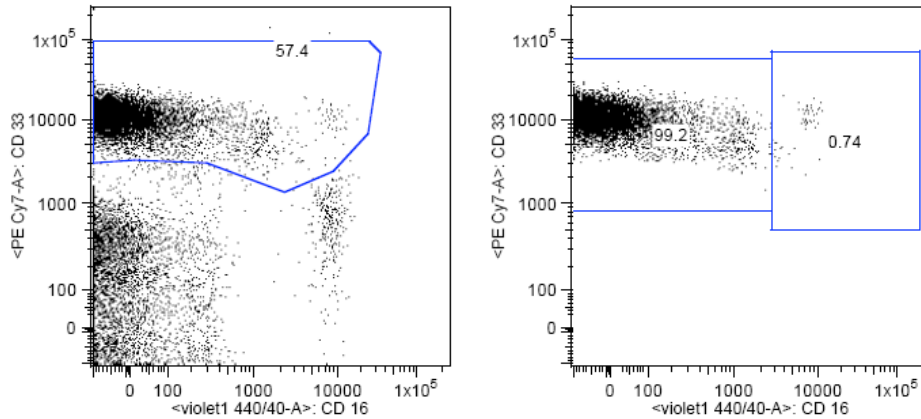


Abbildung 6: CD33⁺ Monozyten werden auf der Basis unterschiedlich starker CD16-Expression in die beiden Populationen CD14⁺16⁺ und CD14⁺16⁻ unterteilt und getrennt ausgewertet.

Nicht-monozytäre Zellen mittelgradiger CD45-Expression, die gleichzeitig den Oberflächenmarker BDCA-2 in großer Anzahl tragen, wurden als PDC identifiziert (siehe Abb 7).

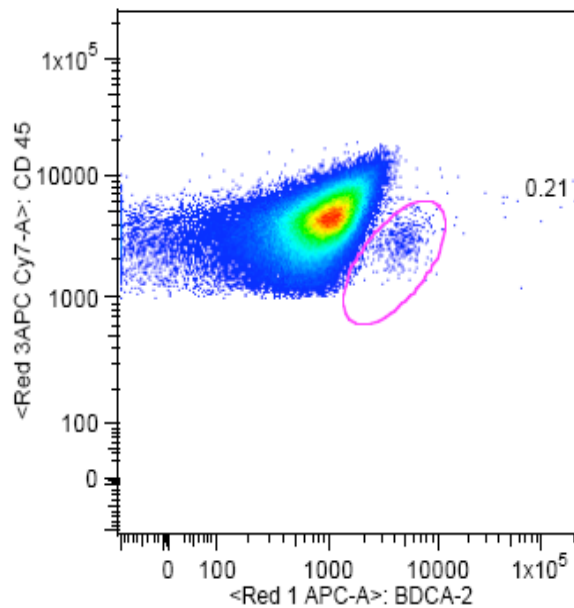


Abbildung 7: CD45⁺ und BDCA-2⁺ doppelt positive Zellen werden als Subpopulation von PDC identifiziert.

Nachfolgend wurde für jede der identifizierten Zellpopulationen die Expression von HLA-DR, CD40 und CD86 an den Visiten V1, V5 und V9 als geometrischer Mittelwert der jeweiligen Fluoreszenzintensität, die proportional zur Antigendichte/Zelle ist, dargestellt und statistisch ausgewertet.

3.2.6 Funktionelle Charakterisierung Antigen-präsentierender Zellen (APC)

Zur Bestimmung der Funktion der APC bei Sepsispatienten mit Immunparalyse unter GM-CSF

3 Material und Methoden

bzw. Placebo-Therapie wurde im Rahmen dieser Arbeit jeweils an den Visiten 1, 5 und 9 eine Stimulation mit Patientenvollblut durchgeführt. Stimuliert wurde mit bakteriellen Produkten (PAMPs), die über Bindung an spezifische TLR zur Aktivierung der APC führen.

Unter sterilen Bedingungen wurden jeweils 240 µl Heparin-Blutes mit 250 µl RPMI-Medium sowie 10 µl des entsprechenden Stimulans versehen und die Ansätze von 500 µl Gesamtvolumen bei 37° für 4 bzw. 24 Stunden inkubiert.

Nach Inkubation wurde der Stimulationsansatz zentrifugiert (5000 rpm) und der Überstand bei -80°C aufbewahrt. Die gebildeten Zytokine wurden im Überstand mittels CBA-Technik gemessen.

Im Folgenden werden die verwendeten Stimulantien kurz beschrieben.

3.2.6.1 LPS

Das zur Gruppe der PAMPs gehörende Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Endotoxin der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien. Nach Stimulation des CD14-Moleküls³⁸ und Aktivierung des Toll-like-Rezeptors (TLR) 4 wird die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α durch Monozyten und Makrophagen induziert.^{15,41}

Es wurde mit LPS der Endkonzentration 100 ng/ml für 4h und 24h stimuliert.

3.2.6.2 Pam3Cys

Die Zellwände Gram-positiver Bakterien enthalten Lipoteichonsäuren, die als PAMP von TLR-2 erkannt werden. Pam3Cys ist ein synthetisches Lipopeptid, das den auf Monozyten und MDC exprimierten TLR-2 stimuliert⁴² und zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führt.³⁵

In der vorliegenden Arbeit wurde Pam3Cys in einer Endkonzentration von 20 µg/ml für die Stimulationen über 4h und 24h verwendet.

3.2.6.3 CpG-DNA

TLR-9 ist intrazellulär in PDC lokalisiert. Die Aktivierung von TLR-9 erfolgt durch DNA mit Regionen unmethylierter CpG-Dinukleotide¹¹² oder durch virale Stimuli.¹¹³ Die so aktivierten PDC produzieren neben anderen Zytokinen vor allem IFN- α und IL-8.¹¹⁴

Es wurde mit CpG-A-DNA (CpG 2366) der Endkonzentration 20 µg/ml für 24h stimuliert.

3.2.7 Monozytäre *ex vivo*-TNF- α -Sekretionskapazität

Die Messung der monozytären TNF- α -Produktion nach *ex vivo*-Stimulation mit LPS ist im Institut für Medizinische Immunologie als Standardtest zur Erfassung der Monozyten-Funktion etabliert; dieser Test wurde im Rahmen der Studie an jedem Visitentag durchgeführt.

Für diese Stimulation wurden ausschließlich Endotoxin-freie, einzeln verpackte Materialien

3 Material und Methoden

(Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen) verwendet. Zu vorbereiteten 500 µl einer LPS-Lösung wurden 50 µl Heparin-Blutes gegeben und der Ansatz in einer Endkonzentration von 500 pg/ml LPS für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation (1000 g) wurde der Überstand bei -80°C gelagert, bis zur späteren Messung im Immulite-System.

3.2.8 Bestimmung humoraler Faktoren mittels „Enzyme Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)

Das im EDTA-Patientenplasma vorliegende GM-CSF wurde mittels ELISA-Technik gemessen. Der ELISA ist ein gängiges Prinzip in der medizinischen Diagnostik und Forschung zur quantitativen Detektierung gelöster Stoffe. Vorteile des Verfahrens sind die extrem niedrige Nachweisgrenze, die gute Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit sowie die einfache Durchführung.

Grundlage eines jeden ELISA sind drei chemisch-physikalische Prozesse:

- Adsorption eines Antikörpers oder Antigens an eine Festphase
- Spezifische Bindung von Antikörper und Antigen
- Enzymatische Nachweisreaktion.

Es wurde das ELISA-Kit von R&D (Quantikine® Human GM-CSF ELISA) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben:

96-well-Mikrotiter-Platten mit gegen GM-CSF gerichtetem Primärantikörper wurden mit Blockpuffer beschichtet, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Danach wurden die zu untersuchenden Plasmen auf die Platten gegeben, wobei es zur spezifischen Bindung des Antigens (GM-CSF) mit dem an die Festphase gebundenen Antikörper kommt. Durch Zugabe eines biotinylierten Sekundärantikörpers, der das GM-CSF-Molekül an einem zweiten Epitop zu binden vermag, entsteht ein typischer „Sandwich“-Komplex; das Zielmolekül wird von oben und unten durch Antikörper umschlossen. Anschließend zugegebene Meerrettich-Peroxidase (HRP) bindet den Biotin-Rest des Sekundärantikörpers. In der enzymatischen Nachweisreaktion wird Tetramethylbenzidin (TMB) durch die HRP proportional der gebundenen Antigenmenge zu einem farbigen Substrat umgesetzt. Mit Hilfe einer Standardkurve bekannter Konzentrationen konnte anhand der bei 450 nm bestimmten Absorption im ELISA-Plattenreader die GM-CSF-Konzentration gemessen werden.

Die Nachweisgrenze für GM-CSF lag bei 3 pg/ml.

3.2.8.1 Bestimmung humoraler Faktoren mittels Immulite

Der Immulite™ (Siemens Healthcare Diagnostics) ist ein halbautomatisches Mess-System, das

3 Material und Methoden

auf dem Prinzip des Festphasen-Chemilumineszenz-Immunoassay beruht (vgl. Kapitel 3.2.8 „Sandwich-Prinzip“ des ELISA). Durch das Immulite-System können mit geringem Zeitaufwand und hohem Standardisierungsgrad verschiedene Parameter gemessen werden.

Als Festphase dienen Polystyrolkugeln, die mit dem gegen das jeweilige Zytokin gerichteten spezifischen Antikörper beschichtet sind. Die alkalische Phosphatase ist das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym, welches das Substrat Adamanthyldioethanphosphat (AMPPD) in ein instabiles Anionenzwischenprodukt umsetzt. Hierbei wird ein Photon freigesetzt, was wiederum durch einen Photomultiplier detektiert wird. Entsprechend dem ELISA gilt auch hier die Proportionalität zwischen detektierter Lumineszenz und gemessenem Zytokin.

Innerhalb der vorliegenden Studie wurden durch das Routine-Labor des Instituts die täglichen Blutplasma-Routine-Parameter IL-6 (in EDTA-Plasma) und IL-10 sowie TNF- α (beide in Heparin-Plasma) mit diesem System gemessen. Ebenso durch das Immulite-System wurde in der LPS-*Ex vivo*-Stimulation produziertes TNF- α bestimmt.

Die Nachweisgrenzen waren >2 pg/ml für IL-6 und >5 pg/ml für TNF- α , IL-8 und IL-10.

3.2.8.2 Bestimmung humoraler Faktoren mittels Cytometric Bead Array (CBA)

Der CBA-Test (BD Biosciences) verbindet das Färbe-Prinzip des ELISA mit der hohen Sensitivität der Durchflusszytometrie und erlaubt die parallele Bestimmung von 6 Zytokinen bei nur geringem Bedarf an Probenvolumen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Zytokine IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (bioaktives p70), MIP-1a, MCP-1 und TNF- α im Kulturüberstand nach 4 bzw. 24 Stunden gemessen.

Als Festphase der Bindungsreaktion dienen so genannte Beads. Beads sind kleine Partikel, die mit spezifischem Antikörper beschichtet sind und sich in Lösung befinden. Ihnen wird der die zu messenden Zytokine enthaltende Stimulationsüberstand beigegeben. Der Ansatz wird nun mit einem Phycoerythrin (PE)-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert, wobei sich ein „Sandwich“-Komplex formt (vgl. das in Kapitel 3.2.8 beschriebene ELISA-Prinzip). Da sich die Beads in Lösung befinden, reicht ein geringes Probenvolumen aus.

Die Messung erfolgte am FACSCalibur mit Hilfe der CellQuest-Software. Die Nachweisgrenze lag bei 10 pg/ml.

3.2.8.3 Bestimmung von Procalcitonin (PCT) mittels PCT-LIA

Zur täglichen Bestimmung der PCT-Plasmalevel wurde ein kommerziell verfügbares und nach dem ELISA-Prinzip (vgl. Kapitel 3.2.8) funktionierendes immunoluminometrisches Assay (PCT-LIA, BRAHMS) verwendet. Bei der nach Herstellerangaben durchgeführten Messung lag

die Nachweisgrenze bei 80 pg/ml.

3.3 Statistische Auswertung

Um eine 80%-ige Erholungsrate (Erhöhung des monozytären HLA-DR von <8.000 auf >15.000 Moleküle/Zelle) in der GM-CSF-Gruppe gegen eine Spontanerholungsrate von 30% in der Placebo-Gruppe in der vorliegenden Interventions-Studie mit einer 80%-igen Teststärke („power“) mit einem zweiseitigen p -Wert von 0.05 erfassen zu können, war der Einschluss von 19 Patienten je Behandlungsgruppe nötig. Eine Interimsanalyse wurde nicht durchgeführt.

Für die statistische Datenanalyse und Darstellung der Daten wurden MedCalc 9.0.1, SPSS 16.0, MS Excel und MS PowerPoint benutzt.

Zur statistischen Datenauswertung wurden je nach Eignung eine univariate Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) für wiederholte Messungen, der Student's t -Test sowie der Fisher's exakter Test verwendet. Der Mann-Whitney-U-Test wurde für unabhängige Stichproben verwendet. Subgruppen-Analysen wurden als univariate Varianzanalysen (ANOVA) mit Fisher's *post hoc*-Test durchgeführt.

Sämtliche vorhandenen Daten wurden mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Nicht normal verteilte Datensätze wurden logarithmisch transformiert.

Alle Ergebnisse beziehen sich auf die intention-to-treat (ITT)-Population und sind, sofern nicht anders vermerkt, als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

Ein p -Wert <0.05 wurde als signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 Studienpopulation

Im Rahmen dervon September 2005 bis Dezember 2006 durchgeführten randomisierten, doppelblinden, Placebo-kontrollierten Studie wurden insgesamt 135 Patienten, welche die klinischen Diagnosekriterien der schweren Sepsis bzw. des septischen Schocks erfüllten, zur Aufnahme in die Studie geprüft („Screening“). Zudem wurde innerhalb des immunologischen Routinemonitorings auf das Vorliegen einer Immunparalyse geprüft (siehe Kapitel 3.2.1).

Tabelle 7: Charakteristika der Population von Placebo- und GM-CSF-Gruppe bei Studienbeginn. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

Parameter	Placebo n= 19	GM-CSF n= 19	p-Wert
Studienzentrum 1 (chirurgisch)	7	8	
Studienzentrum 2 (anästhesiologisch)	4	0	
Studienzentrum 3 (internistisch)	8	11	
Alter (Jahre)*	65.3±14.2	64±13.6	ns ^a
Geschlecht (w/m)	4/15	3/16	ns ^b
Body Mass Index * (BMI)	26.4±4.8	27.4±6.3	ns ^a
Chirurgische/medizinische Patienten	11/8	11/8	ns ^b
septischer Schock bei Aufnahme in die Studie	10	11	ns ^b
APACHE II V1*	22.5±6,6	21.3±6,1	ns ^a
SAPS II V1*	45.6±13.4	38.8 ±8.9	ns ^a
SOFA V1*	9.5±3.7	7.2±4.0	ns ^a
Zeit auf ITS bis zum Studieneinschluss (Tage)*	8.47±8.9	6.0±3.3	ns ^a

* Mittelwert± Standardabweichung. ns: nicht signifikant. ITS: Intensivstation

^a Student's t-Test für unverbundene und gepaarte Proben. ^b exakter Fisher-Test

Sämtliche Patienten, die in Abwesenheit jeglicher Ausschlusskriterien (siehe Kapitel 3.2.1) zudem die Einschlusskriterien erfüllten, wurden in die Studie aufgenommen, so dass letztlich 38 (kaukasische) Patienten, verteilt auf drei Intensivstationen (ITS) (19 Patienten auf internistischer ITS, 15 Patienten auf chirurgischer ITS, 4 Patienten auf anästhesiologischer ITS) der Charité-Universitätsmedizin Berlin, eingeschlossen werden konnten.

Beide Studiengruppen waren hinsichtlich Alter, Geschlecht, Body Mass Index (BMI) und

4 Ergebnisse

Schweregrad der Sepsis (APACHE II, SAPS II und SOFA; alle $p > 0,05$) vergleichbar zusammengesetzt (siehe Tabelle 7). Weiterhin zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Komorbiditäten zwischen beiden Studiengruppen: arterielle Hypertension (58%), Hyperlipoproteinämie (34%), Diabetes mellitus (32%), Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD; 21%), Koronare Herz-Krankheit (18%) und chronische Niereninsuffizienz, mindestens Stadium III (18%).

Auch im Bezug auf Ort und Art des infektiösen Fokus ergab sich eine ähnliche Verteilung innerhalb der beiden Studiengruppen; die dominanten Sepsis-Foci waren Pneumonie (Placebo: $n=10$, GM-CSF: $n=11$) und Peritonitis (Placebo: $n=5$, GM-CSF: $n=6$). Aus ätiologischer Perspektive dominierten in beiden Gruppen Gram-positive Erreger (Placebo: $n=5$, GM-CSF: $n=9$) und Gram-positive/Gram-negative Mischinfektionen (Placebo: $n=4$, GM-CSF: $n=9$). Eine Ausnahme stellte die ungleiche Verteilung von Infektionen durch Gram-negative Erreger dar (Placebo $n=7$, GM-CSF $n=1$; $p=0,042$); siehe Tabelle 8.

Tabelle 8: Ätiologie der Infektionen von Patienten der Placebo- und GM-CSF-Gruppe bei Studienbeginn.

	Placebo $n=19$	GM-CSF $n=19$	p-Wert
Pathogene			
Gram-negativ	7	1	$p=0,042$
Gram-positiv	5	9	ns ^a
Gram-pos./neg. Mischinfektion	4	9	ns ^a
Pilze	2	1	ns ^a
kein Keimnachweis	1	0	ns ^a

ns= nicht signifikant ^a exakter Fisher-Test

4.2 Patienten-Allokation, Randomisierung und Behandlungsschema

Screening und Randomisierung der Studienpatienten erfolgte nach dem in Abb. 8 gezeigten Schema.

Ein Patient der Verum-Gruppe (GM-CSF) verstarb am 8. Studientag. Bei zwei Patienten der Placebo-Gruppe wurde die Präparat-Gabe vorzeitig abgebrochen: eine Patientin wurde am 3. Studientag entblindet, da eine akut aufgetretene Linksherz-Insuffizienz initial als eine mögliche schwere Nebenwirkung (SAE) interpretiert wurde; ein weiterer Patient der Placebo-Gruppe erhielt nach einer Notfall-Verlegung vom 6. Studientag an keine weitere Gabe des Präparates (=

4 Ergebnisse

Protokoll-Verletzung).

Während die Intention-to-treat (ITT)-Population 38 Patienten beinhaltete, umfasste die Per-protocol (PP)-Population folglich nur 35 Patienten (siehe Abb. 8). Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf die ITT-Population.

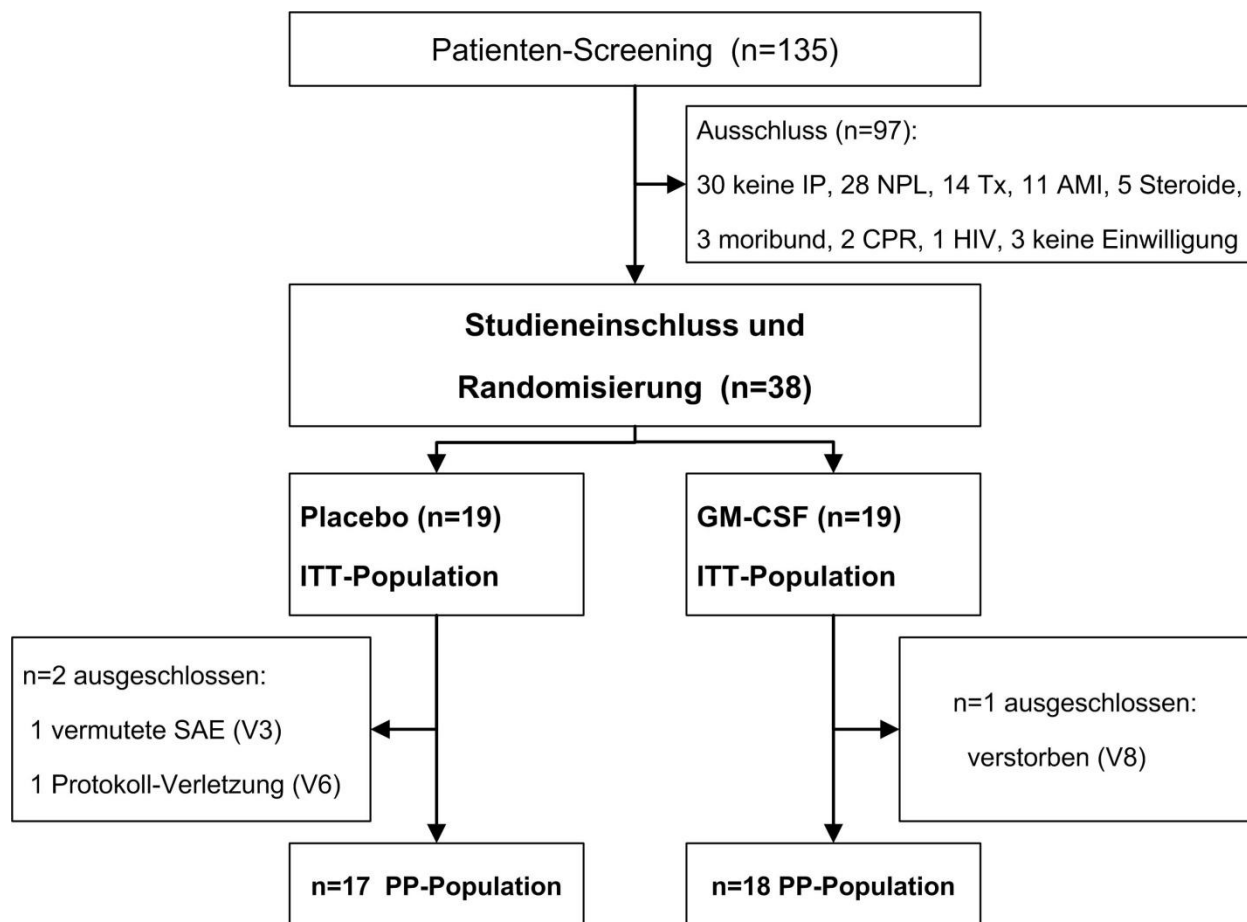


Abbildung 8: Fluss-Diagramm der Patienten-Allokation und -Randomisierung der Studien-Gruppen. IP=Immunparalyse, NPL=Neoplasie, Tx=Transplantation, AMI=akuter Myokardinfarkt, CPR=Kardio-pulmonale Reanimation, ITT=intention-to-treat, PP=per-protocol. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

4.3 Haupthypothese: Monozytäre HLA-DR-Expression

Die monozytäre HLA-DR-Expression als Ausdruck der Immunkompetenz galt sowohl als Einschlusskriterium (Immunparalyse bei <8.000 HLA-DR-Moleküle/CD14⁺-Monozyt) wie auch als primärer Endpunkt (Erholung von der Immunparalyse bei ≥ 15.000 HLA-DR-Moleküle/CD14⁺-Monozyt) der vorliegenden Studie. Der Parameter wurde an den Visiten V1 bis V9 täglich bestimmt (siehe Kapitel 3.2.5.2.).

Die Gesamtpopulation zeigte zu Studienbeginn an V1 eine dem Zustand der Immunparalyse entsprechende deutliche Suppression der HLA-DR-Expression, wobei zwischen den beiden Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied bestand (GM-CSF: Mittelwert 5659 mAb/Zelle, Standardabweichung +/- 3332. Placebo: Mittelwert 5609 mAb/Zelle;

4 Ergebnisse

Standardabweichung +/- 3628. Mann-Whitney-U (MWU); $p= 0.986$).

Im Studienverlauf zeigte sich erstmalig an Visite 2 (24 h nach der erstmaligen Präparat-Gabe an Visite 1) in der GM-CSF-Gruppe gegenüber der Placebo-Kontrolle ein hoch signifikanter Anstieg der mittleren HLA-DR-Expression (MWU; $p< 0.001$).

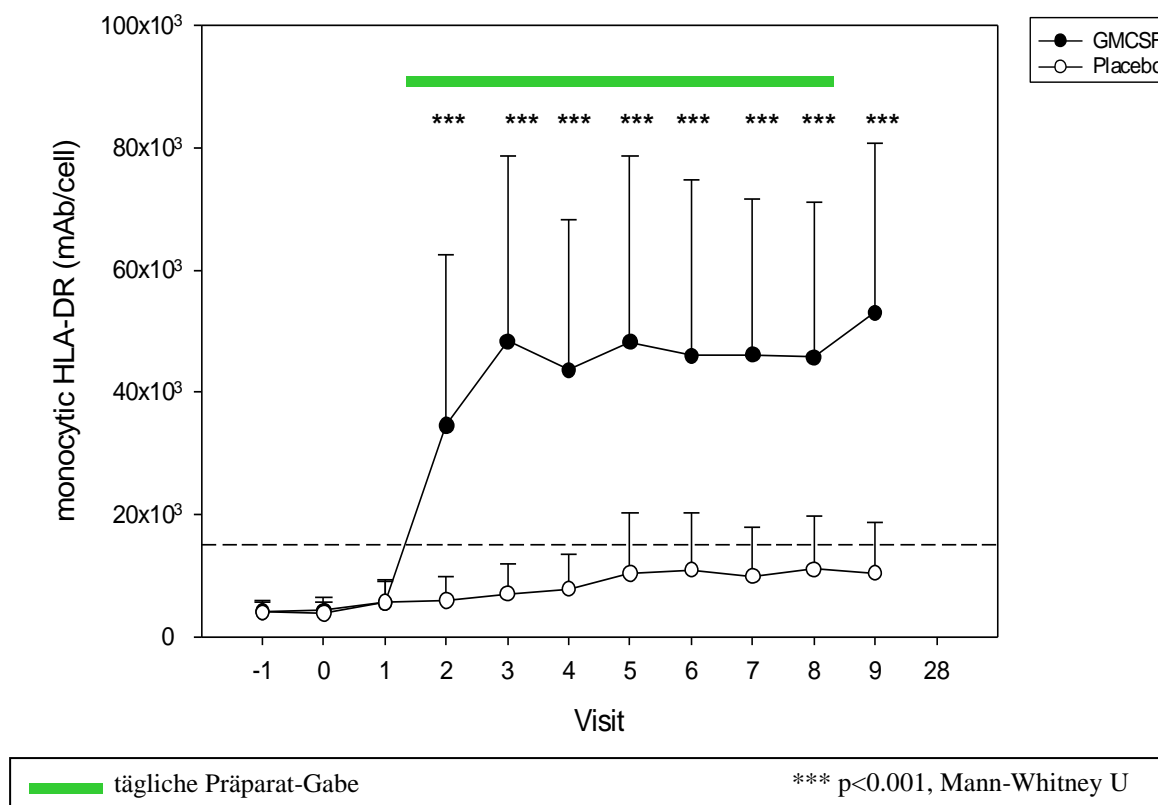


Abbildung 9: Zeitlicher Verlauf der monozytären HLA-DR-Expression (geometrischer Mittelwert) in beiden Studiengruppen vor (V-1 und 0) und nach (V1 bis V8) täglicher Gabe von 4 bzw. 8 μ g/kg/d rhuGM-CSF und Placebo. Referenzbereich >15000 mAb/Zelle. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

Dieser Effekt war stabil während des gesamten Behandlungszeitraums. An Visite 5 (GM-CSF: 43676 +/-24517 mAb/Zelle. Placebo: 7814 +/-5787 mAb/Zelle. MWU; $p< 0.001$) und an Visite 9 (GM-CSF: 50907 +/-28568 mAb/Zelle. Placebo: 10426 +/-8424 mAb/Zelle. MWU; $p< 0.001$) konnte in der GM-CSF-Gruppe gegenüber der Placebo-Kontrolle ein hoch signifikanter Anstieg der mittleren HLA-DR-Expression nachgewiesen werden.

Am Ende der Nachbeobachtungsphase (V28) wurden bei den kontrollierten Patienten (Placebo: $n= 7$, GM-CSF: $n= 6$) sowohl in der GM-CSF- als auch in der Placebo-Gruppe Werte der HLA-DR-Expression im Normbereich gemessen; allerdings unterlagen diese Werten einer hohen Standardabweichung (GM-CSF: 20106 +/-13208 mAb/Zelle; Placebo: 20877 +/- 10511 mAb/Zelle. MWU; $p> 0.05$).

Die graphische Darstellung des HLA-DR-Verlaufs beider Studiengruppen zeigt Abb. 9.

4 Ergebnisse

Nur zwei Patienten der GM-CSF-Gruppe erreichten an Visite 5 keine Erholung aus der Immunparalyse auf ≥ 15.000 HLA-DR-Moleküle/CD14⁺-Monozyt. Daraufhin erfuhren sie laut Studienprotokoll eine Dosisescalation des Präparates auf 8 μ g/kg/d und erreichten damit eine Normalisierung der HLA-DR-Expression. In der Placebo-Gruppe normalisierte sich die HLA-DR-Expression während des Behandlungsintervalls nur in drei von 19 Patienten (MWU; $p < 0.001$).

4.4 Sekundärhypothese: LPS induzierte TNF- α -Produktion

Die monozytäre TNF- α -Produktion als funktioneller Parameter der Monozyten-Kompetenz wurde an den Visiten V1 bis V9 täglich mittels eines etablierten Standardtestverfahrens gemessen (siehe Kapitel 3.2.7).

Bei erstmaliger Messung an V1 zeigte sich in der Gesamtpopulation eine Suppression (Referenzbereich des Instituts für Medizinische Immunologie: ≥ 300 pg/ml) der TNF- α -Produktion (224,69 +/- 186.56 pg/ml), wobei sich zwischen den beiden Behandlungsgruppen kein signifikanter Unterschied fand (Placebo: 226.06 pg/ml +/- 200.91 pg/ml. GM-CSF: 223.39 +/- 177.42 pg/ml. MWU; $p = 0.685$).

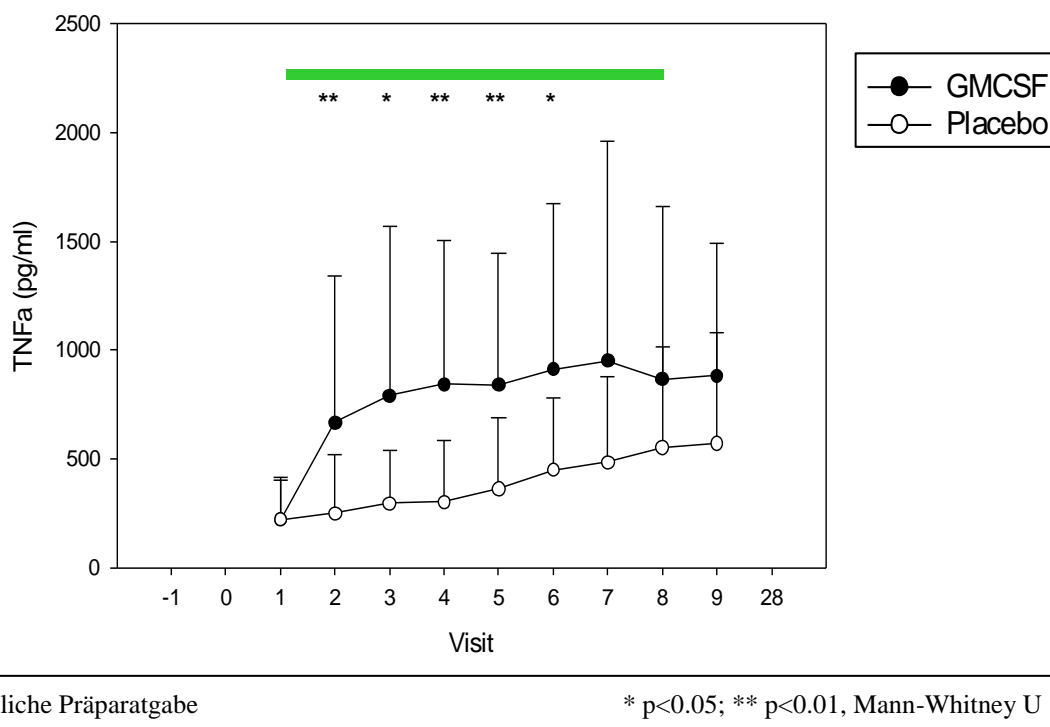


Abbildung 10: Zeitlicher Verlauf der LPS-induzierten monozytären TNF- α -Produktion in beiden Studiengruppen. Referenzbereich ≥ 300 pg/ml. Applikationsmodus von GM-CSF, siehe Abb. 9. Nach Meisel, 2009.¹¹⁵

4 Ergebnisse

Die graphische Darstellung des Verlaufs der TNF- α -Produktion beider Studiengruppen zeigt Abb. 10. Im Studienverlauf zeigte sich erstmalig an Visite 2 (24 h nach der erstmaligen Präparat-Gabe an Visite 1) in der GM-CSF-Gruppe gegenüber der Placebo-Kontrolle ein signifikanter Anstieg der TNF- α -Produktion (MWU; $p < 0.01$), diese signifikanten Unterschiede waren bis einschließlich Visite 6 (MWU; $p < 0.05$), also während der ersten 5 Tage unter Therapie, zu beobachten.

4.5 Veränderungen im Differentialblutbild

Die Bestimmung des Differentialblutbildes wurde täglich durch das Routine-Labor des Instituts für Medizinische Immunologie durchgeführt.

An V1 zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl neutrophiler Granulozyten beider Behandlungsgruppen (Placebo: 10.55 +/- 3.91 Gpt/l; GM-CSF: 14.92 +/- 5.56 Gpt/l).

Nach Therapiebeginn ließen sich vor allem bei neutrophilen Granulozyten und Monozyten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen feststellen.

4.5.1 Neutrophile Granulozyten

Der unter GM-CSF-Therapie bereits 24 Stunden nach der Erstdosis nachweisbare Anstieg der Zahl der neutrophilen Granulozyten auf einen Mittelwert von 18.02 +/- 9.12 Gpt/l (Placebo: 9.74 +/- 3.67 Gpt/l) fand sich bereits an V2 und ließ sich während des gesamten Behandlungszeitraums konstatieren (siehe Abb. 11); das Signifikanzniveau war an V2 $p < 0.01$, von V3 bis V9 (MWU; $p < 0.001$).

4 Ergebnisse

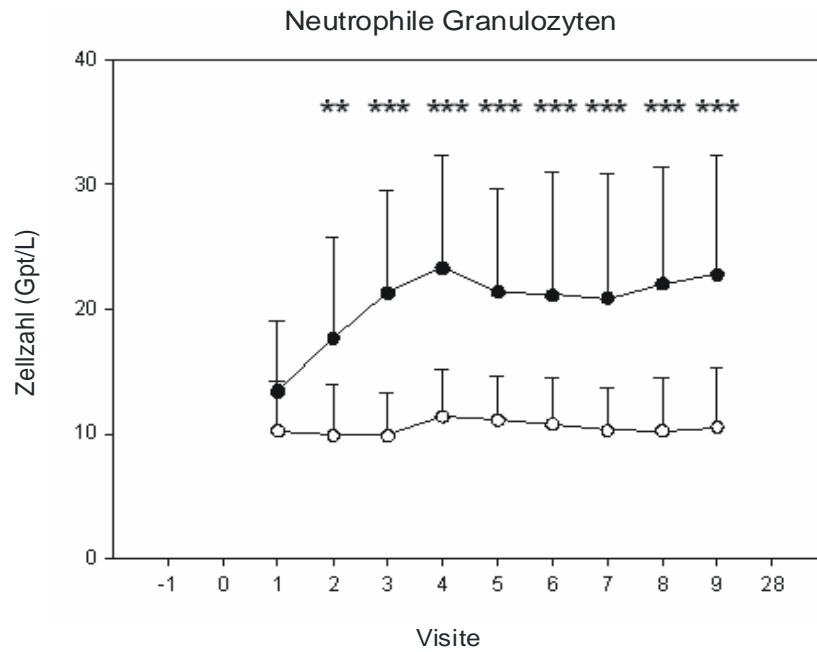


Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der Population neutrophiler Granulozyten an V1 bis V9 in beiden Studiengruppen. -○- Placebo, -●- GM-CSF. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, MWU -Test. Referenzbereich 3.0-6.5 Gpt/l. Applikationsmodus GM-CSF, siehe Abb. 9. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

4.5.2 Monozyten

Auch Monozyten (siehe Abb. 12) stiegen erwartungsgemäß in der GM-CSF-Gruppe im

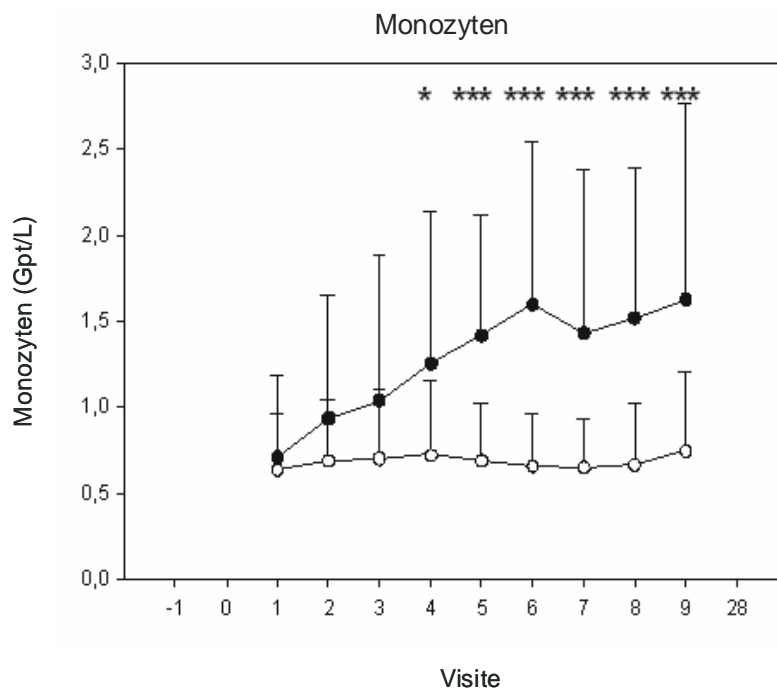


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf der Monozyten an V1 bis V9 in beiden Studiengruppen. -○- Placebo, -●- GM-CSF. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$, MWU-Test. Referenzbereich 0-0.5 Gpt/l. Applikationsmodus GM-CSF, siehe Abb. 9. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

4 Ergebnisse

Vergleich zur Placebo-Gruppe an. Beginnend an V4 war dieser Trend signifikant bis zum Ende des Behandlungszeitraums. An V4 lag die Monozytenkonzentration der GM-CSF-Gruppe bei einem Mittelwert von 1.05 +/- 0.43 Gpt/l, in der Placebo-Gruppe bei 0.70 +/- 0.20 Gpt/l.

4.5.3 Lymphozyten

Bei Studienbeginn an Visite V1 wurde in beiden Behandlungsgruppen – bei einer gültigen Normgrenzwert von >1.1 Gpt/l – eine Lymphopenie beobachtet (GM-CSF-Gruppe 0.82 +/- 0.62 Gpt/l und Placebo-Gruppe 0.64 +/- 0.44 Gpt/l; $p > 0.05$).

4.5.3.1 T-Lymphozyten

T-Lymphozyten (siehe Abb. 13) der GM-CSF-Gruppe zeigten während der Visiten V2 bis V7 einen tendenziellen Anstieg im Vergleich zu einer persistierenden ausgeprägten T-Lymphopenie in der Placebo-Gruppe. An den beiden letzten Visitentagen V8 und V9 unter GM-CSF-Therapie erreichte der Unterschied beider Behandlungsgruppen Signifikanzniveau ($p < 0.05$; MWU-Test). In beiden Gruppen blieben die Zellzahlen, mit Ausnahme der GM-CSF-Gruppe am letzten Studientag V9, unterhalb des unteren Normwertes.

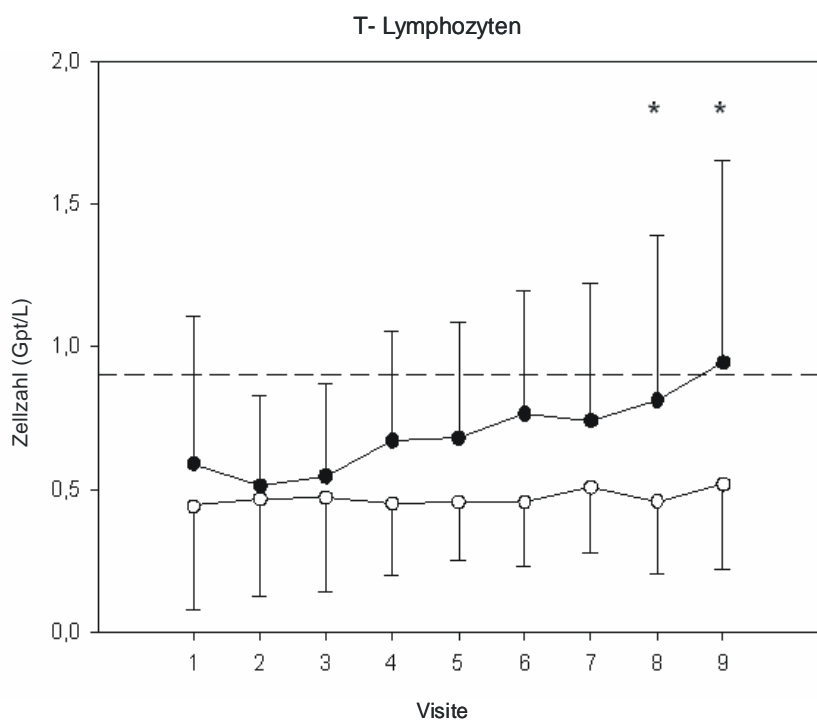


Abbildung 13: Zeitlicher Verlauf der T-Lymphozyten-Population an V1 bis V9 in beiden Studiengruppen. - - - unterer Normwert; -○- Placebo; -●- GM-CSF; * $p < 0.05$, MWU-Test. Applikationsmodus GM-CSF, siehe Abb. 9. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

4.5.3.1.1 CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten

Ähnliches gilt für die Subpopulationen CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten (siehe Abb. 14 und Abb. 15). Bei auch hier im Zeitverlauf nahezu konstanten Zellzahlen innerhalb der Placebo-

4 Ergebnisse

Gruppe finden sich aber signifikante Anstiege der jeweiligen Populationen in der Verum-Gruppe ($p < 0.05$, MWU-Test).

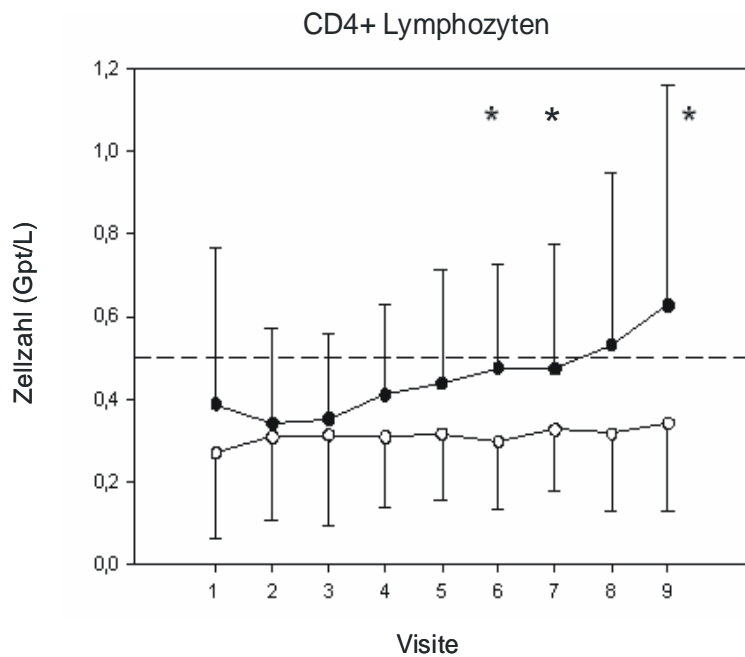


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der CD4⁺-T-Lymphozyten an V1 bis V9 in beiden Studiengruppen. - - - unterer Normwert; -○- Placebo; -●-GM-CSF; * $p < 0.05$, MWU-Test. Applikationsmodus GM-CSF, siehe Abb. 9. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

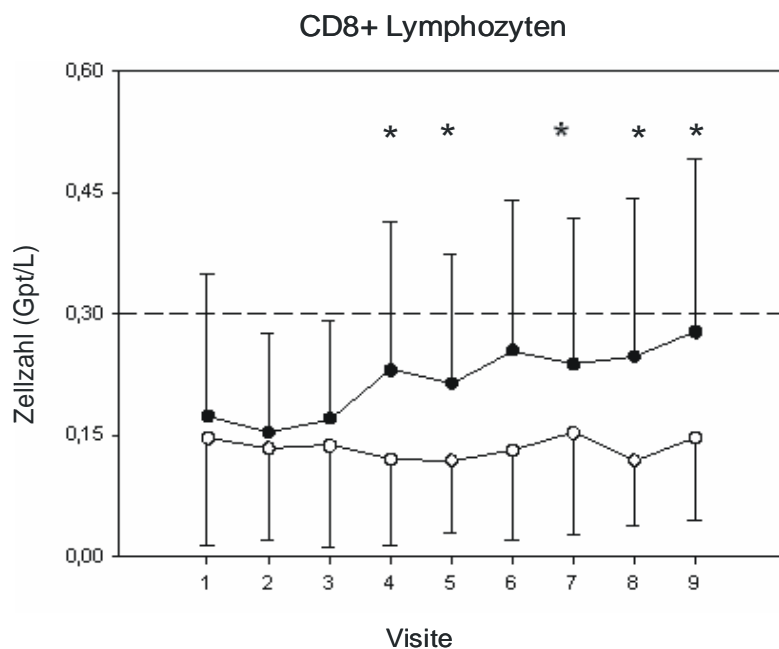


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der CD8⁺-T-Lymphozyten an V1 bis V9 in beiden Studiengruppen. - - - unterer Normwert; -○- Placebo; -●-GM-CSF; * $p < 0.05$, MWU-Test. Applikationsmodus GM-CSF, siehe Figur Abb. 9. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

Im Hinblick auf Absolutwerte wurde in der GM-CSF-Gruppe eine Normalisierung der

4 Ergebnisse

Lymphozytenzahl festgestellt; CD4⁺-Lymphozyten erreichten normale Zellzahlen gegen Ende der Beobachtungsperiode (ab V8); CD8⁺-Lymphozyten zeigten eine deutliche Erholung unter GM-CSF, auch wenn normale Zellzahlen nicht erreicht werden konnten.

Subpopulationen von T-Lymphozyten

Die Untersuchungen zum Verhalten weiterer T-lymphozytärer Subpopulationen unter GM-CSF-Therapie waren Gegenstand einer anderen Arbeit und werden daher hier nicht dargestellt.

4.5.3.2 B-Lymphozyten und NK-Zellen

Im Vergleich zu den bei Studienbeginn deutlich reduzierten Frequenzen der T-Lymphozyten fanden sich bei Studienbeginn in beiden Behandlungsgruppen normale Frequenzen für CD19⁺-B-Lymphozyten (Normwert: 0.1-0.4 Gpt/l. GM-CSF-Gruppe: 0.14 +/- 0.14 Gpt/l, Placebo-Gruppe: 0.12 +/- 0.06 Gpt/l; $p > 0.05$). Auch die Frequenzen von NK-Zellen lagen in beiden Studiengruppen bei Studienbeginn nur knapp unter dem Normwert (Normwert: 0.1-0.4 Gpt/l. GM-CSF-Gruppe: 0.09 +/- 0.07 Gpt/l, Placebo-Gruppe: 0.07 +/- 0.06 Gpt/l; $p > 0.05$).

Weder für B-Lymphozyten (siehe Abb. 16) noch für NK-Zellen (siehe Abb. 17) fanden sich unter GM-CSF-Therapie signifikante Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

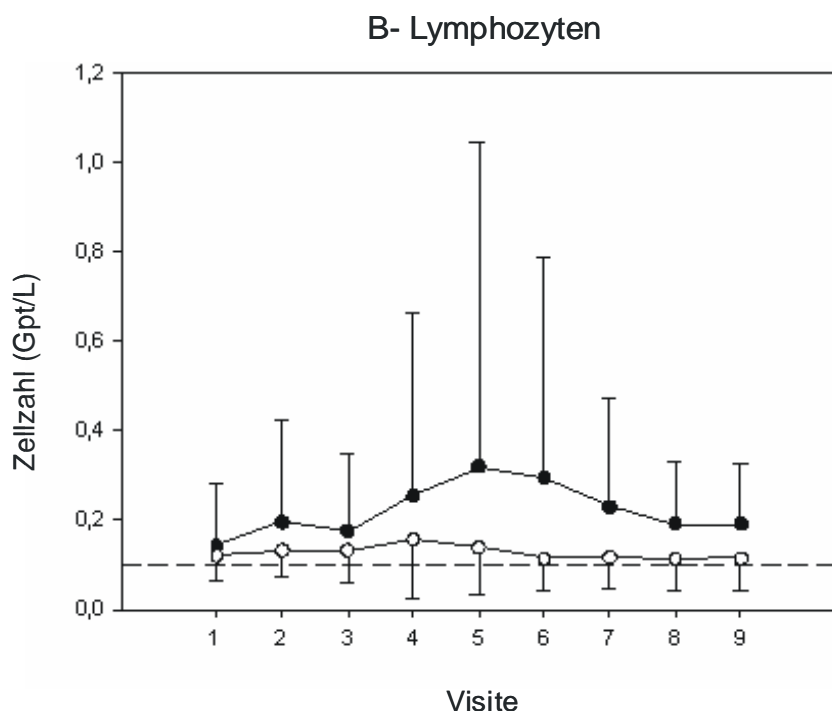


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der B-Lymphozyten an V1 bis V9 in beiden Studiengruppen. Kein signifikanter Unterschied der Zellzahl. - - - unterer Normwert; -○- Placebo; -●- GM-CSF; $p > 0.5$, MWU-Test. Applikationsmodus GM-CSF, siehe Abb. 9. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

4 Ergebnisse

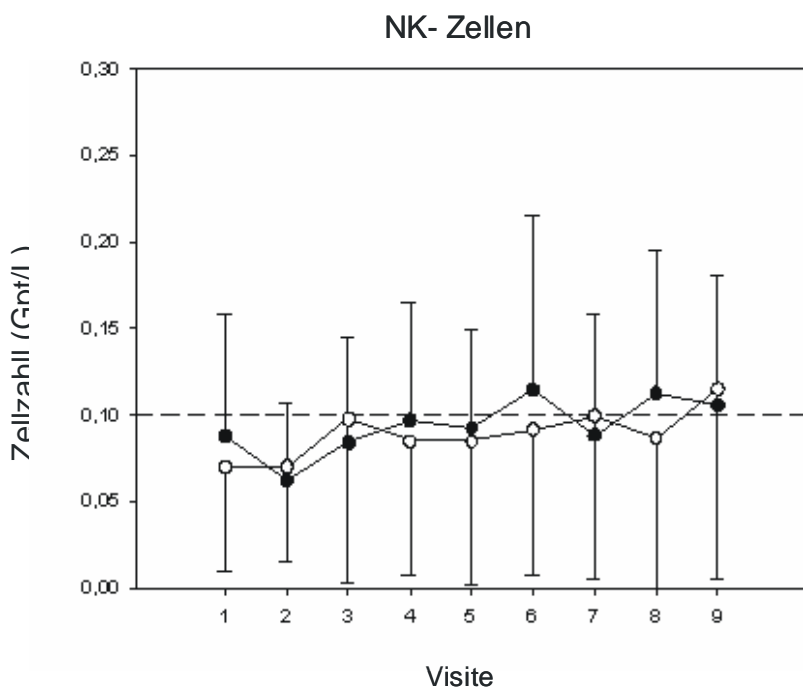


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Natürlichen Killer (NK)-Zellen an V1 bis V9 in beiden Studiengruppen. Kein signifikanter Unterschied der Zellzahl. - - - unterer Normwert; -○- Placebo -●- GM-CSF; $p > 0.05$, MWU-Test. Applikationsmodus GM-CSF, siehe Abb. 9. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

4.5.4 Thrombozyten

Die Höhe der Thrombozytenzahl in beiden Studiengruppen unterschied sich weder zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses an V1 (Placebo: Mittelwert 167.9/nl \pm 109.8; GM-CSF: 235.0/nl \pm 132.8; $p > 0.5$) noch zu folgenden Zeitpunkten; Graphik nicht gezeigt. Der Referenzbereich unseres Labors liegt bei 150-400 /nl.

4.6 Zirkulierende inflammatorische Mediatoren

Lösliche Mediatoren wie Interleukin (IL)-6, IL-10, TNF- α , PCT und GM-CSF werden in der Sepsisdiagnostik als Surrogatparameter der systemischen Entzündungsreaktion verwendet. Quantitative Untersuchungen dieser inflammatorischen Mediatoren haben zeigen können, dass ihre Plasmaspiegel prognostischen Charakter in der Sepsis haben (siehe Kapitel 5.3).

Die genannten Parameter wurden täglich gemessen. Die Messergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.

4 Ergebnisse

Tabelle 9: Plasmakonzentrationen von GM-CSF und inflammatorischen Mediatoren in beiden Behandlungsgruppen im Verlauf. Zwischengruppen-Analyse realisiert mit MWU-Test; Innergruppen-Analyse mit ANOVA. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

	Referenzbereich	Gruppe	Visite 1	Visite 5	Visite 9	Zwischen-Gruppen			p-Wert V1 vs V9
						p-Wert			
						V1	V5	V9	
						ns	ns	ns	
IL-6 (pg/ml)	<5	GMCSF	147.2±256.5	87.4±164.5	263.6±240.7				ns
		Placebo	78.6±144.9	116.8±230.9	190.3±339.0				ns
						ns	ns	ns	
IL-10 (pg/ml)	<5	GMCSF	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
						ns	ns	ns	
TNF-α (pg/ml)	<10	GMCSF	12.7±4.4	11.6±5.8	20.9±13.5				p=0.02
		Placebo	22.3±22.2	18.3±15.2	22.0±16.7				ns
						ns	ns	ns	
PCT (µg/l)	<0.5	GMCSF	17.3±43.8	5.3±14.2	5.2±2.1				(p=0.13)
		Placebo	8.7±18.2	3.1±6.0	4.4±9.4				ns
						ns	p=	p=	
							0.05	0.03	
GMCSF (pg/ml)	<2.5	GMCSF	2.1±2.2	40.3±77.1	25.5±62.9				(p=0.12)
		Placebo	2.1±2.0	1.9±2.4	1.8±1.4				ns

4.6.1 Messung von IL-6 im Plasma

An V1 zeigten sich für IL-6 tendenziell höhere Plasmaspiegel in der GM-CSF-Gruppe, die Ausgangswerte unterschieden sich jedoch statistisch nicht signifikant zur Placebo-Gruppe. Auch im Verlauf fanden sich keine signifikanten Unterschiede für IL-6 zwischen beiden Gruppen (siehe Tabelle 9).

4.6.2 Messung von IL-10 im Plasma

Bei erstmaliger Messung an V1 zeigten sich auch für die Plasmalevel des anti-inflammatorischen IL-10 tendenziell höhere Ausgangswerte in der GM-CSF-Gruppe (siehe Tabelle 9), die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch im Verlauf nicht signifikant.

4.6.3 Messung von Procalcitonin (PCT) im Plasma

Bei erstmaliger Messung an V1 zeigten sich für die Plasmalevel von PCT ebenfalls tendenziell höhere Ausgangswerte in der GM-CSF-Gruppe (GM-CSF-Gruppe: 17.3 ± 43.8 µg/l vs. 8.7 ± 18.2 µg/l in Placebo-Gruppe, $p > 0.05$). Im Studienverlauf ergab sich in beiden Gruppen ein Abfall der PCT-Spiegel, der allerdings in der GM-CSF-Gruppe stärker ausgeprägt war; siehe Tabelle 9.

4.6.4 Messung von TNF- α im Plasma

Während sich innerhalb der GM-CSF-Gruppe im Verlauf der Immuntherapie ein moderater Anstieg der gemessenen TNF- α -Spiegel feststellen ließ (V1 vs. V9; $p = 0.02$), zeigte der Verlauf in der Placebo-Gruppe keine Änderung der Höhe der Plasmaspiegel (siehe Tabelle 9). Allerdings fand sich nach Therapie-Ende an Visite 9 kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Studiengruppen (MWU-Test; $p > 0.05$). Einschränkend muss hier erwähnt werden, dass bereits bei Messung an V1 nicht-signifikant höhere Ausgangswerte für TNF- α in der Placebo-Gruppe gemessen wurden (Placebo: 22.3 ± 22.2 pg/ml vs. GM-CSF: 12.7 ± 4.4 pg/ml).

4.6.5 Messung von GM-CSF im Plasma

Zu Studienbeginn wurden in beiden Behandlungsgruppen identische Werte für Plasmaspiegel des Wachstumsfaktors GM-CSF gemessen. Erwartungsgemäß kam es innerhalb der GM-CSF-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der GM-CSF-Plasmaspiegel unter Therapie bis zu Visite 5 (Ausgangswert V1: 2.1 ± 2.2 pg/ml vs. V5: 40.3 ± 77.1 pg/ml; $p < 0.04$); in der Placebo-Gruppe (Ausgangswert V1: 2.1 ± 2.0 pg/ml) ergab sich kein Unterschied in der Höhe der Plasmaspiegel während der Behandlungsperiode.

4.7 Phänotypische Charakterisierung Antigen-präsentierender Zellen (APC)

Neben der täglichen Bestimmung und Auswertung diagnostischer Routineparameter wurden an den Visiten 1, 5 und 9 durchflusszytometrisch verschiedene APC hinsichtlich ihrer Frequenz (angegeben als Zellen/µl bzw. Zellen/nl) und Expression von Oberflächenmolekülen (angegeben als *mean fluorescence intensity*, MFI) untersucht (siehe Kapitel 3.2.5.2 und 3.2.5.3).

Die Frequenzen folgender Zellpopulationen in Vollblut wurden im Zeitverlauf unter GM-CSF-Therapie vs. Placebo untersucht: Gesamt-Monozyten und die Subpopulationen der CD14⁺CD16⁺-doppelt positiven Monozyten und CD14⁺CD16⁻-Monozyten sowie myeloide und plasmazytoide dendritische Zellen (MDC und PDC). Jede dieser zur Gruppe der APC gehörenden Populationen wurde zudem auf die Expression von HLA-DR sowie der co-stimulatorischen Oberflächenmoleküle CD40 und CD86 im Zeitverlauf unter GM-CSF-Therapie untersucht.

4.7.1 Monozyten

Die Gesamt-Monozytenpopulation zeigte unter GM-CSF eine signifikante Zunahme gegenüber Placebo; vergleiche Kapitel 4.5.2 und Abb. 12.

Veränderungen in der Frequenz der CD14⁺CD16⁻ („klassischen“) Monozyten und CD14⁺CD16⁺-doppelt positiven („pro-inflammatorischen“) Monozyten werden im Folgenden dargestellt.

4.7.1.1 CD14⁺CD16⁻ („klassische“) Monozyten

Die Subpopulation CD14⁺CD16⁻-Monozyten zeigte unter GM-CSF eine signifikante Zunahme an Visite 5 gegenüber der Placebo-Gruppe (MWU; $p < 0.05$). Im Innergruppen-Vergleich an Visiten V5 (ANOVA; $p < 0.05$) und V9 ($p < 0.001$) wurde eine signifikant erhöhte Zellzahl gegenüber V1 innerhalb der GM-CSF Gruppe festgestellt; siehe Abb. 18 (A) und Tabelle 10.

Neben Messung der Zellzahl wurden die Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 sowie die Expression von HLA-DR als Parameter für funktionelle Aktivität detektiert. Für CD40 ergab sich unter GM-CSF-Therapie im Vergleich zu Placebo ein hoch signifikanter Anstieg der Expression an Visite 5 ($p = 0.001$), an Visite V9 wurde kein Signifikanzniveau erreicht. Im Innergruppen-Vergleich an Visiten V5 ($p < 0.001$) und V9 ($p < 0.001$) konnte eine deutlich signifikant erhöhte Expression gegenüber V1 innerhalb der GM-CSF-Gruppe festgestellt werden; siehe Abb. 18 (B) und Tabelle 10.

Auf die Expression von CD86 konnte ein signifikanter Effekt durch GM-CSF-Therapie an Visite V9 ($p < 0.05$) gegenüber Placebo nachgewiesen werden. Der Innergruppenvergleich an Visiten V5 und V9 gegenüber Visite V1 zeigte in beiden Behandlungsgruppen eine signifikante Erhöhung der CD86-Expression, das Signifikanzniveau lag für die GM-CSF-Gruppe in beiden Fällen über dem der Placebo-Gruppe ($p < 0.001$ für GM-CSF, $p < 0.05$ für Placebo); siehe Abb. 18 (C) und Tabelle 10.

Für HLA-DR zeigte sich unter GM-CSF-Therapie im Vergleich zu Placebo ein hoch signifikanter Anstieg der Expression während des Studienintervalls (Visite 5 und Visite 9; $p < 0.01$). Ebenso zeigte der Innergruppen-Vergleich an Visiten V5 ($p < 0.001$) und V9 ($p < 0.001$) eine signifikant erhöhte HLA-DR-Expression gegenüber V1 innerhalb der GM-CSF-Gruppe. In der Placebo-Gruppe zeigte sich im Studienverlauf an Visiten V5 und V9 eine geringfügige Tendenz zur Spontanerholung der HLA-DR-Expression, die jedoch deutlich unter den durch GM-CSF erreichten Werten lag und zudem im Innergruppen-Vergleich gegenüber V1 nicht signifikant war; siehe Abb. 18 (D) und Tabelle 10.

4 Ergebnisse

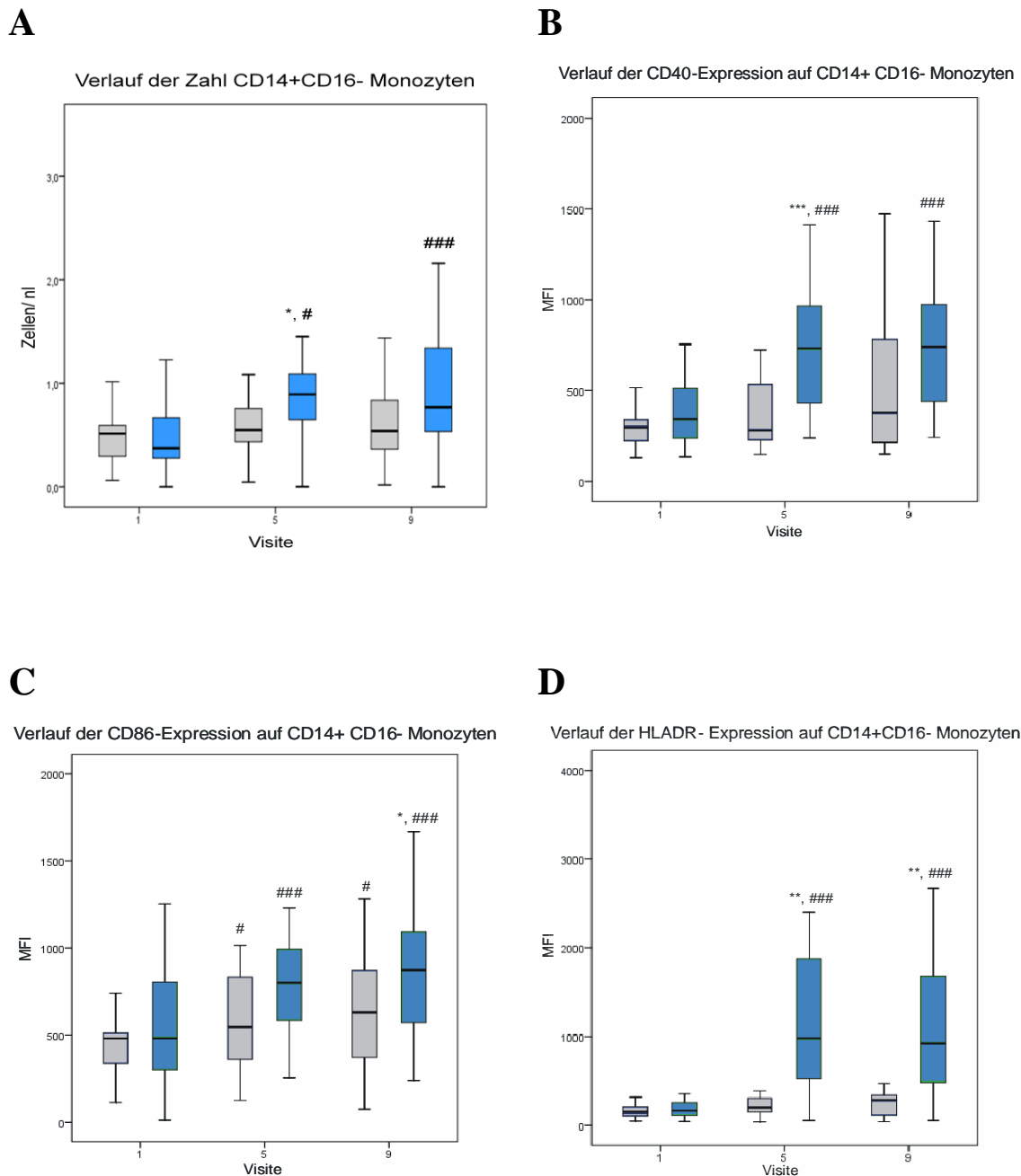


Abbildung 18 A-D: Zeitlicher Verlauf der Frequenz von CD14⁺CD16⁻-Monozyten und Expression co-stimulatorischer Moleküle in beiden Studiengruppen bei täglicher Gabe (V1 bis V8) von 4 bzw. 8 µg/kg/d GM-CSF oder Placebo. Ergebnis der durchflusszytometrischen Messungen an Visite 1, 5 und 9.

(A) Frequenz CD14⁺CD16⁻-Monozyten, (B) CD40-Expression, (C) CD86-Expression, (D) HLA-DR-Expression. Placebo (■), GM-CSF (■).

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 Zwischengruppen-Vergleich am jeweiligen Studientag; # p < 0.05, ## p < 0.01; ### p < 0.001 versus Visite 1 in der selben Gruppe.

4.7.1.2 Pro-inflammatorische CD14⁺CD16⁺-Monozyten

Verglichen mit den Frequenzen CD14⁺CD16⁻-Monozyten (siehe Kapitel 4.7.1.1) wurden zu Studienbeginn an Visite 1 für CD14⁺CD16⁺-Monozyten deutlich niedrigere Zellzahlen in beiden Studiengruppen ermittelt (Placebo: 0.03±0.03 Zellen/nl und GM-CSF: 0.04±0.03 Zellen/nl; p=0.61). Unter GM-CSF-Therapie konnte weder im Innergruppenvergleich gegenüber V1 noch

4 Ergebnisse

im Zwischengruppenvergleich gegenüber der Placebo-Gruppe eine Zunahme der Zellzahl festgestellt werden. Tatsächlich wurde in der Placebo-Gruppe an V9 eine Spontanerhöhung der Zellzahl von CD14⁺CD16⁺-Monozyten beobachtet, die gegenüber GM-CSF signifikant war ($p < 0.001$); siehe Abb. 19 (A) und Tabelle 10.

Neben der Messung der Zellzahl wurden weiterhin die Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 sowie die Expression von HLA-DR als Parameter für funktionelle Aktivierung ermittelt.

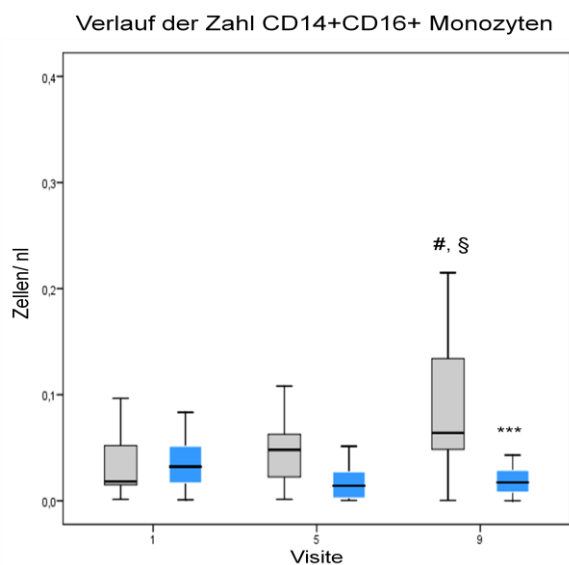
Für CD40 ergab sich unter GM-CSF-Therapie im Vergleich zu Placebo ein signifikanter Anstieg der Expression an Visite 5 ($p < 0.05$), an Visite V9 war dieser Unterschied nicht mehr signifikant. Im Innergruppen-Vergleich an Visiten V5 ($p < 0.001$) und V9 ($p < 0.01$) konnte hingegen eine signifikant erhöhte CD40-Expression gegenüber V1 innerhalb der GM-CSF-Gruppe festgestellt werden. Im Innergruppen-Vergleich zeigte sich für Placebo an Visiten V5 und V9 lediglich ein Trend zu einer erhöhten CD40-Expression gegenüber V1 ($p > 0.05$); siehe Abb. 19 (B) und Tabelle 10.

Auf die Expression von CD86 ließ sich kein signifikanter Effekt durch GM-CSF gegenüber Placebo zeigen ($p > 0.05$). Im Innergruppen-Vergleich zu den Ausgangswerten an Visite V1 zeigte sich über den Beobachtungszeitraum zu Visiten V5 und V9 in beiden Studiengruppen eine tendenzielle Erhöhung der Expression des Oberflächenmarkers ohne jedoch Signifikanzniveau zu erreichen ($p > 0.05$); siehe Abb. 19 (C) und Tabelle 10.

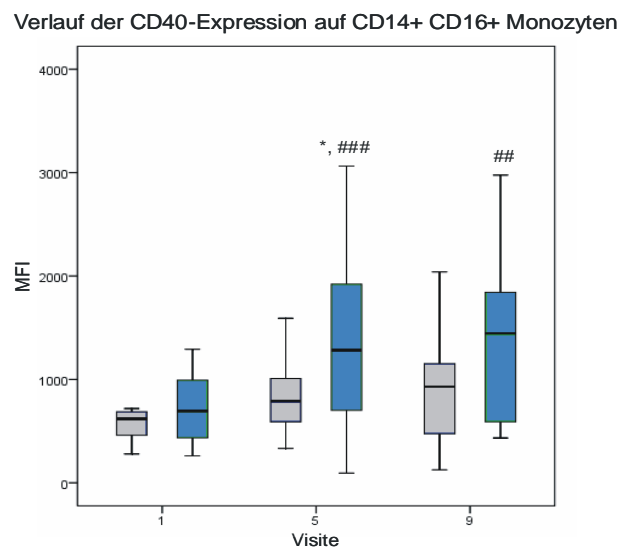
Für HLA-DR ergab sich unter GM-CSF-Therapie im Vergleich zu Placebo ein signifikanter Anstieg der Expression an Visite 5 (Placebo: 1397.24 ± 1018.49 MFI vs. GM-CSF: 3140.2 ± 2712.04 MFI; $p < 0.05$). Ebenso zeigte der Innergruppen-Vergleich an Visiten V5 ($p < 0.001$) und V9 ($p < 0.001$) eine deutlich signifikant erhöhte Zellzahl gegenüber V1 innerhalb der GM-CSF-Gruppe, während in der Placebo-Gruppe lediglich ein nicht signifikanter Trend zu einer Spontanerholung zu beobachten war ($p > 0.05$); siehe Abb. 19 (D) und Tabelle 10.

4 Ergebnisse

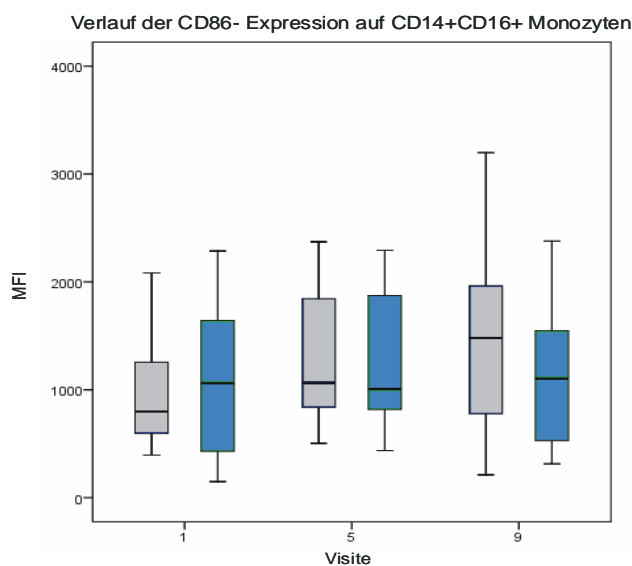
A



B



C



D

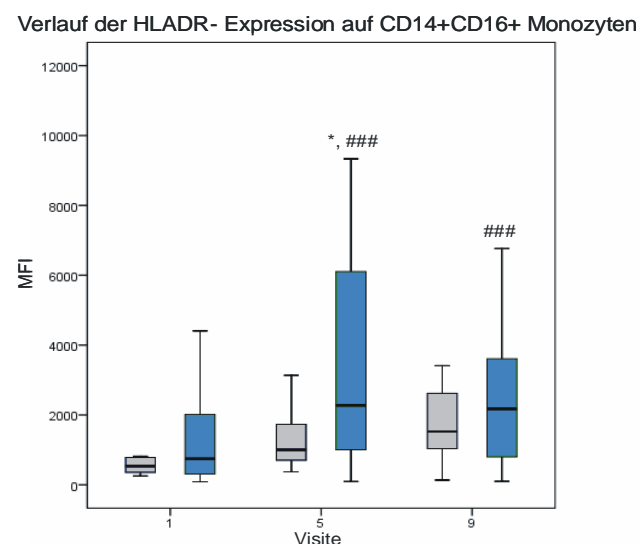


Abbildung 19 A-D: Zeitlicher Verlauf der Frequenz pro-inflammatorischer CD14⁺CD16⁺-Monozyten und Expression co-stimulatorischer Moleküle in beiden Studiengruppen bei täglicher Gabe (V1 bis V8) von 4 bzw. 8µg/kg/d GM-CSF oder Placebo.

Ergebnis der durchflusszytometrischen Messungen an Visiten 1, 5 und 9.

(A) Frequenz CD14⁺CD16⁺-Monozyten, (B) CD40-Expression, (C) CD86-Expression, (D) HLA-DR-Expression. Placebo (■), GM-CSF (■).

* p<0.05, Zwischengruppen-Vergleich am jeweiligen Studientag; # p<0.05, ## p<0.01; ### p<0.001 versus Visite 1 in derselben Gruppe; § p<0.05 versus Visite 5 in derselben Gruppe.

4.7.2 Dendritische Zellen (DC)

4.7.2.1 Myeloide CD33⁺-dendritische Zellen (MDC)

Die Subpopulation myeloider CD33⁺-DC zeigte zu Studienbeginn (Visite 1) zwischen den beiden Studiengruppen keine signifikanten Unterschiede (p=0.06).

4 Ergebnisse

Während des Studienintervalls an Visite 5 und 9 zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen. An Visite V9 ergab der Innergruppen-Vergleich gegenüber V1 eine signifikant erhöhte Zellzahl ($p < 0.05$) innerhalb der GM-CSF-Gruppe; dieser Effekt wurde in der Placebo-Gruppe nicht beobachtet, siehe Abb. 20 (A) und Tabelle 10.

Neben der Bestimmung der Zellzahl wurden weiterhin die Expression der co-stimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 sowie die Expression von HLA-DR als Parameter der APC-Funktionalität untersucht.

Für CD40 ergab sich unter GM-CSF-Therapie im Vergleich zu Placebo kein signifikanter Anstieg der Expression. Der Vergleich an verschiedenen Studientagen innerhalb der GM-CSF-Gruppe zeigte an Visite V5 ($p < 0.05$) eine signifikant erhöhte CD40-Expression gegenüber V1, dieser Effekt wurde in der Placebo-Gruppe nicht beobachtet; siehe Abb. 20 (B) und Tabelle 10.

Die Expression von CD86 zeigte sich bereits zu Studienbeginn an Visite V1 signifikant erhöht in der GM-CSF-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe ($p < 0.05$). An Visite 5 konnte eine Zunahme des Signifikanzniveaus ($p < 0.01$) festgestellt werden, der Unterschied in der Expression wurde auch an Visite V9 bestätigt ($p < 0.05$). Der Vergleich an verschiedenen Visiten zeigte an Visite V5 ($p < 0.05$) eine signifikant erhöhte Expression gegenüber V1 innerhalb der GM-CSF-Gruppe, während in der Placebo-Gruppe der Mittelwert der CD86-Expression über den Beobachtungszeitraum lediglich tendenziell zunahm, ohne aber Signifikanzniveau zu erreichen; siehe Abb. 20 (C) und Tabelle 10.

Für HLA-DR fand sich unter GM-CSF-Therapie im Vergleich zu Placebo ein signifikanter Anstieg der Expression an Visite 5 ($p < 0.05$). Der Vergleich an verschiedenen Studientagen ergab an Visite V9 eine signifikant erhöhte Expression von HLA-DR ($p < 0.05$) gegenüber V1 innerhalb der Placebo-Gruppe. Dieser Anstieg der mittleren HLA-DR-Expression an Visite V9 war nicht signifikant gegenüber der GM-CSF Gruppe; siehe Abb. 20 (D) und Tabelle 10.

4 Ergebnisse

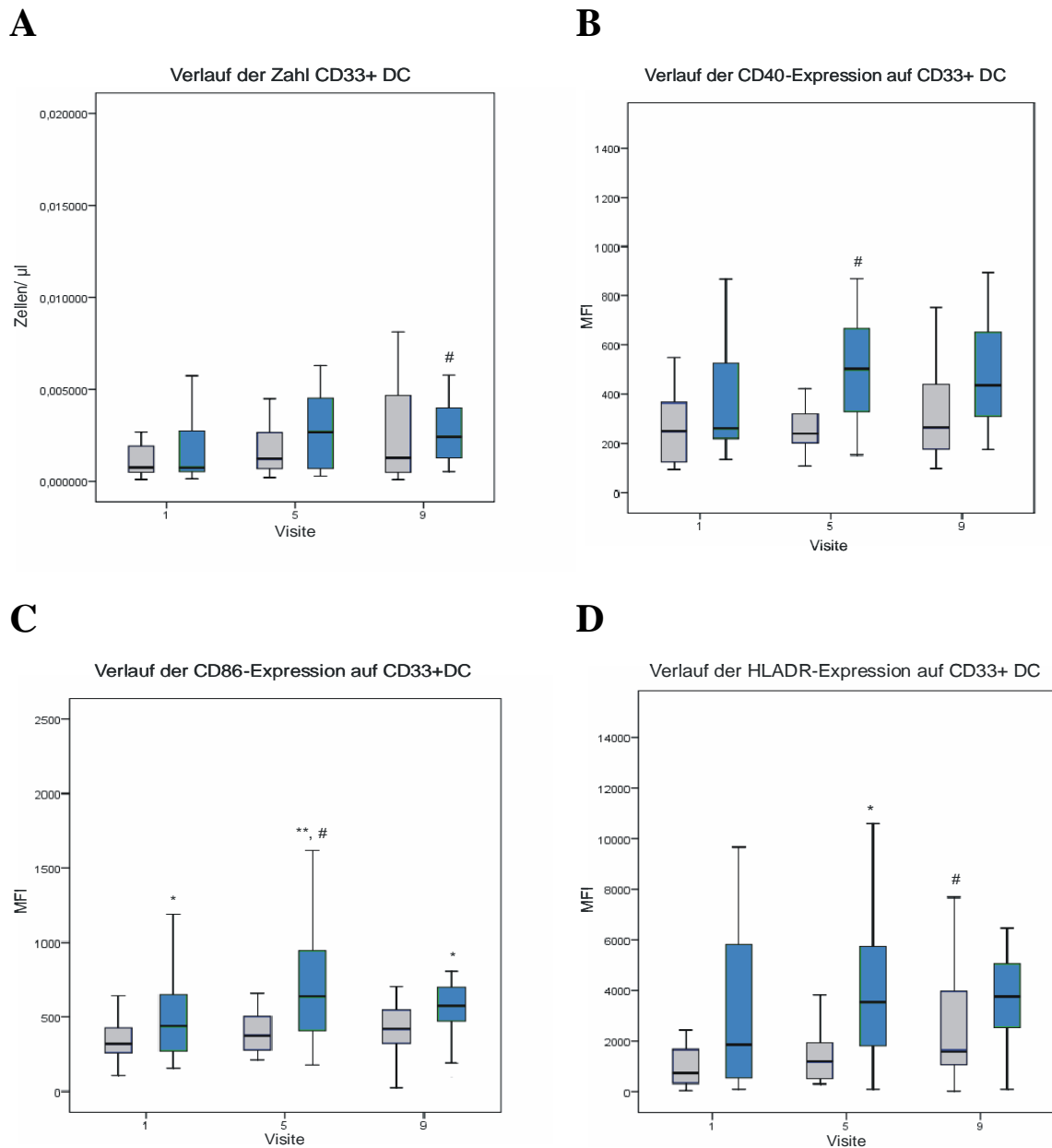


Abbildung 20 A-D: Zeitlicher Verlauf der Frequenz CD33⁺-myeloider dendritischer Zellen und Expression co-stimulatorischer Moleküle in beiden Studiengruppen bei täglicher Gabe (V1 bis V8) von 4 bzw. 8µg/kg/d GM-CSF oder Placebo. Ergebnis der durchflusszytometrischen Messungen an Visiten 1,5 und 9.

(A) Frequenz CD33⁺-myeloider DCs, (B) CD40-Expression, (C) CD86-Expression, (D) HLA-DR-Expression. Placebo (■), GM-CSF (■).

* p < 0.05, ** p < 0.01 Zwischengruppen-Vergleich am jeweiligen Studientag; # p < 0.05 versus Visite 1 in der selben Gruppe.

4.7.2.2 Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC)

Insgesamt konnten nur sehr geringe Zahlen von PDC im Vollblut detektiert werden („PDC-Zytopenie“). So lagen zu Studienbeginn an V1 die Frequenzen bei $2,0 \pm 2,0/\mu\text{l}$ in der GM-CSF-Gruppe und bei $1,0 \pm 2,0/\mu\text{l}$ in der Placebo-Gruppe. Hieraus ergibt sich eine Limitation in der Interpretation der beobachteten Ergebnisse.

Wenn sich auch keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz der PDC zwischen beiden

4 Ergebnisse

Behandlungsgruppen fanden ($p > 0.05$), lag doch während des gesamten Studienverlaufs die Zellzahl in der GM-CSF-Gruppe geringgradig über den in der Placebo-Gruppe gemessenen Werten. Der Innergruppen-Vergleich zeigte an Visite V5 und V9 eine signifikant erhöhte Zellzahl ($p < 0.01$) gegenüber V1 innerhalb der Placebo-Gruppe; siehe Abb. 21 (A) und Tabelle 10.

Für HLA-DR war unter GM-CSF-Therapie im Vergleich zu Placebo kein signifikanter Anstieg der Expression nachweisbar. Der Innergruppen-Vergleich zeigte an Visite V9 eine signifikant erhöhte Expression von HLA-DR ($p < 0.01$) gegenüber V5 innerhalb der GM-CSF-Gruppe; siehe Abb. 21 (B) und Tabelle 10.

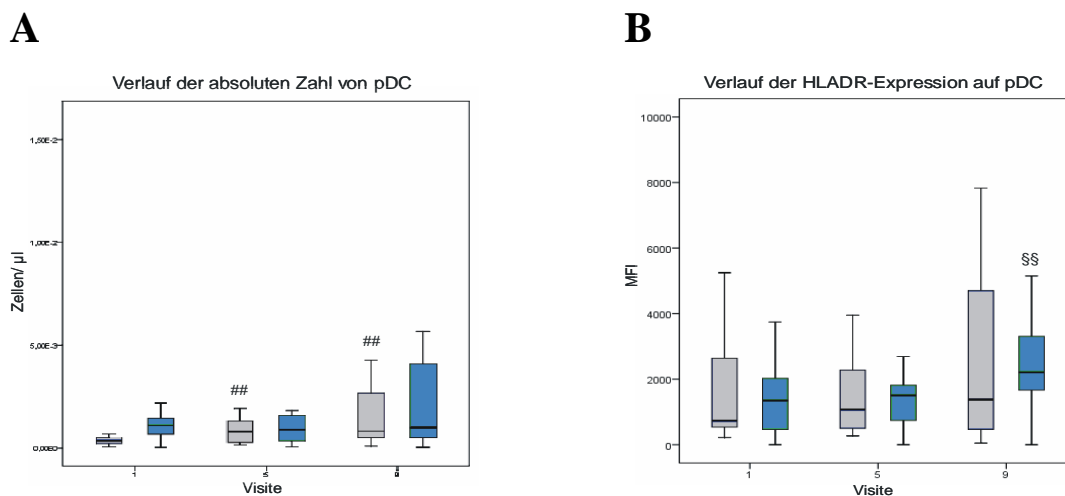


Abbildung 21 A-B: Zeitlicher Verlauf der Frequenz von pDC und HLA-DR-Expression in beiden Studiengruppen bei täglicher Gabe (V1 bis V8) von 4 bzw. 8 µg/kg/d GM-CSF oder Placebo. Ergebnis der durchflusszytometrischen Messungen an Visiten 1, 5 und 9.

(A) Frequenz plasmazytoider DCs, (B) HLA-DR-Expression. Placebo (■), GM-CSF (■).

$p < 0.01$ versus Visite 1 in der selben Gruppe; §§ $p < 0.01$ versus Visite 5 in der selben Gruppe.

Für CD40- und CD86-Expression ergaben sich während des Studienintervalls weder zwischen den Behandlungsgruppen noch in den Innergruppen-Vergleichen signifikante Unterschiede (alle $p > 0.05$, siehe Tabelle 10); Graphiken werden nicht gezeigt.

Tabelle 10: Frequenz Antigen-präsentierender Zellen (APC) und die Expression von Oberflächenmolekülen im Verlauf für beide Studiengruppen. Dargestellt als Zellen/ μ l bzw. Zellen/nl und geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz-Intensität (MFI). Signifikante p-Werte ($p < 0.05$) sind fett gedruckt hervorgehoben.

		Mittelwert \pm Standardabweichung			Zwischengruppen p-Wert			Innergruppen p-Wert			
		V1	V5	V9	V1	V5	V9	V1 vs V5	V1 vs V9	V5 vs V9	
<i>Monozyten</i>	Zellzahl	-	-	-	0.846	0.045	0.132	-	-	-	
	Placebo (/nl)	0.54 \pm 0.27	0.64 \pm 0.31	0.69 \pm 0.43	-	-	-	ns	ns	ns	
	GMCSF (/nl)	0.53 \pm 0.44	0.97 \pm 0.64	1.06 \pm 0.74	-	-	-	0.002	0.001	0.983	
<i>CD14⁺CD16⁻-Monozyten</i>	Zellzahl	-	-	-	0.849	0.047	0.055	-	-	-	
	Placebo (/nl)	0.49 \pm 0.25	0.58 \pm 0.27	0.59 \pm 0.41	-	-	-	ns	ns	ns	
	GMCSF (/nl)	0.49 \pm 0.42	0.91 \pm 0.66	1.04 \pm 0.73	-	-	-	0.011	0.001	0.879	
	CD40	-	-	-	0.248	0.001	0.083	-	-	-	
	Placebo (MFI)	304.59 \pm 135.73	368.59 \pm 194.87	539.94 \pm 415.32	-	-	-	ns	ns	ns	
	GMCSF (MFI)	378.83 \pm 190.83	717.17 \pm 324.98	757.28 \pm 342.18	-	-	-	0.001	0.000	0.0913	
	CD86	-	-	-	0.371	0.054	0.038	-	-	-	
	Placebo (MFI)	462.35 \pm 180.47	603.18 \pm 269.55	631.73 \pm 360.55	-	-	-	0.011	0.048	0.913	
	GMCSF (MFI)	569.51 \pm 377.80	882.06 \pm 512.62	879.89 \pm 373.47	-	-	-	0.001	0.001	0.647	
	HLA-DR	-	-	-	0.0728	0.003	0.004	-	-	-	
	Placebo (MFI)	273.11 \pm 458.3	410.61 \pm 606.41	362.94 \pm 432.21	-	-	-	ns	ns	Ns	
	GMCSF (MFI)	354.38 \pm 768.13	1267.38 \pm 978.24	1236.03 \pm 1137.22	-	-	-	0.000	0.000	0.948	
	<i>CD14⁺CD16⁺-Monozyten</i>	Zellzahl	-	-	-	0.896	0.931	0.001	-	-	-
		Placebo (/nl)	0.03 \pm 0.03	0.06 \pm 0.05	0.10 \pm 0.09	-	-	-	0.170	0.022	0.012
		GMCSF (/nl)	0.04 \pm 0.03	0.06 \pm 0.17	0.03 \pm 0.03	-	-	-	ns	ns	ns
CD40		-	-	-	0.785	0.016	0.059	-	-	-	
Placebo (MFI)		723.65 \pm 429.62	819.35 \pm 336.69	916.88 \pm 484.89	-	-	-	ns	ns	ns	
GMCSF (MFI)		707.83 \pm 329.81	1345.83 \pm 805.50	1351.94 \pm 789.06	-	-	-	0.001	0.002	0.845	
CD86		-	-	-	0.697	0.791	0.204	-	-	-	
Placebo (MFI)		974.94 \pm 485.96	1273.18 \pm 576.32	1425.29 \pm 807.48	-	-	-	ns	ns	ns	
GMCSF (MFI)		1126.56 \pm 718.85	1249.44 \pm 594.87	1130.39 \pm 647.93	-	-	-	ns	ns	ns	
HLA-DR		-	-	-	0.355	0.017	0.100	-	-	-	
Placebo (MFI)		796.41 \pm 758.13	1397.24 \pm 1018.49	1654.76 \pm 1021.09	-	-	-	Ns	ns	ns	
GMCSF (MFI)		1295.03 \pm 1289.65	3140.20 \pm 2712.04	2707.05 \pm 2473.17	-	-	-	0.001	0.000	0.145	

Tabelle 10, Fortsetzung:

		Mittelwert ± Standardabweichung			Zwischengruppen p-Wert			Innergruppen p-Wert		
		V1	V5	V9	V1	V5	V9	V1 vs V5	V1 vs V9	V5 vs V9
<i>Myeloide CD33⁺DC</i>	Zellzahl	-	-	-	0.064	0.117	0.427	-	-	-
	Placebo (/ μ l)	1.0 ± 0.8	2.0 ± 1.4	4.0 ± 5.0	-	-	-	Ns	ns	ns
	GMCSF (/ μ l)	3.0 ± 3.8	6.0 ± 10.0	5.0 ± 8.3	-	-	-	0.071	0.039	0.811
	CD40	-	-	-	0.147	0.70	0.133	-	-	-
	Placebo (MFI)	255.72 ± 140.51	338.82 ± 337.77	373.18 ± 293.00	-	-	-	Ns	ns	ns
	GMCSF (MFI)	425.89 ± 468.35	531.50 ± 293.70	563.17 ± 452.66	-	-	-	0.030	0.122	0.913
	CD86	-	-	-	0.039	0.004	0.028	-	-	-
	Placebo (MFI)	350.06 ± 148.96	395.41 ± 130.97	416.50 ± 186.74	-	-	-	Ns	ns	ns
	GMCSF (MFI)	536.67 ± 329.78	804.22 ± 533.63	654.89 ± 411.35	-	-	-	0.024	0.145	0.248
	HLA-DR	-	-	-	0.094	0.035	0.91	-	-	-
	Placebo (MFI)	1358.29 ± 1571.81	2041.88 ± 2337.27	2562.64 ± 2222.95	-	-	-	0.071	0.011	0.248
	GMCSF (MFI)	2837.05 ± 3250.73	3933.83 ± 2838.89	3793.94 ± 2365.32	-	-	-	Ns	ns	ns
<i>Plasmazytoide DC</i>	Zellzahl	-	-	-	0.243	0.464	0.790	-	-	-
	Placebo (/ μ l)	1.0 ± 2.0	1.0 ± 2.0	2.0 ± 3.0	-	-	-	0.006	0.002	0.157
	GMCSF (/ μ l)	2.0 ± 2.0	4.0 ± 9.0	2.0 ± 3.0	-	-	-	Ns	ns	ns
	CD40	-	-	-	0.426	0.485	0.257	-	-	-
	Placebo (MFI)	510.16 ± 470.88	641.12 ± 631.60	458.61 ± 310.16	-	-	-	Ns	ns	ns
	GMCSF (MFI)	655.17 ± 684.78	824.56 ± 1065.01	676.72 ± 770.96	-	-	-	Ns	ns	ns
	CD86	-	-	-	0.891	0.274	0.839	-	-	-
	Placebo (MFI)	494.24 ± 375.92	454.41 ± 317.25	377.77 ± 358.74	-	-	-	Ns	ns	ns
	GMCSF (MFI)	461.11 ± 373.35	678.11 ± 852.62	351.94 ± 181.94	-	-	-	Ns	ns	ns
	HLA-DR	-	-	-	0.696	0.707	0.783	-	-	-
	Placebo (MFI)	1981.0 ± 2200.15	1724.24 ± 1775.26	2262.95 ± 2323.68	-	-	-	Ns	ns	ns
	GMCSF (MFI)	1732.67 ± 1730.47	1568.63 ± 1346.15	2451.22 ± 1540.20	-	-	-	0.760	0.062	0.002

4.8 Funktionelle Charakterisierung Antigen-präsentierender Zellen (APC)

Zur Charakterisierung der Funktion von APC unter der Therapie mit GM-CSF wurden an den Visiten V1, V5 und V9 *ex vivo* Vollblut-Stimulationen in beiden Behandlungs-Gruppen durchgeführt (siehe 3.2.6). Als Stimulantien dienten hierbei bakterielle Produkte (PAMPs) als Aktivatoren der von APC exprimierten Toll-Like-Rezeptoren (TLR). Aufgrund des charakteristischen TLR-Expressionsmusters und Zytokin-Sekretionsrepertoires verschiedener Zell-Subsets kann auch im unseparierten Vollblut-System eine relativ spezifische Aussage über die Aktivierung der unterschiedlichen APC-Populationen erreicht werden. So führt beispielsweise die Aktivierung von TLR-9 mittels CpG-A-ODN in PDC, aber nicht in B-Lymphozyten zur Freisetzung von IL-8. Hingegen werden bei Stimulation von TLR-4 durch LPS oder aber TLR-2 durch Pam3Cys Zytokine sowohl von Monozyten als auch von MDC produziert; siehe Tabelle 2.

Die Vollblut-Stimulation erfolgte über 4 Stunden (mit LPS und Pam3Cys) bzw. über 24 Stunden (mit LPS, Pam3Cys, CpG-A-ODN). Entsprechend der Stimulationsdauer ergibt sich ein optimaler Zeitpunkt für die Messung „früher“ Zytokine (typischerweise TNF- α , IL6, IL8) nach 4h bzw. „später“ Zytokine (IL10) nach 24h.

Nach der Inkubation wurden in den Überständen die Konzentrationen der durch APC gebildeten Zytokine gemessen, um auf diese Weise Aussagen zur Funktion der APC in Sepsis-Patienten unter GM-CSF-Therapie treffen zu können.

4.8.1 Zytokin-Produktion durch Monozyten und MDC nach Stimulation mit Endotoxin/LPS (TLR-4)

In den an Visite V1 erstmalig durchgeführten Vollblutstimulationen – noch vor Beeinflussung durch GM-CSF oder Placebo-Gabe – zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen hinsichtlich der Produktion der gemessenen Zytokine (Abb 22).

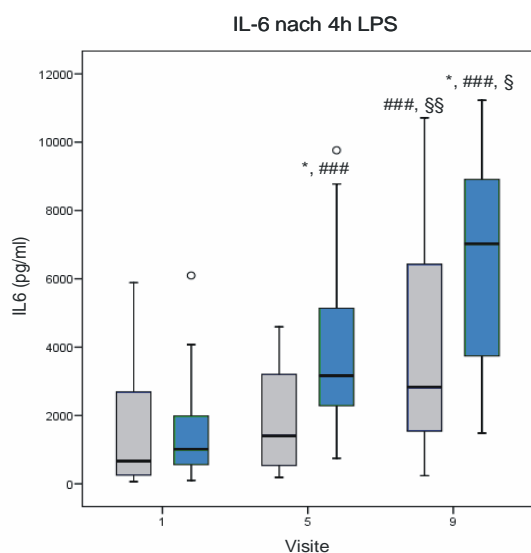
Als Surrogatparameter der Monozyten-und MDC-Funktion unter GM-CSF-Therapie dienten die nach Stimulation des auf Monozyten exprimierten TLR-4 durch Endotoxin/LPS gemessenen Konzentrationen sowohl der pro-inflammatorischen Zytokine (IL-6, IL-8, TNF- α , MIP1a [MIP=*macrophage inflammatory protein*]) als auch des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10. Weiterhin wurde die Konzentration des Chemokins MCP1 gemessen [MCP=*monocyte chemotactic protein*]; siehe Kapitel 3.2.8.2.

Für das pro-inflammatorische IL-6 ergab sich in der GM-CSF-Gruppe nach 4h Stimulation mit LPS gegenüber der Placebo-Gruppe eine deutlich höhere Produktion, die in der statistischen Analyse sowohl an Visite V5 ($p < 0.05$) als auch an V9 ($p < 0.05$) Signifikanzniveau erreichte;

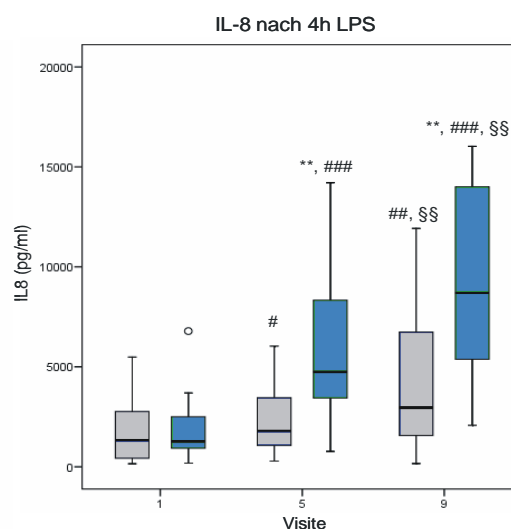
4 Ergebnisse

Abb. 22 (A). Ebenso war an Visiten V5 und V9 eine signifikant erhöhte IL-6-Produktion gegenüber V1 bzw. V5 innerhalb der GM-CSF-Gruppe zu beobachten. Für die Placebo-Gruppe konnte dies nur an Visite V9 beobachtet werden; siehe Abb. 22 (A).

A



B



C

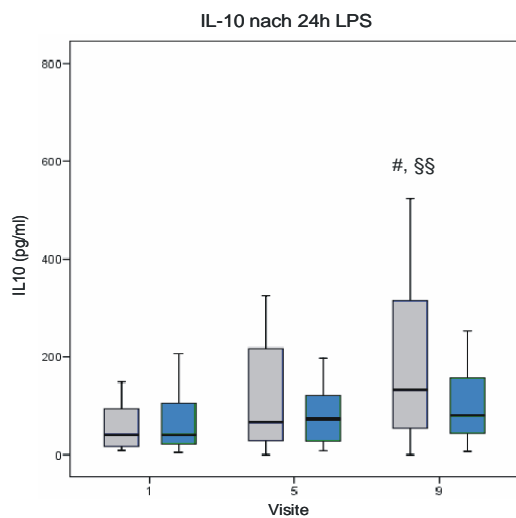


Abbildung 22 A-C: LPS-induzierte TLR-4-Rezeptor-Stimulation und monozytäre Zytokin-Produktion unter GM-CSF-Behandlung vs. Placebo für 8 Tage. Ergebnis der *ex vivo*-Vollblutstimulation mit LPS über 4 Stunden (und für IL-10 über 24 Stunden) jeweils an Visite 1, 5 und 9.

(A) IL-6, (B) IL-8, (C) IL-10. Placebo (■), GM-CSF (■).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ Zwischengruppen-Vergleich am jeweiligen Studientag; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ versus Visite 1 in der selben Gruppe; § $p < 0.05$, §§ $p < 0.01$ versus Visite 5 in der selben Gruppe. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

Noch deutlicher war der stimulatorische Effekt von GM-CSF – im Vergleich gegen Placebo – auf die IL-8 Produktion nach 4h LPS-Stimulation an den Visiten V5 ($p < 0.01$) und V9 ($p < 0.01$);

siehe Abb. 22 (B).

Weiterhin wurde an den Visiten V5 gegenüber V1 bzw. an den Visiten V9 gegenüber V5 eine signifikant erhöhte IL-8-Produktion innerhalb der GM-CSF-Gruppe beobachtet. Für die Placebo-Gruppe fand sich dies ebenfalls an den Visiten V5 und V9; siehe Abb. 22 (B). Auch hier war in der Stimulation über 24 Stunden kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Studienarmen festzustellen (Daten werden nicht gezeigt).

Im Gegensatz zum Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokin-Produktion (IL-6, IL-8) zeigte die Messung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 an den Visiten 5 und 9, nach Stimulation mit LPS über 24 Stunden, einen deutlichen Trend zu geringeren IL-10-Werten in der GM-CSF-Gruppe im Vergleich zu Placebo, allerdings ohne Signifikanz-Niveau zu erreichen; Abb. 22 (C). In der Placebo-Gruppe wurde an Visite V9 eine im Vergleich zu den Visiten V1 und V5 signifikant höhere IL-10-Produktion beobachtet; siehe Abb. 22 (C).

Für die weiterhin gemessenen Chemokine MIP1a und MCP1 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsarmen (Daten werden nicht dargestellt).

Eine Darstellung der Messergebnisse von TNF- α findet sich in Kapitel 4.4.

4.8.2 Zytokin-Produktion durch Monozyten und MDC nach Stimulation mit Pam3Cys (TLR-2)

Zur weiteren Charakterisierung der Funktion von Monozyten und MDC unter GM-CSF-Therapie wurden ebenfalls Vollblutstimulationen mit dem TLR-2 Liganden Pam3Cys durchgeführt. Dazu wurden wiederum die Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8, TNF- α , MIP1a und MCP1 sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (siehe Kapitel 3.2.8.3) nach 4h bzw. 24h Kultur gemessen. Aufgrund der sehr geringen Frequenzen der MDC ist, wie oben bereits ausgeführt, davon auszugehen, dass der Großteil der produzierten Zytokine von Monozyten stammt.

Nach 4h Stimulation mit Pam3Cys ergaben sich in der GM-CSF-Gruppe an Visite V5 für das pro-inflammatorische IL-6 signifikant höhere Werte im Vergleich zu Placebo ($p < 0.01$, Abb. 23 (A)). An Visite V9 war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar ($p > 0.05$).

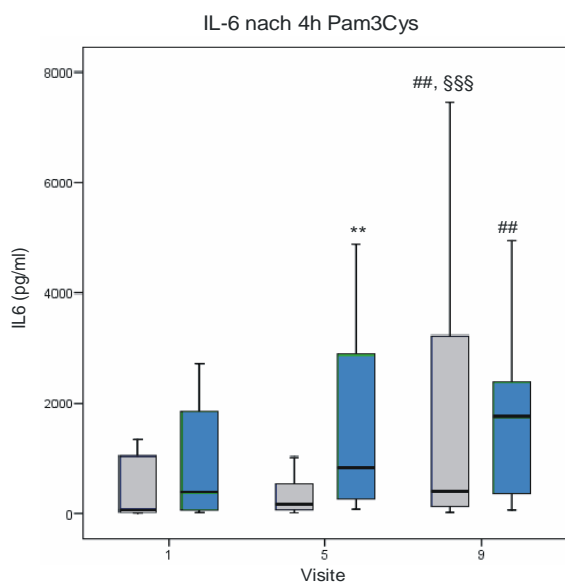
Ebenso war an Visite V9 gegenüber Visite V1 eine signifikant erhöhte IL-6-Produktion innerhalb der GM-CSF Gruppe zu beobachten ($p < 0.01$). Für die Placebo-Gruppe konnte eine Spontanerholung an Visite V9 gegenüber den Visiten V1 ($p < 0.01$) und V5 ($p < 0.001$) beobachtet werden; allerdings lag das IL-6-Niveau bei GM-CSF-Therapie deutlich über den in der Placebo-Gruppe gemessenen Werten; siehe Abb. 23 (A).

Bei IL-8 zeigte sich nach 4-stündiger Stimulation mit Pam3Cys an Visite V5 ein signifikanter Anstieg sowohl innerhalb der Verum-Gruppe im Vergleich zu Visite V1 ($p < 0.01$, Abb. 23 (B))

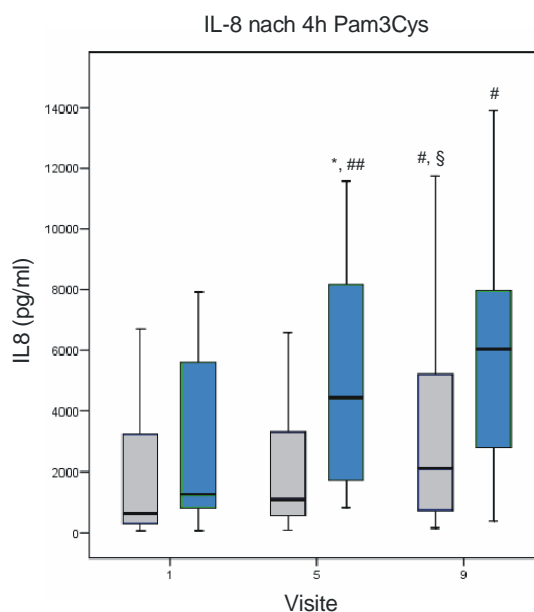
4 Ergebnisse

als auch ein signifikanter Unterschied zur Placebo-Gruppe ($p < 0.05$), der an Visite V9 allerdings nicht mehr bestand ($p > 0.05$). Ebenso war innerhalb der GM-CSF-Gruppe eine signifikant erhöhte IL-8-Produktion an den Visiten V5 ($p < 0.001$) und V9 ($p < 0.05$) gegenüber Visite V1 zu beobachten. Für die Placebo-Gruppe fand sich dieser Effekt an Visite V9 gegenüber den Visiten V1 ($p < 0.05$) und V5 ($p < 0.05$); siehe Abb. 23 (B).

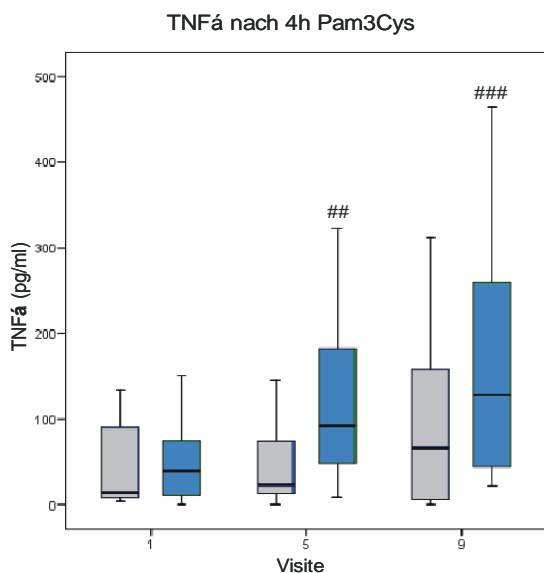
A



B



C



D

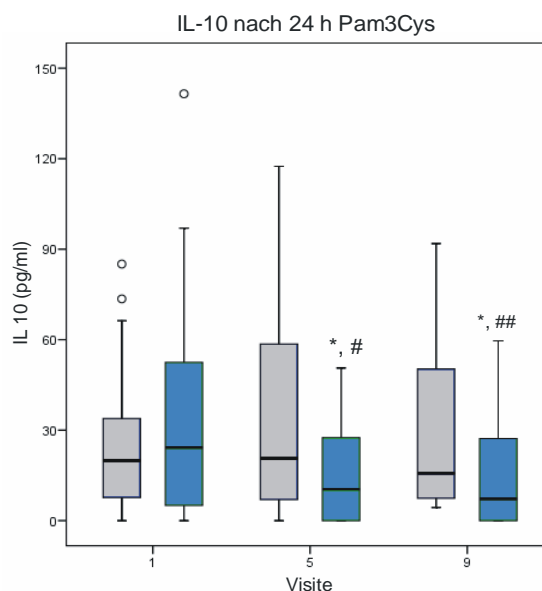


Abbildung 23 A-D: Pam3Cys-induzierte TLR-2-Rezeptor-Stimulation und monozytäre Zytokin-Produktion unter GM-CSF-Behandlung vs. Placebo für 8 Tage. Ergebnis der *ex vivo*-Vollblutstimulation mit Pam3Cys über 4 Stunden (und für IL-10 über 24 Stunden) jeweils an Visite 1, 5 und 9.

(A) IL-6, (B) IL-8, (C) IL-10, (D) TNF- α . Placebo (■), GM-CSF (■), ° (Ausreisser). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ Zwischengruppen-Vergleich am jeweiligen Studientag; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ versus Visite 1 in der selben Gruppe; § $p < 0.05$, §§§ $p < 0.001$ versus Visite 5 in der selben Gruppe. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

4 Ergebnisse

Die Messung von TNF- α zeigte nach 4-stündiger Pam3Cys-Stimulation eine schnellere Erholung der monozytären TNF- α -Produktion unter GM-CSF-Therapie. An Visite V5 ($p < 0.01$) und V9 ($p < 0.001$) ergab sich eine gegenüber den Ausgangswerten vor Therapie an Visite 1 innerhalb der GM-CSF-Gruppe eine signifikant erhöhte Produktion von TNF- α ; der Vergleich gegenüber der Placebo-Gruppe war an den beiden erwähnten Visiten nicht signifikant; siehe Abb. 23 (C).

Vergleichbar zu den Daten der TLR-4-Stimulation wurde auch bei TLR-2-Stimulation ein hemmender Effekt auf das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 in der Verum-Gruppe beobachtet. Bei 24-stündiger Inkubation mit Pam3Cys ließ sich an Visite V5 und V9 (beide $p < 0.05$) eine signifikante Hemmung der IL-10-Konzentration in der GM-CSF-Gruppe gegenüber Placebo feststellen. Vergleichbar war auch an den Visiten V5 und V9 eine signifikant verminderte IL-10-Produktion gegenüber Visite V1 innerhalb der GM-CSF-Gruppe zu beobachten; siehe Abb. 23 (D).

Für die weiterhin gemessenen Zytokine MIP1a und MCP1 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsarmen (Daten nicht dargestellt).

4.8.3 Zytokin-Produktion durch PDC nach Stimulation mit CpG-A-ODN (TLR-9)

Neben Monozyten sollten als weiterer Vertreter der Gruppe Antigen-präsentierender Zellen (APC) plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) unter GM-CSF-Therapie funktionell charakterisiert werden.

Hierzu wurden Vollblutansätze über 24 Stunden mit CpG-A-ODN stimuliert. Diese Form der mikrobiellen DNA zeichnet sich durch Regionen unmethylierter CpG-Dinukleotide aus, die den intrazellulär lokalisierten TLR-9 stimulieren (siehe Kapitel 3.2.6.3).

Quantifiziert wurde die Funktion der stimulierten Zellen anhand der Konzentration der gemessenen Zytokine IL-8 und MCP1.

Für das pro-inflammatorische IL-8 ergab sich in der GM-CSF-Gruppe nach Stimulation mit CpG-A-ODN über 24 Stunden an Visiten V5 und V9 eine signifikant höhere Produktion als in der Placebo-Gruppe ($p < 0.05$). Die in der GM-CSF-Gruppe bereits vor Beginn der Therapie mit GM-CSF an Visite V1 höhere IL-8-Produktion ($p < 0.05$), zeigte im Folgenden nach GM-CSF-Intervention eine weitere Zunahme der gemessenen IL-8-Absolutwerte unter Beibehaltung des Signifikanzniveaus ($p < 0.05$).

4 Ergebnisse

Im Innergruppen-Vergleich war an den Visiten V5 ($p < 0.001$) und V9 ($p < 0.01$) eine signifikant erhöhte IL-8-Produktion gegenüber Visite V1 innerhalb der Placebo-Gruppe zu beobachten, in der GM-CSF-Gruppe wurde an Visite V9 eine gegenüber Visite V1 signifikant erhöhte IL-8-Produktion gesehen ($p < 0.001$); siehe Abb. 24.

Für das Zytokin MCP1 ergaben sich keine signifikanten Messwertunterschiede zwischen den beiden Behandlungsarmen (Daten werden nicht dargestellt).

Mit der verwendeten Messmethode konnten im Vollblutansatz keine messbaren Konzentrationen des Zytokins IFN- α nachgewiesen werden.

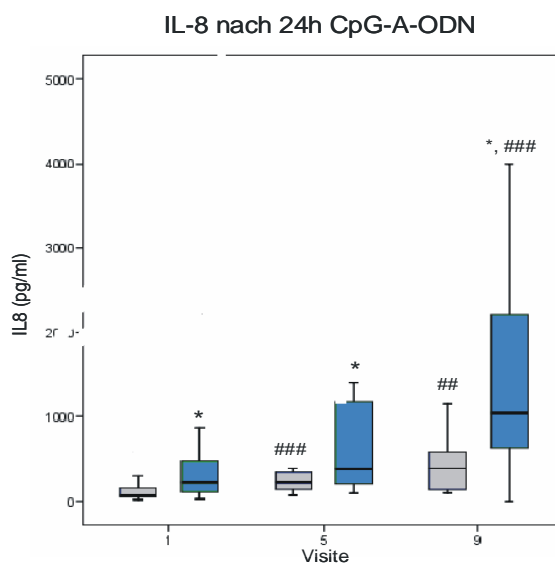


Abbildung 24: CpG-A-ODN-induzierte TLR-9-Rezeptor-Stimulation unter GM-CSF-Behandlung vs. Placebo für 8 Tage. Ergebnis der *ex vivo*-Vollblutstimulation mit ODNa an Visite 1, 5 und 9 über 24 Stunden in Form von IL-8-Produktion.

Placebo (■), GM-CSF (■). * $p < 0.05$ Zwischengruppen-Vergleich am jeweiligen Studientag; ## $p < 0.001$; ### $p < 0.001$ versus Visite 1 in der selben Gruppe.

4.9 Klinischer Verlauf

Die Patienten der Kontroll-Gruppe wiesen bei Einschluss in die Studie (Visite 1) tendenziell höhere Werte der intensivmedizinischen Scores APACHE II, SOFA und SAPS II auf, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen ($p > 0.05$, siehe Tabelle 11). Die Mittelwerte der intensivmedizinischen Scores zeigten in beiden Studiengruppen eine Verbesserung über den Behandlungszeitraum, jedoch waren die beobachteten Verbesserungen größer in der GM-CSF-Gruppe. So verringerten sich in der GM-CSF-Gruppe die APACHE II, SOFA und SAPS II Scores um 22%, 28% bzw. 4%, während es in der Placebo-Gruppe nur zu einer Reduktion um 8%, 21% bzw. 1% kam.

Im direkten Vergleich mit der Kontroll-Gruppe konnte an Visite 9 für die Patienten der GM-CSF-Gruppe ein deutlicher Trend zu niedrigeren Werten im APACHE II Score beobachtet

4 Ergebnisse

werden ($p=0.06$).

Die Dauer der mechanischen Ventilation ($p=0.037$), des ITS-Aufenthaltes und die Gesamtdauer der Hospitalisierung (beide nicht signifikant) waren kürzer in der GM-CSF-Gruppe. Der Anteil von Patienten mit Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie aufgrund akuten Nierenversagens und die Dauer der Nierenersatztherapie waren in beiden Gruppen gleich hoch (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Klinischer Verlauf und intensivmedizinische Scores im Verlauf in beiden Studiengruppen. Nach: Meisel, 2009.¹¹⁵

Parameter	Placebo n=19	GM-CSF n=19	p-Wert	
Mortalität an Visite 28 (%)	4/19 (21)	3/19 (16)	ns ^b	
Dauer ITS (Tage)	52.1±39.6	40.9±26.1	ns ^a	
Dauer Hospitalisierung (Tage)	68.9±45.6	58.8±32.6	ns ^a	
Mechanische Ventilation (V1-V9, Stunden)	207.2±57.5	147.9±102.8	0.037^a	
Nierenersatztherapie, ANV an V1 (%)	11/19 (58)	12/19 (63)	ns ^b	
Nierenersatztherapie(Tage)	11.5±10.2	14.4±10.2	ns ^a	
APACHE II	Visite 1	22.5±6.6	21.3±6.1	ns ^a
	Visite 9	20.8±7.4	16.7±5.9	(0.06) ^a
	V1 vs. V9	ns ^a	p=0.02^a	-
SOFA	Visite 1	9.5±3.7	7.2±4.0	ns ^a
	Visite 9	7.5±5.3	5.2±3.4	ns ^a
	V1 vs. V9	ns ^a	ns ^a	-
SAPS II	Visite 1	45.6±13.4	38.8±8.9	ns ^a
	Visite 9	45.0±14.9	37.3±10.6	ns ^a
	V1 vs. V 9	ns ^a	ns ^a	-

ANV-akutes Nierenversagen; APACHE-acute physiology and chronic health evaluation; ITS-Intensivstation; ns-nicht signifikant; SAPS-simplified acute physiology score; SOFA-sequential organ failure assessment

^a Student's t-Test für unabhängige und gepaarte Proben

^b exakter Fisher Test

Am Ende des Beobachtungszeitraums („Follow-Up“, V28) konnte kein Unterschied in der 28 Tage-Mortalität zwischen den Studiengruppen festgestellt werden. Im Hinblick auf die Schwere des septischen Krankheitsbildes – gemessen anhand der intensivmedizinischen Scores APACHE II, SOFA und SAPS II – zeigten beide Studiengruppen eine im Vergleich zu Visite 9 weitergehende Verbesserung; hierbei war für keinen der untersuchten Scores ein signifikanter Unterschied zwischen den Studiengruppen feststellbar ($p>0.25$).

4 Ergebnisse

Hinsichtlich der Verträglichkeit des Medikaments wurden beschriebene mögliche Nebenwirkungen unter GM-CSF-Therapie wie z.B. Hautreaktionen, allergische/anaphylaktische Reaktionen oder eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität („capillar leak syndrome“) nicht beobachtet. Innerhalb der Placebo-Gruppe wurde in einem Fall eine akute Linksherzinsuffizienz beobachtet, die zu Entblindung und Studienausschluss des betroffenen Patienten führte.

5 Diskussion

Die schwere Sepsis und der septische Schock weisen trotz großen Ressourceneinsatzes in der klassischen intensivmedizinischen Betreuung eine unverändert schlechte Prognose auf.

Daraus resultiert die dringende Forderung nach innovativen Therapiekonzepten.^{2-4,10,55}

Aus neuerer pathophysiologischer Sicht ist die in der späteren Phase der schweren Sepsis häufig zu beobachtende persistierende, schwere Minderfunktion des Immunsystems (Immunparalyse) wesentlich verantwortlich für das Auftreten von Sekundärinfektionen und die hohe Mortalität des Krankheitsbildes (siehe Kapitel 1.1.5). Die Durchführbarkeit und potentielle Effektivität eines immunstimulatorischen Therapieansatzes zur Überwindung der Immunparalyse konnte in Pilotstudien mit septischen Patienten von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt werden.^{83,96,101-103}

In der vorliegenden Arbeit wird erstmals bei Patienten mit Sepsis-assoziiertes Immunparalyse in einer Biomarker-basierten, randomisierten, doppelblind, Placebo-kontrollierten klinischen Studie gezeigt, dass die immunstimulatorische Therapie mit GM-CSF sicher und effektiv eine Wiederherstellung der monozytären Immunkompetenz erreicht.¹¹⁵ Diese wird definiert über die Normalisierung einer initial supprimierten HLA-DR-Expression und pro-inflammatorischen Zytokin-Sekretion monozytärer Zellen des peripheren Blutes (siehe Abb. 9 und 10 in Kapitel 4.3 und 4.4).

Aus klinischer Perspektive konnte sowohl eine verkürzte Dauer der künstlichen Beatmung (Ventilationszeit) als auch der Zeit der intensivmedizinischen Betreuung und Gesamthospitalisierung unter GM-CSF beobachtet werden. Während weiterhin eine tendenzielle Verbesserung des nach intensivmedizinischen Scores beurteilten klinischen Verlaufs dokumentiert werden konnte, war ein statistisch signifikanter Effekt auf die 28 Tage-Mortalität durch GM-CSF nicht nachzuweisen (siehe Tabelle 11). Generell zeigte sich ein gutes Sicherheitsprofil der Studienmedikation, Unverträglichkeitsreaktionen wurden nicht beobachtet. Weitere Aussagen bezüglich der zellulären Immunität konnten durch durchflusszytometrische Untersuchungen sowie anhand der *ex vivo* Stimulationsassays getroffen werden. Monozytäre Zellen des peripheren Blutes zeigten hierbei einen signifikanten Anstieg co-stimulatorischer Oberflächenmoleküle und ihrer pro-inflammatorischen Zytokinsekretion durch GM-CSF. Im Gegensatz hierzu war der beobachtete stimulatorische Einfluss von GM-CSF auf myeloide und plasmazytoide dendritische Zellen (MDC und PDC) minimal.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht: Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, Baumann T, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H,

Reinke P, and Volk HD. *Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression*. Am J Respir Crit Care Med Vol 180. pp640-648, 2009.¹¹⁵

Im Folgenden sollen die in der Studie beobachteten Ergebnisse im Einzelnen diskutiert werden.

5.1 Der Effekt von GM-CSF auf die zelluläre Immunität

Die zelluläre Immunität ist für die effektive Erregerbekämpfung von essentieller Bedeutung. Nach einer frühen (hyperinflammatorischen) Phase setzen bereits nach wenigen Stunden gegenregulatorische Mechanismen ein. Während der sogenannten Spätphase der Sepsis kommt es in diesem Zusammenhang zu einer gestörten Phagozytose sowie verminderter Zytokin-Produktion und Antigen-Präsentation durch Monozyten (siehe Kapitel 1.1.4 und 1.1.5).^{35,77-79} Weiterhin lassen sich lymphozytäre Dysfunktion und Apoptose^{84-89,107} sowie eine deutlich verminderte Zahl und eingeschränkte Funktion dendritischer Zellen beobachten.⁹⁰⁻⁹²

Aktuell wird die Spätphase der Sepsis mit der vorangehend beschriebenen Immunparalyse als verantwortlich für einen Großteil der Komplikationen und Mortalität der Sepsis verstanden.^{26,35,51,77,83,107} Die vorliegende klinische Studie zielte dezidiert auf die Wiederherstellung der monozytären Immunität bei Patienten in der immunologisch hyporeaktiven Spätphase der Sepsis. Die mittlere Liegedauer der Patienten auf Intensivstation vor Studieneinschluss lag somit durchschnittlich bei ungefähr einer Woche (siehe Tabelle 7).¹¹⁵

Da es sich bei der Sepsis-assoziierten Immunparalyse um einen dynamischen und potentiell reversiblen Zustand handelt, wurde bei jedem Patienten vor Einschluss in die Studie die monozytäre HLA-DR-Expression mittels eines standardisierten durchflußzytometrischen Verfahrens bestimmt (siehe Kapitel 3.2.5.3) und so der immunologische Funktionsstatus des Patienten erhoben.⁷⁶ Nur Patienten mit einer über mindestens 48 Stunden anhaltend dokumentierten Immundepression (<8000 mAb/Zelle) wurden in die Studie eingeschlossen, um die potentielle Gefahr einer Überstimulation mit Folge des Schocks in der Phase der Hyperinflammation auszuschließen.

5.1.1 Phänotyp, Frequenz und Funktion Antigen-präsentierender Zellen (APC) unter GM-CSF-Therapie

HLA-DR-Expression auf CD14⁺-Monozyten

Die monozytäre HLA-DR-Expression ist als Surrogatmarker der Immundepression septischer Patienten durch verschiedene Arbeitsgruppen etabliert worden.^{51,76,77,116-118} Hinsichtlich der in der vorliegenden Arbeit untersuchten monozytären HLA-DR-Expression konnte die Primärhypothese klar bestätigt werden. Während Patienten der GM-CSF-Gruppe nach

5 Diskussion

Behandlungsbeginn einen unmittelbaren und effektiven Anstieg auf normale bis supranormale Werte bereits an Studientag 2 erreichten (>15.000 HLA-DR-Moleküle/CD14⁺-Monozyt; siehe Abb. 9 in Kapitel 4.3), kam es in der Kontroll-Gruppe zu einer deutlich langsameren und unvollständigen Spontanerholung der HLA-DR-Expression auf subnormale Werte ($p < 0.001$). Die Mehrzahl der Patienten (17 von 19) normalisierte die HLA-DR-Expression nach fünftägiger Behandlung mit einer Dosis von $4 \mu\text{g/kg/Tag}$ GM-CSF. Nach der im Studienprotokoll vorgesehenen Dosisescalation auf $8 \mu\text{g/kg/Tag}$ (Kapitel 3.2.2 und Abb. 3) zeigten auch die übrigen zwei Patienten eine Normalisierung ihrer HLA-DR-Expression.¹¹⁵ Dies steht im Einklang mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen, die schnelle Therapieantworten auf GM-CSF mit Tagesdosen zwischen $3 \mu\text{g/kg}$ und $5 \mu\text{g/kg}$ beschrieben haben.^{96,101–103,119} Die Therapiedauer der vorgenannten Studien lag mit 3 bis 5 Tagen unter Umständen zu kurz, um eine längerfristige Stabilisierung der Immunfunktion und somit Schutz vor nosokomialen Sekundärinfektionen während der Immundepression in der Spätphase der Sepsis zu erreichen. In diesem Zusammenhang sind auch Beobachtungen von Monneret et al.^{51,77} zu sehen, die eine Korrelation zwischen HLA-DR-Minderexpression während der Spätphase der Sepsis, sieben Tage nach Beginn des septischen Schocks, und einem erhöhten Risiko für nosokomiale Infektionen zeigen. In der vorliegenden Studie wurde GM-CSF über 8 Tage gegeben, und es konnte so eine nachhaltigere Erhöhung der HLA-DR-Expression bis zum Interventions-Ende an Visitentag 9 beobachtet werden. Allerdings wurde in der vorliegenden Studie die Frage des Effektes von GM-CSF auf Sekundärinfektionen nicht untersucht.

Am Ende der Nachbeobachtungsphase an Visitentag 28 konnte bei 13 von 38 eingeschlossenen Patienten eine Kontrolle der Immunparameter erfolgen. Bei Patienten beider Studiengruppen (Placebo: $n = 7$, GM-CSF: $n = 6$) wurden normale Werte der monozytären HLA-DR-Expression gemessen (>20.000 mAb/Zelle); ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand nicht mehr ($p > 0.5$).¹¹⁵ Als Erklärung hierfür ist zum einen innerhalb der Verum-Gruppe die begrenzte Wirkdauer von GM-CSF zu sehen. Andererseits ist bei Patienten der Placebo-Gruppe nach Überwinden der kritischen Spätphase der Sepsis mit dem ihr eigenen Risiko infektiöser Sekundärkomplikationen von einer (langsamen) Spontanerholung der Immunkompetenz auszugehen.

Viele Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen einer monozytären HLA-DR-Minderexpression und dem Auftreten septischer Komplikationen nach Trauma und operativen Eingriffen.^{48,111} Ähnliches gilt für die HLA-DR-Expression als Marker für infektiöse Zweitkomplikationen in der Sepsis.^{51,120} Gegenstand lebhafter Debatte ist hingegen immer noch die Rolle der monozytären HLA-DR-Expression als prädiktiver Marker der Mortalität in der

5 Diskussion

schweren Sepsis und im septischen Schock. Generell ist zu sagen, dass sämtliche Untersuchungen zu diesem Thema auf kleinen Patientengruppen fußen und bisher keine prospektive Studie mit größerer Patientenzahl durchgeführt wurde. Während von einigen Autoren eine Korrelation zwischen HLA-DR-Expression und Mortalität nicht gefunden wurde,^{118,121,122} konnte sowohl durch unsere Arbeitsgruppe⁸³ als auch durch andere Autoren^{116,120,123,124} eine signifikant niedrigere monozytäre HLA-DR-Expression in nicht-überlebenden Sepsis-Patienten beobachtet werden. Neben Abweichungen in der technischen Durchführung sowie der Höhe des angewandten Cut-offs zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen ist offenbar in diesem Zusammenhang der Zeitpunkt bzw. die Dauer der HLA-DR-Minderexpression von Bedeutung. Aus technischer Perspektive werden 2 Analysemethoden der monozytären HLA-DR Expression unterschieden: die Bestimmung der Frequenz HLA-DR-positiver Monozyten (Normwert >80-100%)⁷⁷ und die quantitative Messung der HLA-DR Antigendichte auf Monozyten (Normwert >20.000 mAb/Zelle) mittels der sogenannte QuantiBRITE-Methode (siehe Kapitel 3.2.5.3). Letztgenanntes Verfahren wurde in der vorliegenden Studie angewandt und bietet den Vorteil einer hohen Standardisierung (hohe Inter-Assay Präzision mit VK-Werten von <10%) und besseren Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Laboren.⁷⁶ Bezüglich des anzuwendenden Cut-offs mit maximal diskriminatorischem Potential fehlen allerdings weiterhin Studien mit ausreichender Patientenzahl.¹¹⁷

Im Hinblick auf den idealen Zeitpunkt der HLA-DR-Messung beobachteten Monneret et al., dass der Unterschied der HLA-DR-Werte zwischen Überlebenden und Nicht-Überlebenden erst >48 Stunden nach Beginn des septischen Schocks signifikant war.⁷⁷ Dieses Phänomen kann durch die Persistenz der Immunparalyse nach einem vorangegangenen (infektiösen) Trauma und einer daraus resultierenden Zunahme der Suszeptibilität für Sekundär-Infektionen mit hoher Mortalität Erklärung finden. In diesem Sinne ist die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Dokumentation einer persistierenden Immunparalyse über mindestens 48 Stunden durch ein hoch-standardisiertes Immunmonitoring als essentiell zu werten (siehe Studiendesign und Behandlungsschemain Kapitel 3.2.2).¹¹⁵ Nur durch konsequentes Immunmonitoring eines etablierten Biomarkers (z.B. HLA-DR) kann eine Stratifizierung der Patienten erreicht und so gewährleistet werden, dass der Beginn der immunstimulatorischen GM-CSF-Therapie in die vulnerable Phase der Immunparalyse fällt.^{76,125}

Frequenz von Monozyten-Subpopulationen unter GM-CSF-Therapie

Monozyten des peripheren Blutes sind eine heterogene Population, deren unterschiedliche

5 Diskussion

Komponenten über den Grad ihrer Expression von CD14 und CD16 charakterisiert werden können. Neben der Population klassischer CD14⁺CD16⁻-Monozyten wurde bereits 1989 durch Passlick et al. aus der Arbeitsgruppe um Ziegler-Heitbrock eine Population sowohl CD14 als auch CD16 co-exprimierender Monozyten identifiziert, die unter normalen Bedingungen etwa 10% des Monozytenpools im peripheren Blut ausmacht.²⁰ Diese CD14⁺CD16⁺-Subpopulation ist durch höhere Expression von HLA-DR und größere Fähigkeit zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α nach TLR-Stimulation charakterisiert.^{19,21,22} Eine zahlenmäßige Expansion sowohl der monozytären CD14⁺-Gesamtpopulation (Monozytose) als auch der Sub-Population der so genannten „pro-inflammatorischen“ CD14⁺CD16⁺-Monozyten in der Sepsis konnte unter anderem in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe durch Poehlmann et al. gezeigt werden.^{19,23}

Zur phänotypischen Charakterisierung Antigen-präsentierender Zellen (APC) wurden an den Studientagen V1, V5 und V9 durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt (siehe Kapitel 4.7.1, 4.7.1.1, 4.7.1.2 und Tabelle 10).

Im Einklang mit der vorangehend beschriebenen Literatur wurde an Visite 1 vor Interventionsbeginn eine Monozytose mit einer erhöhten Frequenz CD14⁺-Gesamtmonozyten in beiden Behandlungsgruppen beobachtet. Die Behandlung mit GM-CSF führte, wie in anderen Arbeiten beschrieben,^{99,126} zu einem signifikanten Anstieg der Monozytenzahlen innerhalb des Differentialblutbilds gegenüber einem langsameren Spontananstieg in der Placebo-Gruppe (siehe Kapitel 4.5.2 und Abb. 12). In Untersuchungen von Saenz et al. konnte eine erniedrigte absolute Monozytenzahl im frühen Sepsisstadium mit erhöhter Spät-Mortalität korreliert werden.¹²³ So kann vermutet werden, dass bereits eine rein numerische Erhöhung der Monozyten als Ausdruck einer funktionierenden Hämatopoese einen positiven Effekt auf die Immunfunktion hat.

Weiter zeigte sich am Studienbeginn bei erwartungsgemäß hohen Frequenzen für klassische, CD14⁺CD16⁻-Monozyten eine niedrige Frequenz der pro-inflammatorischen CD14⁺CD16⁺-Monozyten. Es handelt sich hierbei um Frequenzen in Patienten mit Sepsis, die im Bereich der bei gesunden Probanden beschriebenen 10% der monozytären Gesamtpopulation liegen. Damit liegen die beobachteten Werte unter den in Voruntersuchungen unserer¹⁹ und anderer Arbeitsgruppen²³ in septischen Patientenkollektiven beschriebenen Frequenzen CD14⁺CD16⁺-Monozyten. Im Verlauf des Studienzeitraums zeigte sich für CD14⁺CD16⁻ (klassische) Monozyten eine signifikante Zunahme unter GM-CSF ($p < 0.05$ an Visite 5, siehe Kapitel 4.7.1.1. und Abb. 18 (A)), während für die Population der CD14⁺CD16⁺-pro-inflammatorischen Monozyten unter GM-CSF-Therapie keine signifikante Änderung gegenüber Placebo beobachtet wurde; siehe Kapitel 4.7.1.2 und Abb. 19 (A).

Frequenz dendritischer Zellen (DC) unter GM-CSF

Dendritische Zellen (DC) sind die Population mit der effektivsten Antigen-Präsentation innerhalb der APC. Im peripheren Blut lassen sich zwei Hauptpopulationen von DC-Vorläuferzellen detektieren: myeloide (MDC) und plasmazytoide DC (PDC), die aufgrund eines spezifischen TLR-Repertoires über ein distinktes funktionales Profil verfügen (siehe Einleitung 1.1.3 mit Tabelle 2).^{15,40} Wie bereits vorangehend bemerkt, werden in der Sepsis eine deutliche Verminderung der Zellzahl und eingeschränkte Funktion von DC gegenüber gesunden Probanden beschrieben. Hierbei handelt es sich im septischen Patienten um ein sowohl frühes⁹¹ als auch langandauerndes Geschehen; so wurden in Vorarbeiten unserer Gruppe durch Poehlmann et al. noch 28 Tage nach Beobachtungsbeginn in Sepsispatienten signifikant niedrigere DC-Frequenzen gefunden als in Kontrollprobanden.¹⁹ Ursächlich sind für diese „DC-Zytopenie“ neben erhöhter Apoptose^{19,84,91,127} auch eine veränderte Kompartimentierung von DC und eine verminderte Hämatopoiese.¹²⁸ Neben ihrer Frequenz ist außerdem die Funktion von DC und somit die Antigen-Präsentation und Initiierung einer lymphozytären Antwort im septischen Patienten stark kompromittiert.^{88,92,129} So ist zu verstehen, dass verminderte DC-Zellzahlen als negativ prognostischer Marker in der Sepsis beschrieben sind.⁹¹

Zu Studienbeginn zeigte sich in beiden Studiengruppen im Einklang mit der existierenden Literatur sowohl für MDC als auch für PDC eine deutliche Verminderung ihrer Frequenzen im peripheren Blut. Eine Vergleichsmessung mit nicht-septischen Probanden wurde nicht durchgeführt; allerdings liegen die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Werte für MDC und PDC deutlich unter den Frequenzen, die Poehlmann et al. in Vorarbeiten an Kontrollprobanden und septischen Patienten beschrieben haben.¹⁹ Im Hinblick auf die Zellzahlveränderung unter GM-CSF-Therapie zeigte sich im Innergruppen-Vergleich der Verum-Gruppe eine signifikante Erhöhung der MDC-Frequenz zum Studienende an Visitentag 9. Diese Beobachtung könnte sich aus der Tatsache erklären lassen, dass GM-CSF *in vitro* die Differenzierung von MDC aus Monozyten induziert.¹⁰⁰ Allerdings ließ sich im Zwischengruppen-Vergleich kein signifikanter Unterschied zwischen Placebo und Verum feststellen.

Zusammenfassend ist eine numerisch sehr ausgeprägte Verminderung dendritischer Populationen im peripheren Blut septischer Patienten zu beobachten; durch GM-CSF-Therapie scheint eine partielle Erholung, zumindest für myeloide DC, möglich zu sein. Die außerordentlich niedrige Frequenz dendritischer Zellen (insbesondere von PDC) im Vollblut (siehe Kapitel 4.7.2.2 und Tabelle 10) erschweren allerdings die Interpretation des Verhaltens von Zellzahl und Expression von Oberflächenmarkern dieser Sub-Population unter GM-CSF-Therapie in der vorliegenden Studie. Es sind weitergehende Untersuchungen in einer größeren

Studie nötig.

Expression von HLA-DR und co-stimulatorischen Molekülen auf monozytären Subpopulationen unter GM-CSF

Die Existenz heterogener Zellpopulationen innerhalb der Gruppe zirkulierender Monozyten ist heute akzeptiert. Während zu den Frequenzen der unterschiedlichen monozytären Subpopulationen in der Sepsis Voruntersuchungen bestehen,^{19,23} ist die Datenlage hinsichtlich ihrer phänotypischen und funktionellen Parameter deutlich unvollkommener.

In den durchflusszytometrisch untersuchten monozytären Subpopulationen zeigte sich zu Studienbeginn sowohl für klassische CD14⁺CD16⁻-Monozyten als auch für pro-inflammatorische CD14⁺CD16⁺-Monozyten eine tiefgreifende funktionelle Deaktivierung, allerdings mit gradueller Abstufung zwischen beiden Populationen. Ausdruck dieser Deaktivierung war eine drastische Verminderung der HLA-DR-Expression im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Werten gesunder Probanden. Unter basalen Bedingungen in gesunden Probanden ist eine höhere HLA-DR-Expression auf CD14⁺CD16⁺-Monozyten gegenüber klassischen Monozyten bekannt.^{19,20} Wie erstmals durch unsere Arbeitsgruppe für die Sepsis beschrieben,¹⁹ zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit innerhalb des Placebo-Kollektivs für die Population CD14⁺CD16⁺-Monozyten eine höhere HLA-DR-Expression mit Tendenz zu einer Spontanerhöhung im Studienverlauf, während auf den zahlenmäßig überwiegenden CD14⁺CD16⁻-Monozyten eine profunde und über die gesamte Studiendauer persistierende Mindereexpression von HLA-DR in der Placebo-Gruppe zu beobachten war. Dies kann als Hinweis auf den „pro-inflammatorischen“ Charakter CD14⁺CD16⁺-Monozyten und einen unterschiedlichen Regulationsmechanismus der HLA-DR-Expression gewertet werden. Durch GM-CSF-Therapie wurde in beiden monozytären Sub-Populationen gegenüber der Placebo-Kontrolle eine signifikante und dauerhafte Steigerung der HLA-DR-Expression erreicht, was als Wiederherstellung der monozytären Immunkompetenz mit Verbesserung der Antigen-Präsentation interpretiert werden kann; siehe Kapitel 4.7.1.1 mit Abb. 18 (D) und Kapitel 7.7.1.2 mit Abb. 19 (D) sowie Tabelle 10.

Neben der Expression von MHC II-Molekülen wie HLA-DR ist für eine effektive Antigen-Präsentation und Aktivierung von CD4⁺-Lymphozyten die Expression und Heraufregulierung co-stimulatorischer Moleküle essentiell.²⁵ Hierbei interagieren zum Beispiel auf T-Zellen exprimiertes CD28 mit dem co-stimulatorischen B7-Molekül CD86 auf APC, wodurch eine stärkere T-Zell-Aktivierung und IL-2-Produktion ermöglicht wird. In der vorliegenden Arbeit wurden CD40 und CD86 als Vertreter co-stimulatorischer Moleküle durchflusszytometrisch auf APC und auf den vorangehend beschriebenen monozytären Sub-Populationen untersucht. Zu

5 Diskussion

Studienbeginn zeigte sich in beiden Studiengruppen – verglichen mit Bestimmungen zu späteren Zeitpunkten der Studie – eine Minderexpression von CD40 und CD86 auf beiden monozytären Sub-Populationen. Es werden hiermit Voruntersuchungen durch Nolan et al. bestätigt, die sowohl im Mausmodell als auch in septischen Patienten eine monozytäre Minderexpression von CD86 zeigten, wobei der Grad der CD86-Suppression war proportional zur Schwere des septischen Prozesses.¹³⁰ Auch wenn der Mechanismus der CD86-Regulation noch weitgehend unbekannt ist, so lässt doch die inverse Relation der Höhe von CD86 und IL-10-Plasmaspiegeln die Autoren auf eine potentielle kausale Verknüpfung der Regulationsmechanismen schließen.¹³⁰ Im Hinblick auf das co-stimulatorische Molekül CD40 beobachteten Nolan et al. die Tendenz zu verminderter Expression auf Monozyten während späterer (hypoinflammatorischer) Phasen der Sepsis. Weiterhin ist von Schwulst et al. ein protektiver, anti-apoptotischer Effekt durch agonistische anti-CD40 Antikörper auf das lymphozytäre System im murinen Zökum-Ligationsmodell beschrieben worden. Es ist insgesamt also zu vermuten, dass die Expression von CD40 auf APC in der Sepsis einen protektiven Einfluss auf T-Zell-Aktivierung, positive Verstärkung der lymphozytären Expansion und Aktivierung der Antigen-Präsentation ausübt.^{130,131} Einschränkend muss bemerkt werden, dass in den vorgenannten Arbeiten jeweils Gesamt-Monozyten untersucht wurden, ohne zwischen CD14⁺CD16⁻- und CD14⁺CD16⁻-Subpopulationen zu differenzieren.

Weiterhin waren in der vorliegenden Arbeit, vergleichbar den im vorangehenden Kapitel beschriebenen Ergebnissen der HLA-DR-Expression, CD40 und CD86 in ihrer Expression auf CD14⁺CD16⁻-Monozyten um den Faktor 2 stärker kompromittiert als auf CD14⁺CD16⁺ „pro-inflammatorischen“ Monozyten. Generell ist daher von einem niedrigeren Basalniveau der Expression co-stimulatorischer Moleküle auf CD14⁺CD16⁻-Monozyten auszugehen.

Im Studienverlauf vermochte GM-CSF auf CD14⁺CD16⁻-Monozyten die Expression von CD40 und CD86 signifikant zu heben, allerdings war bei CD86 auch eine Spontanerholung innerhalb der Placebo-Gruppe zu beobachten; siehe Kapitel 4.7.1.1. mit Abb. 18 (B) und (C) und Tabelle 10.

CD14⁺CD16⁻-Monozyten zeigten im Studienverlauf unter GM-CSF eine signifikant erhöhte Expression von CD40. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der in der Literatur beschriebenen Stimulation der Expression co-stimulatorischer Moleküle durch GM-CSF über die Modifikation verschiedener intrazellulärer Signalwege wie JAK/STAT, MAPK und NFκB.¹³² Allerdings wurden in der hier beschriebenen Arbeit keine Untersuchungen zur intrazellulären Regulation durchgeführt.

Sowohl in der Placebo-Kontrolle als auch unter GM-CSF erfolgte während des Studienverlaufs

eine Spontanerholung der Expression von CD86. GM-CSF hatte somit keinen signifikanten Effekt auf die Expression von CD86; siehe Kapitel 4.7.1.2. mit Abb. (B) und (C) und Tabelle 10.

Diese Ergebnisse sind in Zusammenhang zu sehen mit Vorarbeiten durch Wolk et al., die sowohl im LPS-Toleranz-Modell *in vitro* als auch bei septischen Intensivpatienten eine Abnahme der Protein- und Genexpression von CD86 in CD14⁺-Monozyten beschrieben und zudem eine Korrelation mit verminderter HLA-DR-Expression und schlechtem klinischem Outcome zeigen konnten. Die selben Autoren sahen eine erhöhte IL-10-Produktion als kausalen Mechanismus im Sinne einer autokrinen Hemmung der MHC II- und CD86-Expression.^{75,133}

Zu Studienbeginn wurden in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Studiengruppen in Bezug auf die Höhe der Plasmaspiegel von IL-10 festgestellt, auch ließ sich keine Korrelation zwischen Expressionshöhe von HLA-DR und IL-10 beobachten (siehe Kapitel 4.6.2). In Vollblut-Ansätzen mit TLR2/4-Stimulationen durch Pam3Cys bzw. LPS konnte jedoch eine deutliche Hemmung der IL-10-Produktion durch GM-CSF beobachtet werden, wodurch eine verminderte autokrine Hemmung der Expression co-stimulatorischer Moleküle durch IL-10 und somit eine verbesserte APC-Funktion erklären ließe (siehe Kapitel 4.8.1 und 4.8.2).¹¹⁵ Weiterhin ist bekannt, dass GM-CSF über eine modifizierte Expression von Transkriptionsfaktoren wie CIITA eine Erhöhung von MHC II- und co-stimulatorischen Molekülen in Monozyten bewirkt.¹³⁴

Expression von HLA-DR und co-stimulatorischen Molekülen auf DC unter GM-CSF-Therapie

Ähnlich den Untersuchungen zur funktionellen Deaktivierung monozytärer Zellen wurde auch eine Verminderung der Frequenz dendritischer Zellen (DC) im peripheren Blut als auch ihre funktionelle Defizienz im Rahmen einer Sepsis beschrieben. Aufgrund der bestehenden DC-Penie und der funktionellen Deaktivierung der DC kommt es zu einer hochgradigen Dysfunktion der insbesondere durch die DC geleisteten Antigen-Präsentation.^{19,90,92}

Die Fähigkeit zur Antigen-Präsentation, als wichtiger Aspekt der Funktionalität dendritischer Zellen, lässt sich über deren Expression von HLA-DR und co-stimulatorischen Molekülen wie CD40 und CD86 erfassen.¹³⁵ Man spricht in diesem Zusammenhang von Aktivierung bzw. Reifung der DC. Erst im Zuge dieser durch Stimulation der DC über TLR geförderten Reifung zeigt sich eine Erhöhung der Expression von HLA-DR und co-stimulatorischen Molekülen;²⁵ siehe Kapitel 1.1.1.

Die Bedeutung der funktionellen Reifung von DC sowie die Tatsache, dass es im Tiermodell der Sepsis Hinweise auf eine potentielle Wirksamkeit von GM-CSF auf dendritische Zellen gibt,¹³⁶

5 Diskussion

veranlassten uns zur durchflusszytometrischen Messung der Expression von HLA-DR und co-stimulatorischen Molekülen unter Therapie mit GM-CSF.

Im Hinblick auf die HLA-DR-Expression zeigte sich im Studienverlauf auf myeloiden DC eine tendenzielle Erhöhung durch GM-CSF; im Zwischengruppen-Vergleich war jedoch der Unterschied nicht signifikant (siehe Kapitel 4.7.2.1 mit Abb. 20 (D)). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen bezüglich der Rolle von GM-CSF in der DC-Reifung. So ist eine Stimulation der MHC-II-Expression und Reifung von DC *in vitro* durch GM-CSF beobachtet worden.^{134,137}

Auf plasmazytoiden DC hingegen zeigte sich in der vorliegenden Arbeit kein messbarer Effekt von GM-CSF auf die Expression von HLA-DR. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Literatur. So legen *in vitro*- und *in vivo*-Daten eine nur minimale Beeinflussbarkeit der Homöostase von PDC durch GM-CSF nahe. Dies lässt sich mit der differenziellen GM-CSF-Rezeptor-Expression erklären; während MDC den Rezeptor stark exprimieren, findet sich auf PDC keine Expression des GM-CSF-Rezeptors.¹³⁸ Der Mechanismus der HLA-DR-Regulation in dendritischen Zellen im Rahmen der Sepsis ist zwar weiterhin unklar, es bestehen jedoch Untersuchungen, die eine Analogie zur Endotoxin-Desensibilisierung monozytärer Zellen vermuten lassen. *Ex vivo*-Untersuchungen an PBMC gesunder Probanden und septischer Patienten zur Regulation von HLA-DR und ihre Beeinflussbarkeit durch GM-CSF legen ein komplexes Szenario nahe. So beobachteten Perry et al. neben Veränderungen in der Gen-Transkription (mRNA) und Oberflächenstabilität des HLA-DR-Moleküls auch eine Beteiligung post-translationaler Prozesse.¹³⁹

Neben der Mindereexpression von HLA-DR findet sich in Sepsis-Patienten ebenso eine verminderte Expression co-stimulatorischer Moleküle.¹³⁵ Aufgrund von *ex vivo*-Daten lässt sich annehmen, dass GM-CSF eine wichtige Rolle in der die Reifung dendritischer Zellen charakterisierende Hochregulierung der co-stimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 einnimmt.¹³⁷ Weiterhin ist die Revertierung einer initial verminderten Expression von CD40 und CD86 auf dendritischen Zellen und Makrophagen durch GM-CSF und INF- γ von Flohé et al. in einem murinen Sepsis-Modell, dem Zökum-Ligationsmodell, beschrieben.¹³⁶ In der vorliegenden Arbeit zeigte sich – vergleichbar der von Flohé et al. beschriebenen Daten im murinen Modell – während des Studienverlaufs auf myeloiden DC eine signifikante Erhöhung von CD86 durch GM-CSF, sowohl zeitlich im Studienverlauf innerhalb der GM-CSF-Gruppe (Visite 5 gegen Visite 1) als auch im Gruppenvergleich gegenüber Placebo. Einschränkend muss allerdings erwähnt werden, dass CD86 innerhalb der GM-CSF-Gruppe bereits zu Studienbeginn erhöht vorlag. Der stimulierende Effekt von GM-CSF auf CD40 ließ sich nur als Tendenz beobachten,

ohne im Zwischengruppen-Vergleich signifikant zu sein (siehe Kapitel 4.7.2.1 und Abb 20 (B) und (C)).

Zusammenfassend lassen die Daten den Schluss zu, dass angesichts einer verstärkten Expression von HLA-DR und der co-stimulatorischen Moleküle CD40 und CD86 unter GM-CSF die Fähigkeit zur Antigen-Präsentation durch MDC in septischen Patienten zumindest begünstigt wird. Ob dies auch zu einer verbesserten Initiierung der Th1-Antwort durch MDC in Patienten mit Sepsis führt, muss gezeigt werden. Aufgrund der von Flohé gezeigten murinen Daten scheint dies im Tiermodell nicht der Fall zu sein; siehe unten, Abschnitt zu IL-12.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich in plasmazytoiden DC kein Effekt auf die Expression von CD40 und CD86 durch GM-CSF feststellen. Aufgrund der äußerst geringen Zellzahlen ist nochmals auf die nur begrenzte Aussagekraft der beobachteten Daten hinzuweisen. Generell scheinen jedoch im Kontext der Sepsis sowohl die Expression von HLA-DR als auch co-stimulatorischer Moleküle in myeloiden DC über eine deutlich höhere Variabilität und Regulationsmöglichkeit ihrer Expression als in plasmazytoiden DC zu verfügen. Diese Schlussfolgerung basiert auf den vorangehend präsentierten Daten sowie der Tatsache, dass der von Poehlmann et al. beschriebene Unterschied in der HLA-DR-Expression zwischen Probanden und septischen Patienten in myeloiden DC weitaus größer ist als in plasmazytoiden DC.¹⁹ Erklären lässt sich diese Beobachtung durch die unterschiedliche Expression des GM-CSF-Rezeptors auf MDC und PDC.¹³⁸ So ist davon auszugehen, dass PDC weitestgehend ausserhalb des Wirkspektrums von GM-CSF liegen und eine GM-CSF vermittelte indirekte Stimulation nicht ausreichend für die Aktivierung von PDC ist.

Rekonstitution der Zytokin-Produktion von Monozyten und dendritischen Zellen nach TLR-Stimulation durch GM-CSF

Neben der Dokumentierung einer verbesserten Antigenpräsentation erhält die Messung der monozytären HLA-DR-Expression weitergehende Bedeutung in der klinischen Diagnostik als Surrogatparameter der monozytären Zytokin-Produktion. So korreliert die Fähigkeit zur Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine nach TLR-Stimulation als Zeichen der monozytären Immunkompetenz eng mit der Höhe der monozytären HLA-DR-Expression.^{51,75,77,81,83} Im Kontext der Endotoxin-Toleranz als Modell der Immunparalyse wird der Wechsel von einem pro- in ein anti-inflammatorisches Aktionsmuster als Antwort auf einen sekundären bakteriellen Stimulus beobachtet; der Begriff der Monozyten-Umprogrammierungsmacht den Grad der funktionellen Deaktivierung deutlich.^{14,29,48,74,82}

Vor diesem Hintergrund ist die formulierte Sekundärhypothese der vorliegenden Arbeit zu

5 Diskussion

sehen: Die beobachtete Erholung der monozytären HLA-DR-Expression ist in der GM-CSF-Gruppe assoziiert mit einer Wiederherstellung der sekretorischen Monozytenfunktion. Die Quantifizierung der Monozytenfunktion über die Messung von *ex vivo* produziertem TNF- α nach TLR-Stimulation gilt neben der Messung der HLA-DR-Expression als fundamental in der Erfassung der Immunkompetenz und ist von mehreren Arbeitsgruppen seit Beginn der 90er Jahre bestätigt worden.^{38,51,78,79}

In der vorliegenden Arbeit konnte die Rekonstitution der Monozytenfunktion durch GM-CSF anhand einer schnellen (24 Stunden nach Behandlungsbeginn) und dauerhaften Normalisierung der Endotoxin (LPS)-induzierten monozytären *ex vivo*-TNF- α -Produktion (Normbereich >300 pg/ml) gezeigt werden. Während der ersten fünf Behandlungstage (Visiten V2 bis V6) wurde gegenüber Placebo eine signifikante Erhöhung beobachtet; unter Placebo trat eine deutlich langsamere Spontanerholung erst ab Visitentag 5 ein (Kapitel 4.4 und Abb. 10).¹¹⁵ Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung *ex vivo*-Untersuchungen mit GM-CSF im Vollblut septischer Patienten durch Flohé et al., die ebenso eine Revertierung der Monozytenfunktion (Erhöhung der monozytären HLA-DR-Expression und Endotoxin-induzierten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine) zeigen konnten.^{104,140} Weiterhin erfährt die von Nierhaus et al.⁹⁶ in einer GM-CSF-Pilotstudie 2003 erstmals beschriebene *in vivo*-Revertierung der Monozytenfunktion – gemessen anhand von HLA-DR-Expression und LPS-stimulierter *ex vivo*-TNF- α -Produktion – durch die hier vorliegende doppelt-blinde, Placebo-kontrollierte, randomisierte Studie eine überzeugende Bestätigung.¹¹⁵

Wie in der Literatur beschrieben, führt die Aktivierung von TLR (TLR-2 und -4) und der nachfolgenden intrazellulären Signalkaskade unter anderem über vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors NF-KB zu erhöhter Produktion pro-inflammatorischer Zytokine.^{15,35,41,42}

Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe durch Randow et al. zeigten im LPS-Desensibilisierungsmodell der Sepsis *in vitro* eine Umprogrammierung von Monozyten, ausgedrückt durch verminderte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und eine erhöhte Sekretion des anti-inflammatorischen IL-10.⁸⁰ Spätere Arbeiten von Poehlmann et al. bestätigten in Sepsis-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden eine tiefgreifende funktionale Deaktivierung monozytärer Populationen und dendritischer Zellen (DC) nach TLR-Stimulation mit Endotoxin (LPS) und Lipoteichonsäure (LTA).¹⁹

Neben der vorangehend bereits beschriebenen Revertierung der LPS-stimulierten TNF- α -Produktion (TLR-4) konnte in der vorliegenden Arbeit eine weiterreichende funktionelle Erholung dieser Zellpopulationen durch GM-CSF belegt werden. In diesem Zusammenhang wurden die als Antwort auf TLR-2-(Pam3Cys)- und TLR-4-(LPS)-Liganden produzierten pro-

5 Diskussion

und anti-inflammatorischen Zytokine IL-6 bzw. IL-10 und das Chemokin IL-8 gemessen.

Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die autokrin-regulatorische Funktion von IL-10, das – durch TNF- α induziert von Monozyten gebildet – als „spätes“ Ereignis inhibitorisch auf die monozytäre Produktion pro-inflammatorischer Zytokine einwirkt.^{14,29,79,80,82} Aus der vorangehend beschriebenen Kinetik ergibt sich, dass in der vorliegenden Arbeit die Messung der „frühen“ Effektormoleküle (TNF- α , IL-6, IL-8) bereits nach 4h, die Messung der „späten“ Effektormoleküle (IL-10) erst nach 24h durchgeführt wurde.

Parallel zur Normalisierung der HLA-DR-Expression und TNF- α -Produktion zeigte sich in dieser Arbeit in der GM-CSF-Gruppe an den Behandlungstagen 5 und 9 eine signifikante Erhöhung der Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 und des Chemokins IL-8, während eine (tendenzielle) Verminderung der Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 nach TLR-4-vermittelter LPS-Stimulation in Vollblut zu beobachten war; siehe Kapitel 4.8.1 und Abb. 22 (A-C).¹¹⁵ Diese *in vivo* Effekte von GM-CSF stehen im Einklang mit Beobachtungen aus *in vitro*-Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe durch Randow et al. und Schröder et al., die eine funktionelle Revertierung der Monozytenfunktion durch IFN- γ und GM-CSF im Modell der LPS-Desensibilisierung zeigen konnten. Gemessen wurde die Rekonstitution anhand einer wiederhergestellten Kapazität zur TNF- α -Produktion nach TLR4-Stimulation.^{93,94} Weiter bestätigen unsere Ergebnisse die im murinen *in vivo*-Modell der Sepsis durch Bundschuh et al. beobachteten Verstärkung der LPS-induzierten TNF- α -Produktion durch GM-CSF⁹⁵ und bekräftigen die in immunstimulatorischen Pilotstudien septischer Patienten durch INF- γ und GM-CSF erreichte Wiederherstellung der über TLR4-Stimulation vermittelten TNF- α -Produktion.^{83,96} Als weiteres Indiz einer Erholung der monozytären Funktion kann die nach TLR-2-Stimulation durch das synthetische Lipopeptid Pam3Cys in der GM-CSF-Gruppe an Behandlungstag V5 beobachtete signifikant höhere Produktion von IL-6 und IL-8 und die signifikante Verminderung der Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 gewertet werden. Vergleichbar mit den TLR-4 Stimulationsdaten war auch nach TLR-2-Stimulation durch Pam3Cys eine deutliche Tendenz zu einer erhöhten Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α zu erkennen; siehe Kapitel 4.8.2 und Abb. 23 (A-D).

Diese Ergebnisse zeigen am Beispiel von TLR-2 und TLR-4, dass die Funktionalität der PRR-Signalwege in myeloiden Immunzellen in septischen Patienten im Zustand der Immunparalyse durch GM-CSF rekonstituiert zu werden scheinen. Beide TLR dienen der prinzipiellen Erkennung Gram-negativer (LPS/TLR-4) und Gram-positiver Erreger (Pam3Cys/TLR-2). Weiter verfügen TLR-2 und TLR-4 über ähnliche intrazelluläre Signalkaskaden, wobei es durch Vermittlung der Schlüsselmoleküle MyD88 und NF-KB zu einer Aktivierung der pro-

5 Diskussion

inflammatorischen Zytokin-Sekretion kommt.^{35,39,124} Auch in den von Poehlmann et al. publizierten *ex vivo*-Voruntersuchungen mit monozytären Zellen septischer Patienten zeigte die TLR-2-Stimulation mit LTA (Bestandteil der Zellwand Gram-positiver Bakterien) einen der TLR-4-Stimulation mit LPS vergleichbaren Effekt im Hinblick auf die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine.¹⁹

Neben der Aktivierung der pro-inflammatorischen Achse konnte in der hier vorliegenden Untersuchung eine verminderte Produktion des anti-inflammatorischen IL-10 durch GM-CSF-Behandlung beobachtet werden. Hierbei war der gemessene Effektdurch TLR-2-vermittelte Pam3Cys-Stimulation stärker als nach Stimulation des TLR-4-Systems durch LPS. Aufgrund der negativ-regulatorischen Funktion von IL-10 sowohl auf transkriptioneller als auch auf post-transkriptioneller Ebene,^{28,94} kann die von uns beobachtete Hemmung der IL-10 Produktion durch GM-CSF zu einer verbesserten pro-inflammatorischen Funktion beitragen.

Für die Produktion der Chemokine MIP1a (TLR2/P3Cys und TLR4/LPS) und MCP1 (TLR2/P3Cys, TLR4/LPS und TLR9/ODNA) ist eine durch GM-CSF vermittelte Induktion in Immunzellen beschrieben worden.¹⁴¹ In der vorliegenden Arbeit ließen sich jedoch keine Unterschiede durch GM-CSF-Stimulation gegenüber Placebo nachweisen.

Die durch GM-CSF offenbar verbesserte pro-inflammatorische Zytokin-Produktion und Fähigkeit zur Antigen-Präsentation von Monozyten und myeloiden DC stellen allerdings nur einen Teilaspekt der im Rahmen der Immunparalyse des septischen Patienten gestörten Immunfunktion dar. Die Initiierung einer suffizienten T-lymphozytären Immunantwort via IL-12-Produktion ist eine weitere wichtige Funktion des Wirkspektrums insbesondere myeloider DC. Im Modell der experimentellen Endotoxin-Toleranz konnte durch Wysocka et al. eine verminderte IL-12-Produktion durch MDC, Makrophagen/Monozyten und DC der Milz gezeigt werden.¹⁴² Wu et al. berichten von erniedrigten IL-12-Plasmakonzentrationen in septischen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden. Weiterhin stellten die Autoren fest, dass die durch *ex vivo*-LPS-Stimulation in isolierten monozytären Zellen erreichten IL-12-Konzentrationen in überlebenden Patienten signifikant höher lagen als in Patienten, die an der Sepsis verstarben. Die Autoren folgerten, dass die Fähigkeit zur Produktion von IL-12 somit als prognostisch protektiv in septischen Patienten zu werten ist.¹⁴³ Hieraus ergibt sich eine Steigerung der IL-12-Aktivität als ein Ziel in der immunstimulatorischen Therapie der Immunparalyse. Aus Publikationen anderer Arbeitsgruppen lässt sich allerdings vermuten, dass die IL-12-Produktion durch GM-CSF-Therapie wenig beeinflussbar ist. So zeigen Vorarbeiten durch Flohé et al. im murinen Sepsismodell eine mangelhafte Revertierung der IL-12-Produktionskapazität durch dendritische Zellen nach *ex vivo*-Stimulation mit GM-CSF. Die

5 Diskussion

Autoren beobachteten die Wiederherstellung einer initial kompromittierten Fähigkeit zur Zytokinproduktion durch Makrophagen. Allerdings wurde trotz Hochregulierung co-stimulatorischer Signale wie CD40 und CD86 keine Stimulation einer lymphozytären Th1-Antwort erreicht, da die hierfür maßgebliche IL-12-Produktion dendritischer Zellen durch GM-CSF/INF γ -Stimulation nur ungenügend beeinflusst wird.¹³⁶

In der vorliegenden Arbeit wurde die biologisch aktive Form als IL12-p70 nach TLR-Stimulation gemessen. Mit der verwendeten Messmethode waren jedoch keine messbaren Werte in Vollblut-Stimulationsansätzen von Sepsis-Patienten nachzuweisen. Das als Heterodimer vorliegende IL12-p70 wird in nur sehr geringen Mengen gebildet und überdies schnell abgebaut; wahrscheinlich lagen die Konzentrationen unter der Nachweisgrenze der Messmethode im Zellüberstand (siehe Kapitel 3.2.8.2). Insofern lässt sich nur indirekt vermuten, dass ähnlich zu den von Flohé et al. publizierten Daten im murinen Sepsis-Modell^{115,136} die Rekonstitution der IL-12-Produktion durch myeloide DC außerhalb des Wirkspektrums von GM-CSF liegen könnte.

Plasmazytoide DC spielen eine herausragende Rolle in der anti-viralen Immunität. Nach Stimulation ihres intrazellulär lokalisierten TLR-9 sind sie hochaktive Sekretoren von IFN- α und IL-8. Zwar wird TLR-9 auch in B-Lymphozyten exprimiert, jedoch führt eine Stimulation zu einer deutlich geringeren bzw. fehlenden Produktion von IFN- α oder IL-8 im Vergleich zu pDC. Deshalb erlaubt die Stimulierung von TLR-9 mit CpG-A-ODN (vergleiche Kapitel 3.2.6.3) auch im unseparierten Vollblutstimulationsmodell eine spezifische Aussage über die sekretorische Funktion plasmazytoider DC.^{15,112-114}

In den wenigen Vorarbeiten zur pathophysiologischen Rolle der plasmazytoiden DC in der Sepsis wurde eine numerische Reduktion und funktionelle Deaktivierung dokumentiert. So beobachteten Poehlmann et al. eine tiefgreifende und langanhaltende Depression der *ex vivo*-IFN- α -Produktionsfähigkeit plasmazytoider DC in septischen Patienten im Vergleich mit Probanden.¹⁹

Zu keinem Zeitpunkt konnte in der Placebo- oder GM-CSF-Gruppe detektierbare Konzentrationen von IFN- α in Vollblut-Stimulationsansätzen gemessen werden. Da in Vollblut-Kulturansätzen gesunder Blutspender eine deutliche IFN-Produktion nach CpG-A-ODN Stimulation detektierbar ist (siehe Poehlmann et al), könnte eine mögliche Ursache für den fehlenden IFN-Nachweis in dieser Studie in der ausgeprägten pDC-Zytopenie in diesem Patientenkollektiv liegen. Die Produktion von IL-8 wurde hingegen durch GM-CSF sowohl im zeitlichen Verlauf als auch im Zwischengruppen-Vergleich gegenüber Placebo signifikant erhöht. Die Aussagekraft dieser Beobachtung wird limitiert durch die Tatsache, dass bereits zu

Studienbeginn die Konzentration von IL-8 in der GM-CSF-Gruppe höher als in der Placebo-Gruppe lag; siehe Kapitel 4.8.3 und Abb. 24.

In der Zusammenschau kann ein geringgradiger Effekt von GM-CSF auf die *ex vivo*-Sekretionskapazität des pro-inflammatorischen IL-8 durch plasmazytoide DC in der Sepsis angenommen werden. Der fehlende Nachweis der IFN- α -Aktivität im durchgeführten Platten-ELISA (siehe Kapitel 3.2.8.) kann mittels verschiedener Hypothesen erklärt werden. Zum einen besteht die Möglichkeit einer absoluten Dysfunktionalität der plasmazytoiden DC im Kontext der Sepsis im Sinne einer hochgradigen Suppression der Produktion und/oder Sekretion des Zytokins sowie die Möglichkeit einer weitgehenden Nicht-Sensibilität plasmazytoider DC auf GM-CSF-Stimulation. Wahrscheinlicher erscheint andererseits ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren: die fehlende GM-CSF-Rezeptor-Expression auf plasmazytoiden DC, die sehr geringe Zellfrequenz im Vollblut septischer Patienten, eine – zumindest teilweise – unphysiologische TLR-Stimulation bei geringerer Zell-Zell-Interaktion sowie eine mangelnde Sensitivität der angewandten Testmethode bei niedriger IFN- α -Konzentration im Zellüberstand.

In zukünftigen Studien sollte deshalb eine Anreicherung der plasmazytoiden DC, zum Beispiel mittels Ficoll-Separation (PBMC) erfolgen; weiterhin sollte neben der Zytokin-Messung im Zellüberstand eine intrazelluläre Messung des produzierten Zytokins durchgeführt werden.¹⁹

Stärken und Schwächen der immunstimulatorischen Therapie mit GM-CSF im Hinblick auf Wiederherstellung der zellulären Immunität

Abschließend soll nun der in der vorliegenden Studie beobachtete Effekt von GM-CSF auf die in septischen Patienten global beeinträchtigte zelluläre Immunität („Immunparalyse“) zusammenfassend bewertet werden, wobei insbesondere Stärken und Limitationen des gewählten Modells im Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen Vorarbeiten analysiert und bewertet werden sollen.

Die Haupthypothese dieser prospektiven, randomisierten, doppelblind Placebo-kontrollierten Studie lautete: Die Revertierung der Funktion monozytärer Zellen wird durch eine immunstimulatorische Therapie mit GM-CSF in septischen Patienten erreicht. Der immunstimulatorische Ansatz mit GM-CSF findet Bestätigung durch eine gegenüber Placebo signifikante Erhöhung der Expression von HLA-DR und co-stimulatorischen Molekülen sowie eine Verbesserung des Produktionsmusters eines breiten Spektrums pro- und anti-inflammatorischer Zytokine nach Stimulation durch TLR.

In der durchflusszytometrischen Analyse verschiedener Monozytenpopulationen scheint sich der Effekt von GM-CSF vor allem auf klassische CD14⁺CD16⁻-Monozyten zu zeigen, sowohl in Bezug auf deren Frequenz als auch auf die Expression von MHC- und co-stimulatorischen

5 Diskussion

Oberflächenmolekülen. Hingegen wird die zahlenmäßig deutlich kleinere Population „pro-inflammatorischer“ CD14⁺CD16⁺-Monozyten durch GM-CSF nicht signifikant stimuliert.

Der Effekt von GM-CSF-Therapie auf Phagozytose und Antigen-Präsentation wurde im Rahmen dieser Studie nicht untersucht; insofern kann keine schlüssige Aussage über diese Aspekte der monozytären Funktion getroffen werden.

Neben Monozyten wurden auch myeloide und plasmazytoide dendritische Zellen (DC) septischer Patienten phänotypisch (Durchflusszytometrie) und funktionell (*ex vivo*-TLR-Stimulationen) unter GM-CSF-Therapie charakterisiert. Hierbei scheint der stimulierende Effekt von GM-CSF in der Sepsis vor allem auf myeloide DC im Sinne einer Erhöhung ihrer Frequenz und Mehrexpression aktivierender Oberflächenmoleküle wirksam zu sein. Plasmazytoide DC scheinen durch GM-CSF weniger beeinflussbar, wobei sich auch hier eine geringgradige Aktivierung beobachten ließ (erhöhte IL-8-Sekretion).

Generell wurde die Zytokinproduktion nach *ex vivo*-TLR-Stimulation im unseparierten Vollblutmodell ausschließlich global erhoben. Dieses System erlaubt auf relativ einfache Weise die Erfassung und Quantifizierung der (sekretorischen) Funktion verschiedener Zellpopulationen über die Messung der sezernierten Zytokine in der flüssigen Phase des Zellüberstandes (vgl. Kapitel 3.2.6). Allerdings birgt diese Technik einige nicht zu unterschätzende Limitationen. Wegen der im Kontext der schweren Sepsis anzunehmenden DC-Penien zum Beispiel ist eine ausreichende Zellzahl im Versuchsansatz nicht immer gewährleistet. Hierdurch kann bei mangelnder Sensitivität der Messmethode ein falsch-negatives Messergebnis die Folge sein; beispielsweise konnte in der vorliegenden Arbeit keine INF- α -Konzentration nach Stimulation mit TLR9-Liganden detektiert werden. Neben einer in der Sepsis anzunehmenden Dysfunktion von PDC spielt hierbei sicherlich die im Vollblut-System sehr geringe Zellzahl von PDC eine wesentliche Rolle. In künftigen Untersuchungen könnte in Stimulationstest in vorher isolierten mononukleären Zellen (PBMC), wie in Voruntersuchungen durch Poehlmann et al. beschrieben, eine erhöhte Sensitivität erreicht werden.¹⁹

Eine Untersuchung isolierter Zellpopulationen oder der Zytokinproduktion auf zellulärer Ebene, z.B. mittels intrazellulärer Färbung im Durchflusszytometer, wurde nicht durchgeführt. Der jeweilige Grad der funktionellen Wiederherstellung einzelner Subpopulationen sowie der Mechanismus des zugrundeliegenden Defekts (eingeschränkte Produktion versus mangelhaften Sekretionsmechanismus mit konsekutiver intrazellulärer Akkumulation) bleiben also zumindest teilweise spekulativ. Durch Kenntnis des jeweiligen TLR-Repertoires einzelner Zellpopulationen (z.B. TLR-9 in PDC, nicht aber auf MDC oder Monozyten exprimiert; vgl. Tabelle 2 in Kapitel 1.1.3) und die in den individuellen Stimulations-Ansätzen verwendeten TLR-Liganden kann

5 Diskussion

dennoch in der Interpretation eine gewisse Spezifität erreicht werden. Weiterhin lässt sich vermuten, dass der Grad der über Durchflusszytometrie gemessenen Aktivierung von HLA-DR und co-stimulatorischen Molekülen auf zellulärer Ebene mit der Wiederherstellung der pro-inflammatorischen, sekretorischen Funktion der jeweiligen Zell-Subpopulation korreliert ist.

Zusammenfassend bewirkt die GM-CSF-Therapie septischer Patienten in der späten Phase der Hypoinflammation eine eindeutige Stimulierung der pro-inflammatorischen Funktion und Antigen-Präsentation bei Dämpfung der anti-inflammatorischen Funktion (Sekretion von IL-10); Protagonisten sind hierbei monozytäre Zellen der Immunität. Allerdings muss erwähnt werden, dass die Initiierung einer spezifischen Th1-lymphozytären Immunreaktion – neben einer effektiven Antigen-Präsentation durch APC maßgeblich moderiert durch das von myeloiden produzierte DC IL-12 – durch das Wirkspektrum von GM-CSF wahrscheinlich nur ungenügend beeinflusst wird.¹³⁶

Insofern stellt sich die Frage, ob die Revertierung des globalen Immundefekts „septische Immunparalyse“ durch eine immunstimulatorische Therapie mittels eines einzelnen Zytokins – im vorliegenden Fall mit einem weitgehend “myeloiden“ Wirkprofil (siehe GM-CSF Rezeptorexpression) – erreicht werden kann oder ob nicht vielmehr eine Substanz breiteren Wirkspektrums oder aber gar eine immunstimulatorische „Kombinationstherapie“ für eine suffiziente Revertierung der Immunfunktion nötig wären.^{51,136,144} Diesbezüglich ist auf die erfolgreiche Revertierung der Immunparalyse in einer von Döcke et al. bereits 1997 publizierten IFN- γ -Pilotstudie hinzuweisen.⁸³ Trotz teilweise noch widersprüchlicher Ergebnisse aus Untersuchungen *ex vivo* und *in vivo* scheint, verglichen mit GM-CSF, INF- γ ein breiteres Wirkspektrum aufgrund einer globaleren Rezeptorexpression aufzuweisen. Somit hat IFN- γ , neben der Stimulation der monozytären Funktion, auch einen gewissen aktivierenden Effekt auf dendritische und lymphozytäre Zellen und könnte zu einer effektiveren Initiierung einer protektiven Th1-lymphozytären Immunantwort führen.¹³⁶

Die vorangehend diskutierten Ergebnisse sind im Zusammenhang zu sehen mit Vorarbeiten verschiedener Arbeitsgruppen zur Wirkung von GM-CSF auf die zelluläre Immunität in der hypoinflammatorischen Phase der Sepsis. Untersuchungen durch die Gruppe um Flohé konnten die Reversibilität der Immundepression, definiert über verminderte monozytäre HLA-DR-Expression und LPS-induzierte TNF- α -Produktion, durch *ex vivo*-Vollblutstimulation mit GM-CSF in Patienten mit schwerem Trauma und Sepsis zeigen.^{104,140} In einer Placebo-kontrollierten, unverblindeten klinischen Interventionsstudie von Rosenbloom et al. wurde die Aktivierung funktioneller Entzündungsmarker (CD11b und HLA-DR) auf neutrophilen Granulozyten und Makrophagen durch GM-CSF in der Sepsis nachgewiesen.¹⁰³ Nierhaus et al. veröffentlichten

2003 Ergebnisse einer ersten Studie mit Anwendung von GM-CSF in septischen Patienten und zeigten, dass durch GM-CSF die monozytäre HLA-DR-Expression und *ex vivo*-TNF- α -Produktion erhöht werden kann.⁹⁶

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen den in Voruntersuchungen beschriebenen Effekt von GM-CSF auf die Monozytenfunktion in der Sepsis. Darüber hinaus erweitern sie das Spektrum phänotypischer und funktioneller Aspekte in mononukleären Zellpopulationen unter immunstimulatorischer GM-CSF-Therapie in einem Immunmonitoring-stratifizierten, doppelblind Placebo-kontrollierten Patientenkollektiv der schweren Sepsis mit Immunparalyse.

5.2 Veränderungen des Differentialblutbildes unter GM-CSF-Therapie

Neutrophile Granulozyten

Die erste Phase der Abwehrreaktion des Körpers ist durch eine Rekrutierung von Akteuren der innaten Immunität an den Ort der Erreger-Exposition gekennzeichnet. Lokale Zellen wie Gewebsmakrophagen und Mastzellen führen über Sekretion von Zytokinen und Chemokinen wie Histamin, TNF- α , IL-1 und IL-8 zu Vasodilatation, Expression von Adhäsionsmolekülen des Endothels und somit zu Akkumulation von Immunzellen im Gewebe. Protagonisten dieser ersten, unspezifischen Phase sind neutrophile Granulozyten, die innerhalb von Stunden über erhöhte Hämatopoiese und gezielte Rekrutierung sowohl im peripheren Blut als auch am Entzündungsort ansteigen.^{12,16-18}

Der Schwerpunkt der vorliegenden Studie lag auf der phänotypischen und funktionellen Charakterisierung Antigen-präsentierender Zellen (APC) in Patienten mit schwerer Sepsis und der Revertierung ihrer Funktion durch GM-CSF. Die in diesem Zusammenhang im Differentialblutbild beobachtete Monozytose ist im Kapitel 4.5.2 beschrieben.

Im Hinblick auf neutrophile Granulozyten kann festgehalten werden, dass es durch GM-CSF gegenüber Placebo zu einer schnellen (innerhalb von 24 Stunden nach Therapiebeginn, an Visitentag 2) und andauernden (bis Therapieende an Visitentag 9), signifikanten Erhöhung ihrer Zellzahl kommt; vergleiche Kapitel 4.5.1 und Abb. 11. Hierbei wurde eine gute Verträglichkeit des Medikaments beobachtet; insbesondere die gefürchtete Komplikation eines Lungenversagens (ARDS) aufgrund Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im pulmonalen Gefäßbett, mit konsekutiv erhöhter Kapillarpermeabilität, trat nicht auf.^{26,98,115}

Phänotypische und funktionelle Aspekte neutrophiler Granulozyten, wie die Hochregulation von Oberflächenrezeptoren (z.B. CD64), Phagozytose-Fähigkeit, Produktion reaktiver Sauerstoff-Radikale oder eine verbesserte proteolytische Funktion, wurden nicht untersucht. Insofern kann

die Frage einer möglichen Beeinflussung ihrer funktionellen Aktivität im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beantwortet werden.

T-Lymphozyten

Ein weiterer Teilaspekt des globalen Immundefektes der schweren Sepsis betrifft das lymphozytäre System mit einer allgemein beeinträchtigten adaptiven Immunantwort. Aufgrund mangelhafter Antigen-Präsentation und einer substantiellen, insbesondere Effektor-T- und B-Zellen betreffenden erhöhten Apoptoserate wird in der Sepsis eine Lymphopenie und lymphozytäre Dysfunktion beobachtet.⁸⁴ So sind Dysbalancen im Gleichgewicht von CD25⁺ regulatorischen Zellen und Effektorzellen sowie eine Verschiebung der Ratio des Th1/Th2-Systems mit Vorherrschen der Produktion anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-4 und IL-10 beschrieben und deren prognostischer Einfluss dokumentiert.⁸⁸

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit auch der potentielle Einfluss einer GM-CSF-Therapie auf die T-lymphozytäre Immunität untersucht. Es fand sich ein signifikanter Anstieg sowohl von CD4⁺- als auch von CD8⁺-T-Zellen im Behandlungsintervall; vergleiche Kapitel 4.5.3.1.1 und Abb. 14 und 15.¹¹⁵ Der dieser (numerischen) T-Zell-Erholung zugrunde liegende Mechanismus ist nicht bekannt; es lässt sich vermuten, dass weniger ein direkter Effekt von GM-CSF auf die T-Lymphozyten als vielmehr eine Kombination aus optimierter APC-Funktion und verbesserter Erreger-Clearance und damit einer verminderten Mikroorganismen-vermittelten Lymphozyten-Apoptose ursächlich sind. Untersuchungen zur T-Zell-Funktion wurden im Rahmen der vorliegenden Studie nicht durchgeführt; allerdings ist aus Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (K. Hetzger) bekannt, dass eine Erholung der T-Zell-Funktion septischer Patienten durch GM-CSF nicht erreicht wird. Vermutlich wäre hierzu eine direkte Stimulation lymphozytärer Zellen bzw. Interventionen zur Steigerung der Lymphopoese notwendig.^{51,144}

Messungen der Zellfrequenzen von NK- und B-Zellen ergaben keinen signifikanten Einfluss durch GM-CSF; vergleiche Kapitel 4.5.3.2.

5.3 Zirkulierende inflammatorische Mediatoren unter GM-CSF-Therapie

Im Plasma gemessene lösliche Mediatoren wie IL-6, IL-10, TNF- α , PCT und GM-CSF sind als Surrogatparameter der systemischen Entzündungsreaktion in der Sepsisdiagnostik zu verstehen.

Neben dem Versuch, durch die Messung der Endprodukte verschiedener Kaskaden das komplexe pathophysiologische Geschehen der Sepsis abzubilden, wird durch eine günstige Kombination verschiedener Biomarker angestrebt, eine Risiko-Stratifizierung und ätiologische

5 Diskussion

Differenzierung (infektiöse vs. inflammatorische und bakterielle vs. virale Genese) zu erreichen. Einige der beschriebenen Biomarker können im Verlauf als Gradmesser der Therapie-Antwort dienen. Weiterhin ist für einige inflammatorische Mediatoren (IL-6, IL-10 und PCT) eine prognostische Bedeutung sowie Korrelation der Höhe ihrer Plasmaspiegel mit der Mortalität in Patienten mit schwerer Sepsis beschrieben worden.^{51,145}

Wichtige Limitationen der Validität löslicher Mediatoren sind die Pleiotropie der einzelnen Akteure sowie die sich rasch ändernden Plasma-Konzentrationen von Mediatoren mit teilweise extrem kurzen Plasmahalbwertszeiten. Zudem können die im Plasma gemessenen Zytokine aus unterschiedlichen Quellen stammen, so werden Zytokine auch von Nicht-Immunzellen wie Endothelien oder Epithelzellen gebildet.^{18,146} So muss erwähnt werden, dass aufgrund teilweise widersprüchlicher Ergebnisse mit Ausnahme von PCT bisher kein einzelner Parameter Eingang in die routinemässige Diagnostik und das Monitoring des Immunstatus des septischen Patienten gefunden hat.⁵¹

In der vorliegenden Studie wurden im Verlauf die Plasmakonzentrationen von GM-CSF, IL-6, IL-10, TNF- α und PCT in beiden Studienpopulationen gemessen. Für die Parameter mit prognostischer Relevanz wie IL-6, IL-10 und PCT ergaben sich im Zwischengruppen-Vergleich keine signifikanten Unterschiede unter GM-CSF-Therapie; siehe Kapitel 4.6 und Tabelle 9. Für PCT als Indikator einer (bakteriellen) Infektion wurde in der GM-CSF-Gruppe eine deutliche, jedoch nicht signifikante Abnahme der Plasmaspiegel im Studienverlauf festgestellt. Dies könnte durch eine verminderte Rate an Sekundärinfektionen aufgrund verbesserter Immunkompetenz nach GM-CSF-Therapie erklärt werden. Vermutlich repräsentiert die im Studienverlauf beobachtete signifikante Erhöhung ($p=0.02$) der TNF- α -Plasmaspiegel durch GM-CSF-Therapie eine Verbesserung der pro-inflammatorischen Funktion. Innerhalb der Kontroll-Gruppe lagen die TNF- α -Spiegel ab Studienbeginn über der GM-CSF-Gruppe, jedoch zeigte sich keine Veränderung im Verlauf. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit publizierten Daten, die eine Korrelation erhöhter TNF- α -Plasmakonzentrationen mit verbessertem Überleben in Patienten mit septischem Schock aufzeigen.^{115,147} Erwartungsgemäß wurden im Studienverlauf nach GM-CSF-Therapie gegenüber Placebo signifikant erhöhte Plasma-Konzentrationen von GM-CSF gemessen. Aus Vorarbeiten anderer Arbeitsgruppen ist bekannt, dass GM-CSF-Plasmakonzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden bei septischen Patienten erniedrigt und zugleich mit einer höheren Mortalität assoziiert sind. In diesem Zusammenhang ist von einer relativen Defizienz des pro-inflammatorischen Mediators GM-CSF im Rahmen einer Sepsis auszugehen. Hieraus begründet sich die Rationale für eine GM-CSF-Therapie septischer Patienten.¹²¹

Aus den beschriebenen Beobachtungen ergibt sich einschränkend, dass zu Studienbeginn an V1 noch vor Interventionsbeginn bereits innerhalb der GM-CSF-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe höhere Plasmawerte für IL-6, IL-10 und PCT sowie niedrigere Ausgangswerte für TNF- α festgestellt wurden. Wenn auch die Unterschiede der vorgenannten Mediatoren im Zwischengruppen-Vergleich nicht signifikant waren, können sie dennoch eine Einschränkung der Aussagekraft der erhobenen Ergebnisse im Studienverlauf bedeuten. Im Prinzip sind diese in der GM-CSF-Gruppe beobachteten Konstellationen mit erhöhter Mortalität in der Sepsis korreliert und bedeuteten insofern „schlechtere“ Ausgangsbedingungen für die GM-CSF-Gruppe und wahrscheinlich eine Unterschätzung eines etwaigen durch GM-CSF-Therapie erreichten Vorteils.^{145,147,148}

5.4 Effekt von GM-CSF auf den klinischen Verlauf in der schweren Sepsis

Neben der effektiven Wiederherstellung der monozytären Immunkompetenz in septischen Patienten mit Organversagen konnte in der vorliegenden Studie unter GM-CSF-Therapie ein positiver Effekt auf den klinischen Verlauf in diesem Patientenkollektiv beobachtet werden. Hierbei wurden neben gebräuchlichen intensivmedizinischen Scores (APACHE II, SAPS II, SOFA) auch Ventilationsparameter und Auswirkungen auf die Mortalität untersucht.

In der Literatur finden sich wenige Daten hinsichtlich des klinischen Outcomes septischer Patientenkollektive unter GM-CSF-Therapie. Die durch Nierhaus et al. durchgeführte „open-label“-Pilotstudie zeigte keinen wesentlichen Effekt von GM-CSF auf den Punktwert des intensivmedizinischen SOFA-Scores von Patienten mit schwerer Sepsis.⁹⁶ In einer Placebo-kontrollierten Studie mit 40 Patienten mit schwerer Sepsis berichten Rosenbloom et al. von einem positiven Effekt auf laborparametrische und paraklinische Daten sowie einer verbesserten Kontrolle des infektiösen Geschehens durch GM-CSF; allerdings konnten auch hier keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Organdysfunktion (gemessen anhand intensivmedizinischer Scores), Dauer des Krankenhausaufenthaltes und Mortalität an Visitentag 28 festgestellt werden.¹⁰³ In einer weiteren von Orozco et al. publizierten randomisierten, Placebo-kontrollierten Studie in Patienten mit abdominalem Sepsisfokus wurde ein positiver Effekt von GM-CSF in Bezug auf infektiöse Sekundärkomplikationen, Länge der Hospitalisierung und Ressourcenaufwand konstatiert. Es muss angemerkt werden, dass es sich um ein septisches Patientenkollektiv ohne Organversagen handelte.¹¹⁹ Weiterhin ist zu betonen, dass – mit Ausnahme der von Nierhaus et al. durchgeführten Studie sowie einer unlängst von Hall et al. publizierten Untersuchung mit pädiatrischem Patientengut – in den vorangehend erwähnten Arbeiten keine Evaluation der Immunfunktion vor der eigentlichen

5 Diskussion

immunstimulatorischen Intervention durchgeführt wurde.^{96,149}

Hinsichtlich der Verträglichkeit und Sicherheit in der Anwendung der Studienmedikation GM-CSF wurden in der vorliegenden Studie keine Unverträglichkeiten oder schwere Nebenwirkungen wie Anaphylaxie oder „capillary-leak“-Syndrom beobachtet; es kann somit von einem ausreichenden Sicherheitsprofil der Substanz im Kontext der schweren Sepsis ausgegangen werden. Hiermit werden die publizierten Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen bestätigt.^{96,101–103}

Trotz einer relativ kleinen Patientenzahl von 19 Patienten pro Studienarm konnte in der vorliegenden Studie ein tendenzieller Unterschied im klinischen Verlauf zwischen beiden Studiengruppen gezeigt werden. So waren die Dauer der Gesamthospitalisierung und des Aufenthaltes in intensivmedizinischer Betreuung in der GM-CSF-Gruppe kürzer. Die Dauer der mechanischen Beatmung war in der GM-CSF-Gruppe signifikant verkürzt. Diese Beobachtung steht in Einklang mit tierexperimentellen Daten, die eine mit GM-CSF assoziierte Verbesserung der pulmonalen Funktion beschreiben.¹⁵⁰

Weiterhin kann gefolgert werden, dass durch GM-CSF die Schwere des septischen Krankheitsbildes insgesamt gemildert und die Erholung des Multiorganversagens septischer Patienten unterstützt wird. Diese Annahme lässt sich aufgrund der im Vergleich zu Placebo unter GM-CSF-Therapie größeren Verbesserung der Punktwerte intensivmedizinischer Scores wie APACHE II, SAPS II und SOFA treffen; siehe Kapitel 4.9 und Tabelle 11. Allerdings ergab sich in längerfristiger Perspektive (Visitentag 28) kein Unterschied zwischen den Scorewerten beider Behandlungsgruppen ($p > 0.25$). Weiter ließ sich trotz der Tendenz einer schnelleren Erholung der Organdysfunktionen kein Effekt von GM-CSF auf die 28-Tage-Mortalität septischer Patienten dokumentieren.¹¹⁵ In dieser Hinsicht steht die vorliegende Arbeit in der Kontinuität anderer vorangegangener Studien zur Wirksamkeit einer immunstimulatorischen Therapie der Sepsis, die bisher ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die Mortalität nachweisen konnten.^{101,103} Als ein Hauptgrund mag die bei einer Gesamtpopulation von nur 38 Patienten in zwei Studienarmen nicht ausreichende Trennschärfe („power“) der Studie gelten. Weiterhin limitierend für den Aussagewert der diskutierten Ergebnisse mögen – trotz weitgehend gleichförmiger Verteilung über beide Studienarme – die heterogene Patientenpopulation (internistische und chirurgische Patienten) und ein nicht homogenes Erregerspektrum gelten; siehe Kapitel 4.1 und Tabellen 7 und 8. Zudem lagen die Initialwerte der verwendeten intensivmedizinischen Scores APACHE II, SAPS II und SOFA zu Studienbeginn tendenziell höher in der Placebo-Gruppe als in der GM-CSF-Gruppe; siehe Kapitel 4.9, Tabelle 11. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachteten klinischen Effekte der Studienmedikation – gemessen anhand der Verbesserung

5 Diskussion

der genannten klinischen Scores – wenigstens teilweise diesem Umstand geschuldet sind. Dennoch wird diese mögliche Verzerrung durch die Tatsache gemildert, dass die ihrerseits mit einer erhöhten Mortalität assoziierten Plasmamediatoren IL-6, IL-10, PCT und TNF- α zu Studienbeginn in der GM-CSF-Gruppe in erhöhten Konzentrationen vorlagen (siehe Kapitel 4.6 mit Tabelle 9 und Kapitel 5.3). Zusammenfassend kann somit von einer relativ ausgeglichenen Initialsituation beider Studiengruppen ausgegangen werden.

Als weitere Limitationen der Studie sind die unzureichende Nachbeobachtung immunologischer (HLA-DR), paraklinischer (CRP und PCT im Plasma) und klinischer Parameter (Infektionsüberwachung) zu nennen, die eine genauere Interpretation der erhobenen Daten an Visitentag 28 erschweren. Wichtig scheint ausserdem anzumerken, dass die Gesamtmortalität der gesamten Studienpopulation (21% in GM-CSF-Gruppe und 16% in Kontrollgruppe) im Vergleich zu anderen Kollektiven der schweren Sepsis und septischen Schocks relativ niedrig liegt. Die Gründe hierfür können vielfältiger Natur sein, wie die Zusammenstellung des Patientenguts oder das Spektrum der Grunderkrankungen.

6 Zusammenfassung und Ausblick

Trotz großen intensivmedizinischen Ressourceneinsatzes stellen die schwere Sepsis und der septische Schock mit einer Inzidenz von ca. 300/100.000 Einwohner jährlich und hohen Mortalitätsraten immer noch eine Haupttodesursache in den Industrienationen dar.

Nach heutigem Verständnis wird die für das pathophysiologische Verständnis der schweren Sepsis fundamentale Immunantwort des Organismus modellhaft als ein Geschehen biphasischen Charakters betrachtet, wobei einer frühen hyperinflammatorischen Phase (SIRS) eine kompensatorische hypo/anti-inflammatorische Komponente (CARS) folgt.^{39,47,51}

Von zentraler Bedeutung im Verlauf einer schweren Sepsis ist die Dysfunktion des zellulären Immunsystems mit besonderer Beeinträchtigung der Phagozytose, Antigen-Präsentation und Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch das monozytär-makrophagozytäre System. Verbunden mit einer tiefen Beeinträchtigung der T-lymphozytären Immunität wird dieser Zustand der so genannten Immunparalyse im späteren zeitlichen Verlauf der Sepsis beobachtet und ist korreliert mit einem erhöhten Risiko für sekundäre infektiöse Komplikationen.¹¹⁸

Weiterhin konnten verschiedene Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen der durch die Minderexpression monozytärer HLA-DR-Moleküle definierten Immunparalyse und einer Verschlechterung des klinischen Outcomes septischer Patienten während der späten Phase der Sepsis zeigen.^{83,116,120,123,124} Zunehmend wird die Defizienz des „Organs“ Immunsystem als integraler Bestandteil des Multiorganversagens in der Sepsis begriffen.^{76,77,83,107,116,120,123,124}

Im Kontext der trotz fortschrittlicher intensivmedizinischer Therapie weiterhin schlechten Prognose mit hohen Mortalitätsraten der schweren Sepsis und des septischen Schocks ergibt sich die Rationale für die Durchführung klinischer Studien mit immunstimulatorischem Ansatz und dem Bemühen, eine Rekonstitution der defizienten Immunfunktion zu erzielen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig in einer Biomarker-basierten, prospektiven, randomisierten, doppelblind Placebo-kontrollierten klinischen *proof of concept*-Phase IIa-Studie gezeigt werden, dass der immunstimulatorische Ansatz mit GM-CSF eine sichere und effektive Möglichkeit darstellt, eine Wiederherstellung der monozytären Immunkompetenz, gemessen anhand der monozytären HLA-DR-Expression, in Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock im Zustand der Immunparalyse zu erreichen (siehe Kapitel 4.3 und Abb. 9).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass GM-CSF im Vergleich zu Placebo zu einer signifikant schnelleren Erholung der funktionellen monozytären Immunkompetenz führt, was durch die

6 Zusammenfassung und Ausblick

Normalisierung der Produktion pro-inflammatorischen TNF- α nach TLR-Stimulation belegt werden konnte (siehe Kapitel 4.4 und Abb 10).¹¹⁵ Zudem wurden monozytäre Subpopulationen (CD14⁺CD16⁻ und CD14⁺CD16⁺) und dendritische Zellen (MDC und PDC) als Repräsentanten der Antigen-präsentierenden Zellen (APC) durchflusszytometrisch und mittels Stimulationsassays untersucht und durch das Expressionsmuster co-stimulatorischer Oberflächenmoleküle wie CD40 und CD86 phänotypisch und funktionell unter GM-CSF-Therapie charakterisiert. Während sich eine signifikante Aktivierung monozytärer Zellen beobachten ließ, war der aktivierende Einfluss von GM-CSF auf dendritische Zellen gering. GM-CSF führte zu einer schnelleren Erholung der Frequenzen von T-Lymphozyten des peripheren Blutes; es konnte aber keine Verbesserung der T-Zell-Funktion beobachtet werden.

Trotz einer im Hinblick auf klinische Fragestellungen sicherlich nicht ausreichenden Studiengröße (n=38 Patienten), konnte eine signifikant verkürzte Dauer der künstlichen Beatmung (Ventilationszeit) als Parameter einer verbesserten pulmonalen Funktion und eine Tendenz zu einer Verbesserung des nach intensivmedizinischen Scores beurteilten klinischen Verlaufs unter GM-CSF beobachtet werden. Weiterhin waren die Dauer der intensivmedizinischen Betreuung und der Gesamthospitalisierung in der Behandlungsgruppe verkürzt. Ein statistisch signifikanter Effekt auf die 28 Tage-Mortalität durch GM-CSF konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (siehe Tabelle 11).

Es wurden unter GM-CSF keine Unverträglichkeitsreaktionen beobachtet, wodurch die Sicherheit und Durchführbarkeit des immunstimulatorischen Konzepts im Patientenkollektiv der schweren Sepsis/septischen Schocks belegt werden. In diesem Zusammenhang ist die Stratifizierung der Patienten nach Schwere der Immunparalyse mittels eines standardisierten Verfahrens als essentiell zu werten. Um den Effekt der Immunstimulation mit GM-CSF auf das klinische Outcome und in letzter Instanz auf die Mortalität der schweren Sepsis fundiert beurteilen zu können, wird die Durchführung einer kontrollierten Multicenter-Studie mit ausreichend großer Teststärke ausschlaggebend sein.

Letztendlich stellt sich die Frage, ob das Prinzip der Immunstimulation durch das „myeloide“ Zytokin GM-CSF im Kontext eines subtileren Verständnis des pathophysiologischen Geschehens der globalen Immunparalyse allein ausreicht oder ob es nicht vielmehr einer Kombinations-Therapie erweiterten Spektrums und synergistischen Ansatzes bedarf, um eine suffiziente und nachhaltige Erholung der immunologischen Funktion mit resultierender Senkung der Mortalität zu erreichen. In diesem Zusammenhang existieren erste vorklinische und klinische Phase-I-Untersuchungen zur Blockade anti-inflammatorischer Mediatoren,⁵¹ zur Stimulation der APC-Funktion^{40,128,142} und zur Unterstützung der Funktion des T-lymphozytären Systems.^{51,84,144}

7 Literaturverzeichnis

1. From the Centers for Disease Control. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia--United States, 1979-1987. *Jama*. 1990;263:937-8.
2. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*. 2003;348:1546-54.
3. Angus DC, Pereira CA, Silva E. Epidemiology of severe sepsis around the world. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006;6:207-12.
4. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001;29:1303-10.
5. Moerer O, Schmid A, Hofmann M, et al. Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med*. 2002;28:1440-6.
6. www.sepsis-gesellschaft.de.
7. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*. 1992;20:864-74.
8. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003;31:1250-6.
9. Tran DD, Groeneveld AB, van der Meulen J, et al. Age, chronic disease, sepsis, organ system failure, and mortality in a medical intensive care unit. *Crit Care Med*. 1990;18:474-9.
10. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *Jama*. 1995;274:968-74.
11. Ward PA. The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:133-42.
12. Janeway jr. CA TP, Walport M, et al. Immunologie. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 2002.
13. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:991-1045.
14. Cavaillon JM, Adib-Conquy M. Monocytes/macrophages and sepsis. *Crit Care Med*. 2005;33:S506-9.
15. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2004;5:987-95.
16. Adams DH, Shaw S. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet*. 1994;343:831-6.
17. Malaviya R, Ikeda T, Ross E, Abraham SN. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature*. 1996;381:77-80.
18. Meisel C HC, Volk H-D. Pathophysiologie und Immun-Monitoring der Sepsis. Basel: Karger; 2007.
19. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk HD, Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Crit Care*. 2009;13:R119.
20. Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heitbrock HW. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 1989;74:2527-34.
21. Ziegler-Heitbrock HW, Strobel M, Kieper D, et al. Differential expression of cytokines in human blood monocyte subpopulations. *Blood*. 1992;79:503-11.
22. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, et al. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol*. 2002;168:3536-42.
23. Fingerle G, Pforte A, Passlick B, et al. The novel subset of CD14+/CD16+ blood

7 Literaturverzeichnis

- monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood*. 1993;82:3170–6.
24. Onai N, Obata-Onai A, Schmid MA, et al. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nat Immunol*. 2007;8:1207–16.
 25. Janeway CA Jr, Medzhitov R. Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response. *Semin Immunol*. 1998;10:349–50.
 26. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348:138–50.
 27. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med*. 1989;170:2081–95.
 28. Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol*. 2005;77:3–15.
 29. De Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*. 1991;174:1209–20.
 30. Platzer C, Meisel C, Vogt K, Platzer M, Volk HD. Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor-alpha and cAMP elevating drugs. *Int Immunol*. 1995;7:517–23.
 31. Hoflich C, Volk HD. [Immunomodulation in sepsis]. *Chirurg*. 2002;73:1100–4.
 32. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science*. 1985;229:869–71.
 33. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987;330:662–4.
 34. Seydel U, Oikawa M, Fukase K, Kusumoto S, Brandenburg K. Intrinsic conformation of lipid A is responsible for agonistic and antagonistic activity. *Eur J Biochem*. 2000;267:3032–9.
 35. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420:885–91.
 36. Morath S, Geyer A, Hartung T. Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med*. 2001;193:393–7.
 37. Lavoie PM, Thibodeau J, Erard F, Sekaly RP. Understanding the mechanism of action of bacterial superantigens from a decade of research. *Immunol Rev*. 1999;168:257–69.
 38. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249:1431–3.
 39. Van der Poll T. Immunotherapy of sepsis. *Lancet Infect Dis*. 2001;1:165–74.
 40. Leaver SK, Finney SJ, Burke-Gaffney A, Evans TW. Sepsis since the discovery of Toll-like receptors: disease concepts and therapeutic opportunities. *Crit Care Med*. 2007;35:1404–10.
 41. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1997;388:394–7.
 42. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999;11:443–51.
 43. Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, et al. Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:9237–42.
 44. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell*. 1993;73:457–67.
 45. Hagberg L, Briles DE, Eden CS. Evidence for separate genetic defects in C3H/HeJ and C3HeB/FeJ mice, that affect susceptibility to gram-negative infections. *J Immunol*.

- 1985;134:4118–22.
46. Debets JM, Kampmeijer R, van der Linden MP, Buurman WA, van der Linden CJ. Plasma tumor necrosis factor and mortality in critically ill septic patients. *Crit Care Med.* 1989;17:489–94.
 47. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med.* 1996;24:1125–8.
 48. Haveman JW, van den Berg AP, van den Berk JM, et al. Low HLA-DR expression on peripheral blood monocytes predicts bacterial sepsis after liver transplantation: relation with prednisolone intake. *Transpl Infect Dis.* 1999;1:146–52.
 49. Woiciechowsky C, Schoning B, Lanksch WR, Volk HD, Docke WD. Mechanisms of brain-mediated systemic anti-inflammatory syndrome causing immunodepression. *J Mol Med.* 1999;77:769–80.
 50. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002;420:853–9.
 51. Monneret G, Venet F, Pachot A, Lepape A. Monitoring immune dysfunctions in the septic patient: a new skin for the old ceremony. *Mol Med.* 2008;14:64–78.
 52. Xiao W, Mindrinos MN, Seok J, et al. A genomic storm in critically injured humans. *J Exp Med.* 2011;208(13):2581–2590.
 53. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med.* 2008;36:296–327.
 54. Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl 1:S124–8.
 55. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl 1:S64–74.
 56. Annane D, Sebille V, Charpentier C, et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *Jama.* 2002;288:862–71.
 57. Sprung CL, Annane D, Keh D, et al. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med.* 2008;358:111–24.
 58. Van den Berghe G, Wilmer A, Hermans G, et al. Intensive insulin therapy in the medical ICU. *N Engl J Med.* 2006;354:449–61.
 59. Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, et al. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. *N Engl J Med.* 2008;358:125–39.
 60. Finfer S, Chittock DR, Su SY, et al. Intensive versus conventional glucose control in critically ill patients. *N Engl J Med.* 2009;360:1283–97.
 61. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001;344:699–709.
 62. Marti-Carvajal AJ, Sola I, Lathyris D, Cardona AF. Human recombinant activated protein C for severe sepsis. *Cochrane Database Syst Rev.* CD004388.
 63. Ziegler EJ, Fisher CJ Jr, Sprung CL, et al. Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group. *N Engl J Med.* 1991;324:429–36.
 64. Dhainaut JF, Vincent JL, Richard C, et al. CDP571, a humanized antibody to human tumor necrosis factor-alpha: safety, pharmacokinetics, immune response, and influence of the antibody on cytokine concentrations in patients with septic shock. CPD571 Sepsis Study Group. *Crit Care Med.* 1995;23:1461–9.
 65. Reinhart K, Wiegand-Lohnert C, Grimminger F, et al. Assessment of the safety and efficacy of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody-fragment, MAK 195F, in patients with sepsis and septic shock: a multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-ranging study. *Crit Care Med.* 1996;24:733–42.

7 Literaturverzeichnis

66. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *Jama*. 1995;273:934-41.
67. Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, Opal SM, et al. Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *Jama*. 1994;271:1836-43.
68. Opal SM, Fisher CJ Jr, Dhainaut JF, et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med*. 1997;25:1115-24.
69. Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, et al. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 1987;317:653-8.
70. Eskandari MK, Bolgos G, Miller C, et al. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J Immunol*. 1992;148:2724-30.
71. Echtenacher B, Weigl K, Lehn N, Mannel DN. Tumor necrosis factor-dependent adhesions as a major protective mechanism early in septic peritonitis in mice. *Infect Immun*. 2001;69:3550-5.
72. Echtenacher B, Falk W, Mannel DN, Krammer PH. Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J Immunol*. 1990;145:3762-6.
73. Volk HD, Reinke P, Krausch D, et al. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med*. 1996;22 Suppl 4:S474-81.
74. Zhang X, Morrison DC. Lipopolysaccharide structure-function relationship in activation versus reprogramming of mouse peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol*. 1993;54:444-50.
75. Wolk K, Docke WD, von Baehr V, Volk HD, Sabat R. Impaired antigen presentation by human monocytes during endotoxin tolerance. *Blood*. 2000;96:218-23.
76. Docke WD, Hoflich C, Davis KA, et al. Monitoring temporary immunodepression by flow cytometric measurement of monocytic HLA-DR expression: a multicenter standardized study. *Clin Chem*. 2005;51:2341-7.
77. Monneret G, Lepape A, Voirin N, et al. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med*. 2006;32:1175-83.
78. Rigato O, Salomao R. Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis. *Shock*. 2003;19:113-6.
79. Munoz C, Carlet J, Fitting C, et al. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest*. 1991;88:1747-54.
80. Randow F, Syrbe U, Meisel C, et al. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med*. 1995;181:1887-92.
81. Wolk K, Docke W, von Baehr V, Volk H, Sabat R. Comparison of monocyte functions after LPS- or IL-10-induced reorientation: importance in clinical immunoparalysis. *Pathobiology*. 1999;67:253-6.
82. Klava A, Windsor AC, Farmery SM, et al. Interleukin-10. A role in the development of postoperative immunosuppression. *Arch Surg*. 1997;132:425-9.
83. Docke WD, Randow F, Syrbe U, et al. Monocyte deactivation in septic patients:

7 Literaturverzeichnis

- restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med.* 1997;3:678–81.
84. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol.* 2001;166:6952–63.
 85. Ayala A, Herdon CD, Lehman DL, et al. The induction of accelerated thymic programmed cell death during polymicrobial sepsis: control by corticosteroids but not tumor necrosis factor. *Shock.* 1995;3:259–67.
 86. Venet F, Pachot A, Debard AL, et al. Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med.* 2004;32:2329–31.
 87. Venet F, Pachot A, Debard AL, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes inhibit lipopolysaccharide-induced monocyte survival through a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *J Immunol.* 2006;177:6540–7.
 88. Spolarics Z, Siddiqi M, Siegel JH, et al. Depressed interleukin-12-producing activity by monocytes correlates with adverse clinical course and a shift toward Th2-type lymphocyte pattern in severely injured male trauma patients. *Crit Care Med.* 2003;31:1722–9.
 89. Felmet KA, Hall MW, Clark RS, Jaffe R, Carcillo JA. Prolonged lymphopenia, lymphoid depletion, and hypoprolactinemia in children with nosocomial sepsis and multiple organ failure. *J Immunol.* 2005;174:3765–72.
 90. Huang X, Venet F, Chung CS, Lomas-Neira J, Ayala A. Changes in dendritic cell function in the immune response to sepsis. Cell- & tissue-based therapy. *Expert Opin Biol Ther.* 2007;7:929–38.
 91. Guisset O, Dilhuydy MS, Thiebaut R, et al. Decrease in circulating dendritic cells predicts fatal outcome in septic shock. *Intensive Care Med.* 2007;33:148–52.
 92. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol.* 2002;168:2493–500.
 93. Randow F, Docke WD, Bundschuh DS, et al. In vitro prevention and reversal of lipopolysaccharide desensitization by IFN-gamma, IL-12, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol.* 1997;158:2911–8.
 94. Schroder M, Meisel C, Buhl K, et al. Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. *J Immunol.* 2003;170:5260–7.
 95. Bundschuh DS, Barsig J, Hartung T, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and IFN-gamma restore the systemic TNF-alpha response to endotoxin in lipopolysaccharide-desensitized mice. *J Immunol.* 1997;158:2862–71.
 96. Nierhaus A, Montag B, Timmler N, et al. Reversal of immunoparalysis by recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med.* 2003;29:646–51.
 97. Barreda DR, Hanington PC, Belosevic M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol.* 2004;28:509–54.
 98. Hamilton JA. GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* 2002;23:403–8.
 99. Williams GT, Smith CA, Spooncer E, Dexter TM, Taylor DR. Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature.* 1990;343:76–9.
 100. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 1994;179:1109–18.
 101. Presneill JJ, Harris T, Stewart AG, Cade JF, Wilson JW. A randomized phase II trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor therapy in severe sepsis with respiratory

- dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:138–43.
102. Myrianthefs PM, Karabatsos EG, Karatzas SP, et al. Safety and efficacy of molgramostim as an adjunctive therapy in critically ill patients with severe sepsis. *Scand J Infect Dis.* 2003;35:175–9.
103. Rosenbloom AJ, Linden PK, Dorrance A, et al. Effect of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor therapy on leukocyte function and clearance of serious infection in nonneutropenic patients. *Chest.* 2005;127:2139–50.
104. Flohe S, Lendemans S, Selbach C, et al. Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the immune response of circulating monocytes after severe trauma. *Crit Care Med.* 2003;31:2462–9.
105. Bilgin K, Yaramis A, Haspolat K, et al. A randomized trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in neonates with sepsis and neutropenia. *Pediatrics.* 2001;107:36–41.
106. Carr R, Brocklehurst P, Dore CJ, Modi N. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor administered as prophylaxis for reduction of sepsis in extremely preterm, small for gestational age neonates (the PROGRAMS trial): a single-blind, multicentre, randomised controlled trial. *Lancet.* 2009;373:226–33.
107. Pugin J. Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis Found Symp.* 2007;280:21–7; discussion 27–36, 160–4.
108. www.intensivcareunit.de.
109. www.dimdi.de.
110. www.mdcalc.com.
111. Strohmeyer JC, Blume C, Meisel C, et al. Standardized immune monitoring for the prediction of infections after cardiopulmonary bypass surgery in risk patients. *Cytom. B Clin Cytom.* 2003;53:54–62.
112. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol.* 2004;5:190–8.
113. Lund J, Sato A, Akira S, Medzhitov R, Iwasaki A. Toll-like receptor 9-mediated recognition of Herpes simplex virus-2 by plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med.* 2003;198:513–20.
114. Krug A, Luker GD, Barchet W, et al. Herpes simplex virus type 1 activates murine natural interferon-producing cells through toll-like receptor 9. *Blood.* 2004;103:1433–7.
115. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180:640–8.
116. Monneret G, Elmenkouri N, Bohe J, et al. Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. *Clin Chem.* 2002;48:1589–92.
117. Fumeaux T, Pugin J. Is the measurement of monocytes HLA-DR expression useful in patients with sepsis? *Intensive Care Med.* 2006;32:1106–8.
118. Lukaszewicz AC, Grienay M, Resche-Rigon M, et al. Monocytic HLA-DR expression in intensive care patients: interest for prognosis and secondary infection prediction. *Crit Care Med.* 2009;37:2746–52.
119. Orozco H, Arch J, Medina-Franco H, et al. Molgramostim (GM-CSF) associated with antibiotic treatment in nontraumatic abdominal sepsis: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Arch Surg.* 2006;141:150–3; discussion 154.
120. Le Tulzo Y, Pangault C, Amiot L, et al. Monocyte human leukocyte antigen-DR transcriptional downregulation by cortisol during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;169:1144–51.
121. Perry SE, Mostafa SM, Wenstone R, Shenkin A, McLaughlin PJ. Is low monocyte HLA-

- DR expression helpful to predict outcome in severe sepsis? *Intensive Care Med.* 2003;29:1245–52.
122. Fumeaux T, Pugin J. Role of interleukin-10 in the intracellular sequestration of human leukocyte antigen-DR in monocytes during septic shock. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;166:1475–82.
123. Saenz JJ, Izura JJ, Manrique A, Sala F, Gaminde I. Early prognosis in severe sepsis via analyzing the monocyte immunophenotype. *Intensive Care Med.* 2001;27:970–7.
124. Lekkou A, Karakantza M, Mouzaki A, Kalfarentzos F, Gogos CA. Cytokine production and monocyte HLA-DR expression as predictors of outcome for patients with community-acquired severe infections. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004;11:161–7.
125. Bo L, Wang F, Zhu J, Li J, Deng X. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis. *Crit. Care Lond. Engl.* 2011;15(1):R58.
126. Burgess AW, Metcalf D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood.* 1980;56:947–58.
127. Hotchkiss RS, Opal S. Immunotherapy for sepsis--a new approach against an ancient foe. *N. Engl. J. Med.* 2010;363(1):87–89.
128. Benjamim CF, Lundy SK, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Reversal of long-term sepsis-induced immunosuppression by dendritic cells. *Blood.* 2005;105:3588–95.
129. Weighardt H, Heidecke CD, Westerholt A, et al. Impaired monocyte IL-12 production before surgery as a predictive factor for the lethal outcome of postoperative sepsis. *Ann Surg.* 2002;235:560–7.
130. Nolan A, Weiden M, Kelly A, et al. CD40 and CD80/86 act synergistically to regulate inflammation and mortality in polymicrobial sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:301–8.
131. Schwulst SJ, Grayson MH, DiPasco PJ, et al. Agonistic monoclonal antibody against CD40 receptor decreases lymphocyte apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol.* 2006;177:557–65.
132. Van de Laar L, Coffey PJ, Woltman AM. Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy. *Blood.* 2012;119:3383–93.
133. Wolk K, Hoflich C, Zuckermann-Becker H, et al. Reduced monocyte CD86 expression in postinflammatory immunodeficiency. *Crit Care Med.* 2007;35:458–67.
134. Hornell TM, Beresford GW, Bushey A, Boss JM, Mellins ED. Regulation of the class II MHC pathway in primary human monocytes by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol.* 2003;171:2374–83.
135. Riccardi F, Della Porta MG, Rovati B, et al. Flow cytometric analysis of peripheral blood dendritic cells in patients with severe sepsis. *Cytom. B Clin Cytom.* 80:14–21.
136. Flohe SB, Agrawal H, Flohe S, et al. Diversity of interferon gamma and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in restoring immune dysfunction of dendritic cells and macrophages during polymicrobial sepsis. *Mol Med.* 2008;14:247–56.
137. Min L, Mohammad Isa SA, Shuai W, et al. Cutting edge: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is the major CD8+ T cell-derived licensing factor for dendritic cell activation. *J Immunol.* 2010;184:4625–9.
138. Kingston D, Schmid MA, Onai N, et al. The concerted action of GM-CSF and Flt3-ligand on in vivo dendritic cell homeostasis. *Blood.* 2009;114:835–43.
139. Perry SE, Mostafa SM, Wenstone R, Shenkin A, McLaughlin PJ. HLA-DR regulation and the influence of GM-CSF on transcription, surface expression and shedding. *Int J Med Sci.* 2004;1:126–136.
140. Flohe S, Borgermann J, Dominguez FE, et al. Influence of granulocyte-macrophage

- colony-stimulating factor (GM-CSF) on whole blood endotoxin responsiveness following trauma, cardiopulmonary bypass, and severe sepsis. *Shock*. 1999;12:17–24.
141. Curran CS, Bertics PJ. Lactoferrin regulates an axis involving CD11b and CD49d integrins and the chemokines MIP-1alpha and MCP-1 in GM-CSF-treated human primary eosinophils. *J Interferon Cytokine Res*. 2012;32:450–61.
142. Wysocka M, Robertson S, Riemann H, et al. IL-12 suppression during experimental endotoxin tolerance: dendritic cell loss and macrophage hyporesponsiveness. *J Immunol*. 2001;166:7504–13.
143. Wu HP, Shih CC, Lin CY, Hua CC, Chuang DY. Serial increase of IL-12 response and human leukocyte antigen-DR expression in severe sepsis survivors. *Crit Care*. 15:R224.
144. Hotchkiss RS, Opal S. Immunotherapy for sepsis--a new approach against an ancient foe. *N Engl J Med*. 363:87–9.
145. Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:396–402.
146. Smedman C, Ernemar T, Gudmundsdotter L, et al. FluoroSpot analysis of TLR-activated monocytes reveals several distinct cytokine secreting subpopulations. *Scand J Immunol*. 2011;
147. Riche F, Panis Y, Laisne MJ, et al. High tumor necrosis factor serum level is associated with increased survival in patients with abdominal septic shock: a prospective study in 59 patients. *Surgery*. 1996;120:801–7.
148. Marchant A, Alegre ML, Hakim A, et al. Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock. *J Clin Immunol*. 1995;15:266–73.
149. Hall MW, Knatz NL, Vetterly C, et al. Immunoparalysis and nosocomial infection in children with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med*. 2011;37:525–32.
150. Ballinger MN, Paine R 3rd, Serezani CH, et al. Role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor during gram-negative lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;34:766–74.

Lebenslauf

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

Publikationsliste

2009

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

2010

1. Moreno C, Hodgson K, Ferrer G, Elena M, Filella X, Pereira A, **Baumann T**, Montserrat E. *Autoimmune cytopenia in chronic lymphocytic leukemia: prevalence, clinical associations, and prognostic significance*. Blood 2010 Dec 2;116(23):4771-6.

2011

1. Quesada V, Conde L, Villamor N, ..., **Baumann T** et al. *Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukaemia*. Nat Genet. 2011 Dec 11;44(1):47-52.

2. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, Escaramis G, Jares P, Beà S, González-Díaz M, Bassaganyas L, **Baumann T** et al. *Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia*. Nature. 2011 Jun 5;475(7354):101-5.

3. Ferrer G, Hodgson K, Pereira A, Juan M, Elena M, Colomer D, Roué G, Aymerich M, **Baumann T** et al. *Combined analysis of levels of serum B-cell activating factor and a proliferation-inducing ligand as predictor of disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia*. Leuk Lymphoma. 2011 Nov;52(11):2064-8.

4. Nomdedeu M, Maffioli M, Calvo X, Martínez-Trillos A, **Baumann T**, Díaz-Beyá M, Aguilar JL, Rozman M, Costa D, Esteve J, Cervantes F, Colomer D, Nomdedeu B. *Efficacy of lenalidomide in a patient with myelodysplastic syndrome with isolated del(5q) and JAK2V617F mutation*. Leuk Res. 2011 Sep; 35(9):1276-8.

2012

1. López C, **Baumann T**, Costa D et al. *A new genetic abnormality leading to TP53 gene deletion in chronic lymphocytic leukaemia*. Br J Haematol. 2012 Mar;156(5):612-8.

2. Delgado J, **Baumann T**, Ghita G, Montserrat E. *Chronic lymphocytic leukemia therapy: beyond chemoimmunotherapy*. *Curr Pharm Des*. 2012;18(23):3356-62.
3. López C, Delgado J, Costa D, Conde L, Ghita G, Villamor N, Navarro A, Cazorla M, Gómez C, Arias A, Muñoz C, **Baumann T**, et al. *Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations*. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Sep;51(9):881-9.
4. Dlouhy I, Ghita G, **Baumann T**, Gine E, Villamor N, Rozman M, Martinez-Trillos A, Lopez-Guillermo A, Delgado J. *Retreatment with purine analogs in patients with chronic lymphocytic leukemia*. *Leuk Res*. 2012 Dec;36(12):1521-5.

2013

1. Ferrer G, Navarro A, Hodgson K, ..., **Baumann T** et al. *MicroRNA expression in chronic lymphocytic leukemia developing autoimmune hemolytic anemia*. *Leuk Lymphoma*. 2013 Sep;54(9):2016-22.
2. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, ..., **Baumann T** et al. *NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia patients with high risk of transformation and poor outcome*. *Leukemia*. 2013 Apr;27(5):1100-6.
3. López C, Delgado J, Costa D, ..., **Baumann T** et al. *Clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia: Analysis of correlations with IGHV mutational status, NOTCH1 mutations and clinical significance*. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013 Oct;52(10):920-7.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Tycho Baumann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung der Funktion Antigen-präsentierender Zellen unter immunstimulatorischer Therapie mit Granulozyten Monozyten Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) in Patienten mit schwerer Sepsis und Immunparalyse“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Herr Tycho Baumann hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, **Baumann T**, Hetzger K, Gregor J, Weber-Carstens S, Hasper D, Keh D, Zuckermann H, Reinke P, and Volk HD. *Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor to Reverse Sepsis-associated Immunosuppression*. Am J Respir Crit Care Med Vol 180. pp640-648, 2009.

Beitrag im Einzelnen:

Patientenscreening, Erhebung klinischer Daten und deren Auswertung.

Probengewinnung, laborexperimentelle Arbeiten (Durchflusszytometrie, Stimulationsassays, ELISA-Assays etc.) und deren Analyse.

Mitarbeit an der statistischen Auswertung und Erstellung des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Danksagung

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk für die Betreuung der vorliegenden Arbeit innerhalb des von ihm geleiteten Instituts für Medizinische Immunologie der Charité. Die Methodik seiner Fragen, die geistige Beweglichkeit in der Problemlösung, die Fähigkeit zur Begeisterung und sein menschlicher Führungsstil haben mir gezeigt, was forschen bedeuten kann.

Meinen außerordentlichen und sehr herzlichen Dank möchte ich meinem Arbeitsgruppenleiter Herrn Dr. med. Christian Meisel aussprechen, dessen aus echter Großzügigkeit, profunder Kenntnis der Immunologie und Berliner Humor gewachsene tiefe menschliche und fachliche Kompetenz mich vom ersten Tag an im Laboralltag bis zum Abschluss der Arbeit begleitet und geleitet hat. Herrn PD Dr. Jörg Schefold möchte ich danken für die Hilfe, die unserem Projekt durch seine Kenntnis klinischer Fragestellungen und statistischer Feinheiten zukam.

Den Kollegen aus der Arbeitsgruppe ein großes Danke, insbesondere meinen Mitpromovenden Katrin Hetzger und René Pschowski für ihre freundschaftliche Zusammenarbeit, Frau Dr. Claudia Sievers für ihre humorvolle Geduld in der Überwachung meiner ersten Gehversuche im Labor, Kristin Neuhaus und Christa Liebenthal und Claudia Conert sowie Ingrid Jäkel und Ulrike Mönnich für unermüdlichen Einsatz (oft auch am Wochenende), geduldige Hilfe und Rat in allen technischen und weniger technischen Fragestellungen. Holger Pöhlmann gilt mein sehr verbindlicher Dank für seine kenntnisreiche Einführung in die Methodologie und seine umsichtige und uneigennützig Hilfe; ohne seine fundamentalen Vorarbeiten wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Ich bewahre sein Andenken mit tiefem Respekt.

Dem Personal der Intensivstationen der Charité sei für ihre Unterstützung in der Durchführung der klinischen Studie gedankt; insbesondere Frau OÄ Dr. med. Heidrun Zuckermann-Becker, Frau Prof. Dr. med. Petra Reinke und Herrn OA Dr. med. Dietrich Hasper danke ich für ihre konzeptuelle und praktische Hilfe.

Frederick Jenkins, Stefan Rosenberger und Moritz von Mettenheim haben großen Anteil an der Entstehung dieser Arbeit – sie sind Freunde ohne Wenn und Aber. Bei Oriol Bestard möchte ich mich für den freundschaftlichen Brückenschlag zwischen Berlin und Barcelona bedanken.

Am bedeutendsten war aber die Unterstützung durch meine deutsche und spanische Familie. Sie haben mir Nähe in der Ferne, Beharrlichkeit in schweren Stunden und vor allem immer wieder Freiheit und Freude am Arbeiten und Leben vermittelt. Insbesondere ein sehr herzlicher Dank meinem Vater Werner und meinem großen kleinen Bruder Achim für die vielen Stunden. Das wird immer bleiben. Und Blanca und Mateo – weil sie da sind.