

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. A. Thiede

**Einfluss von septischem Plasma und intensivmedizinischen Medikamenten
auf die Zytokin - und Procalcitoninfreisetzung von in vitro stimulierten
PBMC septischer Patienten und immunkompetenter Probanden**

Inaugural – Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Gernot Bonkat

aus

Würzburg

Würzburg, Juni 2003

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. U. Mittelkötter

Korreferent: Prof. Dr. med. A. Thiede

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung:

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern

1 Einleitung	1
2 Vorüberlegungen	3
2.1 Definitionen	3
2.1.1 SIRS	3
2.1.2 Sepsis	4
2.1.3 Schwere Sepsis	4
2.1.4 Septischer Schock	5
2.2 Die Zellen	5
2.3 Pathophysiologie der gramnegativen Sepsis	6
2.4 Endotoxin	8
2.5 Einfluss des LPS auf die Plasmaproteinsysteme	9
3 Die Parameter	10
3.1 Tumornekrosefaktor- α	10
3.2 Interleukin-10	11
3.3 Interleukin-6	11
3.4 Interferon- γ	12
3.5 Procalcitonin	13
4 Material und Methoden	15
4.1 Umfang der Untersuchung	15
4.2 Untersuchungsparameter	15

4.3 Techniken	15
4.4 Medikamente und ihre Konzentration in den Testansätzen	16
4.5 Probandengut	16
4.6 Patientengut	16
4.7 Benötigte Chemikalien	17
4.8 Durchführung der Studie	18
4.8.1 Anlage des Plasmapools	18
4.8.2 Isolation der Zellen	19
4.8.3 Zellzählung und Vitalitätsprüfung	19
4.8.4 Inkubation	19
4.8.5 EASIA und LUMItest	20
4.8.6 Statistische Auswertung	20
5 Fragestellungen	21
6 Ergebnisse	
6.1 Testreihe mit Taurolidin	22
6.2 Testreihe mit Pentaglobin	28
6.3 Testreihe mit Arterenol	33
6.4 Testreihe mit Ultiva und Propofol	38
6.5 Testreihe mit Fentanyl und Dormicum	43
6.6 Plasma	48
6.7 Patient im Verlauf	53

7 Diskussion	58
7.1 Taurolidin	59
7.2 Pentaglobin	61
7.3 Arterenol	64
7.4 Ultiva und Propofol	67
7.5 Fentanyl und Dormicum	70
7.6 Plasma	71
7.7 Patient im Verlauf	74
8 Beantwortung der Fragen	78
9 Zusammenfassung	81
10 Quellen	83

1 Einleitung

In Deutschland erkranken jährlich etwa 500-800.000 Patienten während ihres Krankenhausaufenthaltes an Infektionen. Eine daraus resultierende gefürchtete Komplikation stellt die Sepsis mit einer hohen Mortalität von annähernd 50% und etwa 75.000 Todesfällen in der BRD dar [1]. Die Sepsis-Inzidenz beträgt in Krankenhäusern der Maximalversorgung pro 1.000 stationären Patienten zwischen 8,1 – 15,5 %. Die Frequenz an einer Sepsis zu erkranken ist am höchsten für Patienten auf Intensivstationen. Als Risikofaktor hierfür gilt unter anderem die erhöhte Disposition intensivgepflegter Menschen. Als weitere relevante Ursachen sind die Schwere der Grunderkrankung, sowie die infektionsbegünstigenden invasiven diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen in der Intensivmedizin zu nennen. Gesicherte Maßnahmen in der Therapie der Sepsis sind die Fokussanierung, die Gabe von Antibiotika sowie symptomatische Maßnahmen zur Begrenzung bzw. Überbrückung von hämodynamischen Veränderungen und Organausfällen. Im Verlauf der vergangenen 20 Jahre hat sich die die Letalität der Sepsis trotz aller dieser Therapieformen und Fortschritten in der modernen Intensivmedizin nicht verändert. Aufgrund dieser Tatsache, der immer noch dramatischen Mortalität und der weiter zunehmenden Inzidenz der Sepsis wurden in den letzten Jahren zahlreiche prospektive, kontrollierte Studien über neue experimentelle Therapieansätze publiziert. Unter anderem prüfte man die Wirkung von Anti-Endotoxin-Antikörpern, Antioxidantien, löslichen TNF-Rezeptoren, Thromboxanantagonisten und Inhibitoren der Adhäsionsmoleküle. Die Ergebnisse dieser sehr aufwendigen Studien waren jedoch insgesamt enttäuschend [2]. Ursächlich für die steigende Inzidenz der Sepsis sind die steigende Lebenserwartung der Gesamtbevölkerung, die deutliche Zunahme

der Überlebenszeit chronisch kranker Patienten, die relative Häufigkeit von Sepsis bei AIDS, die Zunahme der Antibiotikatherapie, die Gabe von Glucokortikoiden, die Verwendung mechanischer Implantate und die verbesserte Möglichkeit der maschinellen Beatmung [3]. Als primäre und entscheidende Initiatoren der komplexen pathophysiologischen Abläufe der Sepsis gelten die Monocyten und Makrophagen (PBMC). Neben zahlreichen anderen Zellpopulationen wie z.B. Endothelzellen, reagieren diese monozytären Phagozyten auf verschiedene Stimuli mit der Bildung diverser endogener Mediatoren [4]. Zu den Produkten der PBMC gehören unter anderem Zytokine, Arachnidonsäuremetabolite oder Platelet Activating Factor (PAF). Auf die Wirkung dieser Faktoren sind letztlich die klinischen Erscheinungsbilder der Sepsis und des Multiorganversagens zurückzuführen. Aufgrund der zentralen Bedeutung der PBMC in der Genese der Sepsis stehen sie im Mittelpunkt dieser Arbeit. Immunkompetente Probanden und septische Patienten bilden zwei Kollektive, deren periphere mononukleären Zellen vor und nach Endotoxinstimulation untersucht werden. Die Wirkung von verschiedenen in der Intensivmedizin eingesetzten Medikamenten auf die peripheren mononukleären Zellen dieser beiden Versuchsgruppen wird in dieser Studie dargestellt. Als weiteres Ziel dieser Arbeit wird der Einfluss von Plasma septischer Patienten auf die PBMC der beiden oben genannten Gruppen untersucht. Als Parameter dieser in vitro Studie dienen Procalcitonin und die Zytokine $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-10, IFN- γ .

2 Vorüberlegungen

2.1 Definitionen

Definition von Sepsis /SIRS nach ACCP/SCCM („ American College of Chest Physicians“ und „Society of Critical Care Medicine“) [5].

2.1.1 SIRS

Unter SIRS (Systemisch Inflammatorisches Reaktions-Syndrom) versteht man die systemische Reaktion des Organismus mittels Mediatoren auf verschiedene schädigende Noxen, die durch mindestens zwei der nachfolgenden Kriterien gekennzeichnet sind.

- Temperatur: < 36°C oder > 38°C
- Herzfrequenz: > 90/ Min
- Atemfrequenz: > 20/Min und/oder pCO₂ < 32mmHG oder mechanische Ventilation
- Leukozytenzahl: > 12000/mm³ oder < 4000/mm³, oder 10% unreifer neutrophiler Granulozyten

2.1.2 Sepsis

Eine Sepsis liegt dann vor, wenn Kriterien von SIRS zutreffen und zusätzlich eine Infektion vorhanden ist.

2.1.3 Schwere Sepsis

Wenn im Verlauf der Sepsis sich Organdysfunktionen zeigen, entsteht daraus eine schwere Sepsis, die durch folgende Parameter definiert ist:

- Azidose: Laktaterhöhung oder pH < 7,3 oder BE > -5
- Arterielle Hypoxämie: pO₂ < 70 mmHg oder PO₂/Fi O₂ < 280
- Hypotension: SAP < 90 mmHg
- Oligurie : < 30 ml /h oder 700 ml/d
- Koagulopathie: > 20% PTT oder Thrombozyten < 100 × 10⁹
oder Abfall über 50% zum Ausgangswert.
- Encephalopathie: GCS < 13

2.1.4 Septischer Schock

Persistiert die septisch induzierte Hypotension trotz angemessener Flüssigkeitstherapie und geht sie mit Hypoperfusionszeichen oder Organdysfunktionszeichen einher, so stellt sich das Bild des septischen Schocks ein. Weiter zuzuordnen sind diesem Stadium normotone Patienten, die mit Inotropika oder Vasokonstriktiva therapiert werden, aber immer noch Hypoperfusions- bzw. Organdysfunktionszeichen zeigen.

2.2 Die Zellen (PBMC)

Eine zentrale Rolle innerhalb der Entzündungsreaktion des menschlichen Körpers nehmen die Zellen des mononukleären Phagozytosesystems (PBMC) ein. Dazu gehören die Monozyten des Blutes und die aus ihnen hervorgehenden Makrophagen der Körperhöhlen und Gewebe. Der Anteil der Makrophagen übertrifft den der Monozyten um ein Vielfaches. Bei den PBMC handelt es sich um Effektorzellen der unspezifischen Abwehr. Monozyten entwickeln sich aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark. Sie zirkulieren für ca. 20-30 Stunden im Blut. Die Monozyten des Blutes stellen sozusagen das Bindeglied zwischen dem Bildungsspeicher im Knochenmark und dem Makrophagenspeicher der Gewebe dar. Aus dem Blut wandern die PBMC in die verschiedenen Organe und Gewebssysteme aus und entwickeln sich zu ortsspezifischen Makrophagen. Zu ihnen gehören unter anderem die Alveolarmakrophagen der Lunge, die Kupffer-Zellen der Leber, die Osteoklasten des Knochens, Mikrogliazellen des Gehirns und die Langerhanszellen der Haut. PBMC besitzen Rezeptoren für das Fc-Stück von IgG, IgM, und IgE sowie für Opioide, Katecholamine, Zytokine, LPS (CD 14),

die Komplement- komponente C3b (CD 35), Zytokine und noch viele andere Mediatoren. Mononukleäre Phagocyten exprimieren MHC-Klasse-1-Moleküle und 15% der ruhenden Makrophagen zusätzlich MHC-2-Moleküle. Die Hauptfunktionen der PBMC sind Phagocytose, Zytotoxizität, Antigenpräsentation, Immunregulation und Sekretion löslicher Faktoren. Im nicht entzündeten Gewebe besteht die Aufgabe von Makrophagen hauptsächlich in der Beseitigung gealterter Zellen. Sie produzieren aber auch eine Menge löslicher Faktoren, die für die Kommunikation des innerhalb des Immunsystems wichtig sind. Im Gegensatz dazu befinden sich an Entzündungsprozessen beteiligte PBMC in einem aktivierten Zustand. Sie besitzen nun stark veränderte phänotypische und funktionelle Eigenschaften. Aktivierte Makrophagen zeigen einen erhöhten Metabolismus und sind zu einer gesteigerten Phagocytose, Cytotoxizität und Adhärenz befähigt. Vor allem handelt es sich jetzt aber um sekretorisch hoch aktive Zellen, die durch die vermehrte Freisetzung von Zytokinen (z.B. TNF- α , IL-6 und IFN- γ) und Mediatoren regulierend in die Immunreaktion des Organismus eingreifen.

2.3 Pathophysiologie der gramnegativen Sepsis

Die Pathophysiologie der Sepsis basiert auf fünf grundlegenden Mechanismen des septischen Prozesses. Hierzu gehören der Infektionsherd als septischer Fokus, die Invasion pathogener Keime und toxischer Keimprodukte, die überschüssige Aktivierung von Mediatoren, die morphologische Zellschädigung als Grundlage der Organschädigung und die Multiorganinsuffizienz und folgend das Multiorganversagen als Endpunkt des septischen Prozesses. Der Krankheitsverlauf der Sepsis wird primär durch das Ausmaß und Ablauf der Reaktion des Patienten auf die auslösende Noxe und

weniger von der Art, Zahl, Pathogenität oder Virulenz der Erreger bestimmt. Sepsis entsteht, wenn eine an sich sinnvolle Abwehrreaktion aus der Kontrolle der physiologischen Inhibitor- mechanismen gerät und damit in unkontrollierter, überschießender generalisierter Form nicht mehr nur die auslösenden Pathogene eliminiert, sondern autodestruktive Schädigungen körpereigener Zellsysteme und Organe verursacht. Die Folge der Invasion pathogener Keime und toxischer Keimprodukte ist die Aktivierung von Entzündungszellen (Monozyten und Makrophagen). Dadurch kommt es zur Bildung, Aktivierung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren. Die überschießende Freisetzung dieser Substanzen wie z.B. TNF und Interleukine wird als Mediatorexplosion bezeichnet. Durch die Wirkung dieser Mediatoren werden sekundäre Mediatoren exprimiert. Unter diesen sind das Stickstoffmonoxid (NO) und Sauerstoffradikale, aber auch die Metabolite des Arachnidonsäurestoffwechsels zu nennen. Die Sepsis ist ein biphasisch ablaufendes Krankheitsbild. Eine initiale hyperdynamie proinflammatorische Phase mit unkontrollierter Freisetzung von Mediatoren wird gefolgt von einem antiinflammatorischen, hypodynamen Folgestadium. Klinische Beobachtungen zeigen, dass sich diese Phasen bei einem Patienten wiederholen können, je nach operativer Sanierbarkeit des Fokus. Infolge der modernen Intensivtherapie mit adäquaten Volumenausgleich und Katecholaminen ist die hyperdynamie Schockphase oft bis unmittelbar präfinal zu beobachten. Die globale Einteilung der Sepsis in eine frühe hyperdynamie Schockphase und eine späte hypodynamie Phase ist klinisch feststellbar, jedoch fehlt bis heute ein laborchemischer Parameter der den Zeitpunkt des Überganges dieser beiden Phasen sicher erfassen kann. Auch aufgrund der immunologischen Konstellation lässt sich das Krankheitsbild der Sepsis in zwei Phasen einteilen. Eine frühe Phase mit Überwiegen proinflammatorischer Mediatoren (TNF- α ,

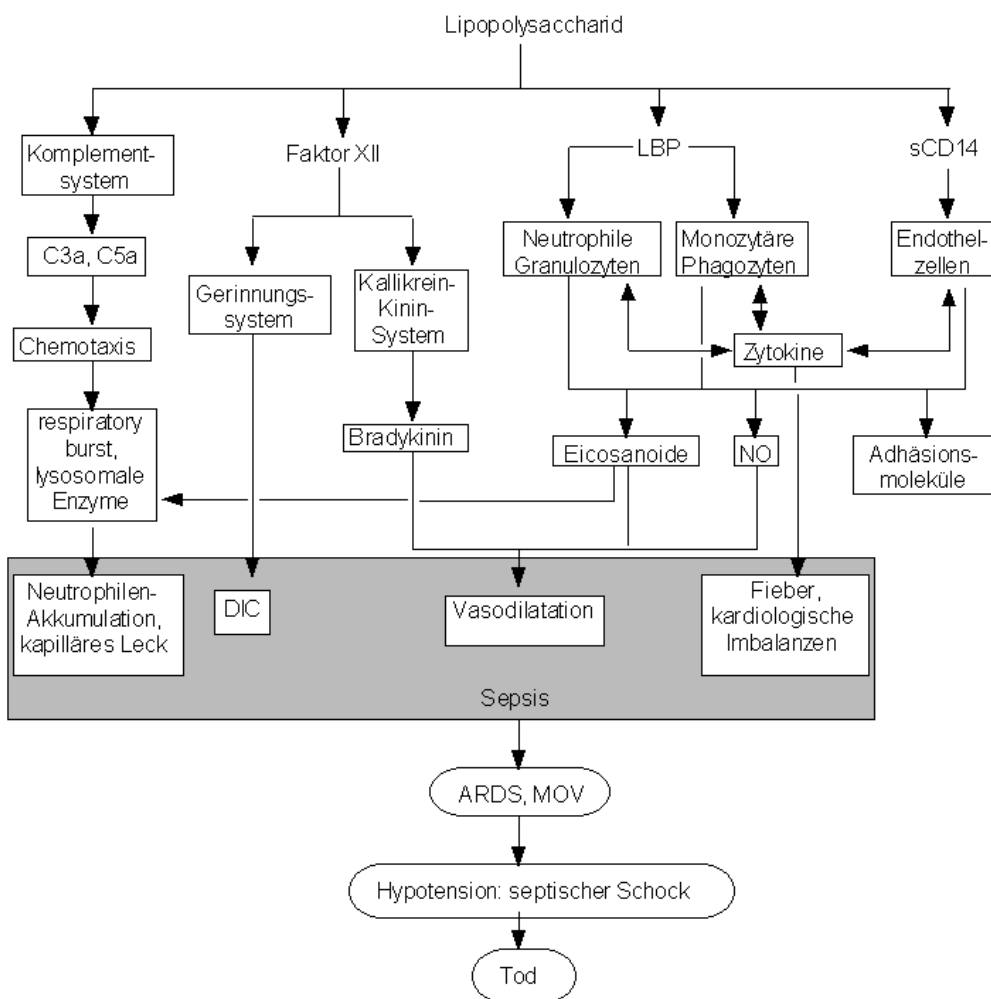
IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 und IFN- γ) wird gefolgt von einer späten Phase mit Überwiegen antiinflammatorischer Mediatoren (IL-10, IL-12). Eine frühzeitige Diagnosestellung Sepsis und damit das Einleiten einer entsprechenden Intensivtherapie ist für das Überleben des Patienten von entscheidender Bedeutung.

2.5 Endotoxin

Endotoxine sind amphiphile Lipopolysaccharide, die zusammen mit Phospholipiden und Proteinen die äußere Membran gramnegativer Bakterien bilden. Die Endotoxine verschiedener gramnegativer Bakterien unterscheiden sich in der Zusammensetzung und Länge der Polysaccharidketten, dagegen ist in allen Molekülen der Lipidanteil, genannt Lipid A, gemein. Die toxische und immunstimulatorische Wirkung der Endotoxine ist dem Lipid A zuzuordnen. Die Endotoxine sind eine der Triggersubstanzen für die Mediatorfreisetzung im septischen Geschehen. Wenn gramnegative Bakterien sich vermehren oder zerfallen, z.B. unter der Therapie mit Antibiotika, wird Endotoxin frei und kann in die Blutbahn gelangen. Im Serum wird das LPS an verschiedene Serumproteine gebunden. Die Bindung an HDL oder LDL führt zu einer Neutralisierung des Endotoxins. Die Bindung des Endotoxins an ein spezifisches Protein, das LPS-bindende Protein (LBP), steigert jedoch die Toxizität dramatisch. LBP wird als Akute-Phase Protein von der Leber gebildet und hat als einzige biologisch bekannte Aktivität eine Verstärkung der LPS-Wirkung zur Folge. Über einen Oberflächenrezeptor (CD 14), der auf Monozyten und Makrophagen exprimiert wird, bindet der LPS-LBP-Komplex an diesen Zellen und aktiviert diese. Endotoxin nimmt eine Sonderstellung in der gramnegativen Sepsis ein, in dem es den Initialschritt einleitet, selbst

Mediatorenfunktion besitzt und an den sekundären Mediatorwirkungen auf zellulärer Ebene die Endothelläsion und metabolisch-toxischen Zellschädigung direkt beteiligt ist. Der laborchemische Nachweis von LPS im Blut septischer Patienten gelingt nicht immer und zählt daher auch nicht zu den Kriterien einer Sepsis.

2.6 Einfluss des LPS auf die Plasmaproteinsysteme



Grafik1, nach Neugebauer et al. 1995: Die Plasmaproteinsysteme

3 Die Parameter

3.1 TNF- α

Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) nimmt eine dominierende Rolle im so genannten Zytokinnetzwerk und damit in der Pathogenese zahlreicher infektiöser und entzündlicher Erkrankungen ein. TNF- α wurde nach seiner Fähigkeit benannt, bei Versuchstieren eine hämorrhagische Nekrose zu verursachen [45]. Zehn Jahre nach Beschreibung dieser Eigenschaft wurde TNF- α 1985 aufgereinigt und sequenziert und das Gen von verschiedenen Arbeitsgruppen kloniert. Seither sind zahlreiche biologische Eigenschaften dieses Zytokins identifiziert worden, zusätzlich zur Lyse von Tumorzellen und zur Induktion von Kachexie, die ursprünglich zur Entdeckung von TNF- α geführt hatte. Schon im Jahr 1893 war von dem New Yorker Chirurgen Coley beobachtet worden, dass schwere Infektionen zur Regression eines malignen Tumors führten. Heute wird dieses Phänomen auf die zytotoxische Wirkung des TNF- α zurückgeführt. Die Hauptquellen für TNF- α sind Monozyten und Makrophagen. Die Synthese von TNF- α wird in Monozyten und Makrophagen durch unterschiedliche exogene Substanzen wie z.B. Endotoxin und β -Glykane sowie auch durch endogene Mediatoren wie IL-1 induziert. An der Zielzelle löst TNF- α durch Bindung an zellständige TNF-Rezeptoren inflammatorische Signale aus. Physiologischerweise wird TNF- α durch lösliche TNF-Rezeptoren antagonisiert. TNF- α bewirkt die klinischen Symptome wie Fieber, Tachykardie, Hyperventilation und Gefäßerweiterung. Es induziert unter anderem die Bildung von IL-6 und wirkt synergistisch mit IL-6 als Aktivator der Akute-Phase-Proteine und der Komplementkaskade. An Endothelzellen

fördert TNF- α die Adhärenz von Granulozyten und damit die Diapedese von Leukozyten in das Entzündungsgebiet.

3.2 Interleukin-10

Interleukin 10 wurde ursprünglich als ein Produkt einer bestimmten Untergruppe von T-Helferzellen (Th-2-Zellen) identifiziert, das die Proliferation, Entwicklung und Funktion einer anderen T-Helferzellgruppe (Th-1-Zellen) hemmt. IL-10 wird von verschiedenen Zellen wie B-Zellen, B-Zell-Lymphomen, Monozyten, Keratinozyten und Mastzellen gebildet. Entsprechend des ursprünglichen Namens – Zytokinsynthese-inhibierender Faktor – hemmt IL-10 die Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine, insbesondere TNF- α und IL-1 in Monozyten und Makrophagen. Eine weitere Hauptwirkung des IL-10 ist die Unterdrückung der MHC-Klasse-2-Antigenexpression auf Monozyten. IL-10 besitzt jedoch auch, wie neuere Studien zeigten, proinflammatorische Effekte wie z.B. eine Stimulation der IFN- γ -Synthese während Endotoxinaemie [46].

3.3 Interleukin-6

Interleukin-6 wird als das Interleukin der akuten Phase bezeichnet. IL-6 wird von Zellen des Immunsystems (aktivierte Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen) ausgeschüttet. Interleukin-6 wirkt auf alle seine peripheren Zielzellen (z.B. B-Zellen, Hepatozyten, und viele weitere Zellen) proinflammatorisch. Auf der Oberfläche polymorphkerniger Leukozyten bewirkt IL-6 eine vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen, die zur Verlangsamung des Blutstroms und zum

Auswandern der Leukozyten in das entzündete Gewebe führt. Die Stimulation von Endothelzellen durch IL-6 bewirkt eine Expression von spezifischen endothelialen Adhäsionsmolekülen. Neben seinen peripheren Effekten hat IL-6 eine zentrale Wirkung auf die neuroendokrinen Zellen des Hypothalamisch-hypophysären Systems. IL-6 induziert im Hypothalamus eine zentrale Temperaturerhöhung. Gleichzeitig kommt es zu einer vermehrten Freisetzung von CRH, welches im Hypophysenvorderlappen eine Erhöhung der ACTH-Produktion bewirkt. Die Nebenniere schüttet daraufhin vermehrt Cortisol aus, welches die Produktion von IL-6 aus Monozyten und Fibroblasten hemmt.

3.4 Interferon- γ

Grundsätzlich werden drei Interferontypen unterschieden. Diese sind Interferon- α und Interferon- β , auch als Typ-1 Interferone bezeichnet und Interferon- γ . Interferon- γ bindet an einen anderen Rezeptor als die Typ-1 Interferone und wird als Typ 2 Interferon bezeichnet [48]. Neben der bereits 1957 beschriebenen Wirkung der Interferone, der viralen Interferenz, besitzen Interferone noch ein breites Spektrum an weiteren Effekten. So hemmen Interferone die Vermehrung von Zellen und führen zur Rückbildung von Tumoren. Außerdem besitzen die Interferone ausgeprägte immunregulatorische Eigenschaften. Sie können Immunreaktionen einleiten, verstärken oder hemmen. Interferon- γ ist ein pleiotropes Zytokin. Es besitzt immunregulatorische Wirkungen und wird deshalb auch als Immuninterferon bezeichnet. T-Zellen und natürliche Killerzellen werden als Interferon- γ -produzierende Zellen angesehen. IFN- γ führt zu einer Aktivierung von Monozyten und Makrophagen und wird deshalb auch zu den proinflammatorischen Zytokinen gerechnet. Eine weitere biologische Funktion

von Interferon- γ ist die Steigerung der zytotoxischen Funktion von natürlichen Killer- und T-Zellen. Die Wiederherstellung der MHC-Klasse-2-Expression auf Monocyten, die z.B. durch IL-10 unterdrückt wird, lässt sich in vivo mit IFN- γ stimulieren [47].

3.5 Procalcitonin

Procalcitonin (PCT) ist das Vorläuferprotein des Calcitonins. Es ist ein aus 116 Aminosäuren bestehendes und 13 kDA schweres Glycoprotein [6]. Erstmals wurden 1989 von Assicot et al. [7] erhöhte Procalcitoninwerte im Serum bei Kindern mit Sepsis nachgewiesen. Seitdem wird Procalcitonin als möglicher laborchemischer Marker einer systemischen Infektion diskutiert und ist mittlerweile klinisch etabliert. Der exakte Ort der PCT-Produktion ist unklar. Die C-Zellen der Schilddrüse als alleiniger Ort der Synthese sind unwahrscheinlich, da thyreoidektomierte Patienten in der Lage sind PCT zu produzieren [8]. Als PCT Produktionsorte werden unter anderem die Leber, die Lunge, neuroendokrine Zellen, PBMC u.a. Zellen bzw. Gewebe diskutiert. Die genaue physiologische Rolle des PCT ist nicht bekannt. Im Serum Gesunder ist das Glycoprotein nicht oder in Werten unter 0,1 ng/ml zu finden. In erhöhten Konzentrationen tritt es bei systemischen Infektionen im Plasma auf. In einem Tiermodell wurde gezeigt, dass erhöhte PCT Konzentrationen die Mortalität erhöhen, wohingegen die Neutralisierung des PCT mit Antikörpern die Überlebensrate ansteigen ließ. Die bei schweren Infektionen gebildeten großen Mengen von Procalcitonin führen nicht zu einem Anstieg der Plasmacalcitoninaktivität und Konzentration. Virale Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Allergien und bakterielle Infektionen, die lokal begrenzt sind, induzieren keine erhöhten PCT-Spiegel [2]. Auch ist PCT im

Gegensatz zu den bekannten Infektionsparametern wie z.B. CRP, IL-8 und TNF- α beim SIRS nicht erhöht und scheint so geeignet um die Differentialdiagnose zwischen Sepsis und SIRS zu stellen[4]. Ein weiterer Vorteil des PCT gegenüber zu CRP ist, dass nach erfolgreicher Behandlung einer Infektion PCT rasch wieder auf Normalwerte abfällt. CRP hingegen weist auch nach Überwinden der Infektion noch tagelang pathologische Spiegel auf. In verschiedenen Kohortenstudien von postoperativen ICU Patienten lagen die PCT Werte bei den Patienten, die eine Sepsis entwickelten bei $> 2,0$ ng/ml. Dies ist der Grund dafür, dass in dieser Arbeit ein PCT-Wert von $> 2,0$ ng/ml als Einschlusskriterium für die Patienten ein festgelegt wurde.

4 Materialien und Methoden

4.1 Umfang der Untersuchung:

- 6 Patienten
- 6 gesunde Probanden
- Ein Patient im Verlauf der Sepsis

4.2 Untersuchungsparameter

- TNF- α
- Interleukin-6
- Interferon- γ
- Interleukin-10
- Procalcitonin

4.3 Techniken

- Vacutainer cell separation tube (BectonDickinson&Co.)
- Haemocytometer nach Neugebauer
- Tryphanblautest
- EASIA für IL-6, IL-10, TNF- α und IFN- γ (BioSource)
- LUMItest PCT (Brahms Diagnostica GmbH)

4.4 Medikamente und ihre Konzentration in den Testansätzen

Medikamente	Konzentration
Taurolidin	1250 µg/ml
Pentaglobin	0,0375 ml/ml
Arterenol	1,25 µg/ml
Ultiva	0,325 µg/ml
Propofol 2%	0,025 ml/ml
Fentanyl	0,01 mg/ml
Dormicum	0,0375 mg/ml

Grafik 2

4.5 Probandengut

Ausschlusskriterien für die Probanden:

- Akute Infektionen
- Allergien
- Kein Rauchen, Alkohol, Tee oder Kaffee 12h vor der Blutentnahme

4.6 Patientengut

Einschlusskriterien für die Patienten:

- PCT-Konzentration im Plasma > 2,0 ng/ml
- Kriterien eines SIRS oder Sepsis nach Bone [1]

Überblick über das Patientenkollektiv

Pat. Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	PCT (ng/ml)	Klinik	Verlauf
1	M	46	3,3	Sepsis	Tod
2	M	61	2,5	Sepsis	Tod
3	W	83	2,1	Sepsis	Tod
4	M	86	2,2	Sepsis	Tod
5	M	70	12,9	Sepsis	Tod
6	W	36	24,9	Sepsis	überlebt

Grafik 3

4.7 Benötigte Chemikalien

- RPMI mit 25 mM Hepes (Cell Concepts)
- Tryphan blue stain 0,4%100 ml (Bio Whittaker)
- PBS ohne calcium und Magnesium 100 ml (Life Technologies)
- Penicillin / Streptomycin 10000 E / 10 mg/ ml (Linaris)
- LPS / Escherichia coli Serotyp O55:B5 (Sigma)
- 2-Mercaptoethanol
- FCS, fetales Kälberserum

4.8 Durchführung der Studie

1. Erstellen eines Plasmapool
2. Zellgewinnung
3. Zellzählung, Vitalitätsprüfung und Einstellen der Zellzahl
4. Inkubation im Brutschrank
5. EASIA (TNF- α ,IL-6,IL-10 und IFN- γ) und LUMItest PCT

4.8.1 Anlegen eines Plasmapools

Plasma septischer Patienten wird gepoolt, zu 50% mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt und bei -20°C eingefroren. Für die Wahl der Patienten gelten die oben genannten Einschlusskriterien. Es erfolgt eine Virologische Untersuchung des Pools durch das Institut für Virologie der Julius Maximilian Universität Würzburg (Hep. B, Hep. C und HIV). Diese Untersuchung fiel für die oben genannten Parameter negativ aus. Der Plasmapool wird mit Hilfe von EASIA's und LUMItest PCT auf die zu bestimmenden Parameter untersucht.

Ergebnis dieser Untersuchungen:

Parameter	Messergebnis	Einheit
IL-6	1964	pg/ml
IL-10	10,93	pg/ml
TNF- α	77,5	pg/ml
IFN- γ	0,33	IU/ml
PCT	2,057	ng/ml

4.8.2 Isolation der Zellen

Blutentnahmesystem: Vacutainer cell preparation (CPT) (4 ml , Na-Citrat). Die Isolation der Zellen mit Hilfe der Vacutainer-CPT erfolgt nach der Anleitung des Herstellers.

4.8.3 Zellzählung und Vitalitätsprüfung

Die Zellzahl wird mit dem Haemocytometer nach Neubauer auf 3×10^5 Zellen pro ml eingestellt. Durch diese Einstellung kann die spätere Zytokinmessung (PCT) mit Hilfe der EASIA's (LUMItest) als Produktion pro $7,5 \times 10^4$ Zellen angegeben werden Die Vitalitäts- prüfung der Zellen erfolgt mittels der Tryphanblaumethode.

4.8.4 Inkubation

Die isolierten Zellen werden im Brutschrank unter physiologischen Bedingungen in zwei aufeinanderfolgenden Schritten inkubiert. Die erste Inkubation dauert 6 h, die zweite 2h.Nach der Inkubation werden für die folgenden Untersuchungen 1,5 ml des Überstandes abpipettiert und bei -20 °C eingefroren. Für die EASIA's und den LUMItest PCT werden diese 1,5 ml Portionen aufgetaut und das für den jeweiligen Test benötigte Volumen abpipettiert. Der Rest wird bis zu seiner weitem Verarbeitung erneut bei - 20 °C eingefroren.

4.8.5 EASIA und LUMItest PCT

Der EASIA (Enzyme Amplified Sensitivity Immunoassay) wird entsprechend der Gebrauchsanweisung der Firma BioSource für die jeweiligen Parameter durchgeführt und mit dem Medgenix Easia Reader ausgewertet. Der Lumitest der Firma Brahms ist ein immunoluminometrischer Assay (ILMA) zur Bestimmung von Procalcitonin in Humanserum und Plasma. Die Bestimmung der Procalcitoninkonzentration und die Auswertung wird entsprechend der Anleitung des Herstellers ausgeführt.

4.8.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt nach Beratung und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biomathematik der Julius Maximilian Universität Würzburg und des Rechenzentrums der Universität. Die Datenverarbeitung wurde auf dem Programm Microsoft Excel 5.0 durchgeführt. In der statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS für Windows verwendet. Die graphische Darstellung der stimulierbaren Zytokinfreisetzung *in vitro* erfolgt als prozentuale Änderung im Vergleich zum jeweiligen Kontrollansatz. Die Daten in den Tabellen werden angegeben als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung. Der Vergleich erfolgte mittels des Student-t-Testes für verbundene Stichproben. Als Signifikanzniveau wurde $P < 0,05$ festgelegt.

5 Fragestellungen

Fragen der Testansätze im Einzelnen:

- 1) Reagieren die Zellen auf den Stimulus Endotoxin LPS mit Mediatorfreisetzung (Z+LPS)? Gibt es quantitative Unterschiede bezüglich der beiden Spenderkollektive?

- 2) Wird durch eine Vorinkubation der Zellen mit den Medikamenten der unter 1) erzielte Effekt des LPS verändert. Wenn ja, in welcher Form? (Z,M+LPS)

- 3) Interagieren die Medikamente mit dem Stimulus, so dass die Mediatorfreisetzung verändert wird? (LPS,M+Z)

- 4) Nimmt das Poolplasma Einfluss auf die Messwerte bei einer Vorinkubation mit den Zellen mit und ohne Endotoxin (Z,P+LPS)?

- 5) Übertragung des Versuchmodells in die Praxis. Ansatzpunkte für den Einsatz der Medikamente in der Therapie der Sepsis aufgrund der durch die Medikamente modulierten Mediatorproduktion?

6 Ergebnisse

6.1 Einfluss von Taurolidin

6.1.1 Wirkung von Taurolidin 2% auf die TNF- α -Synthese in PBMC gesunder Probanden

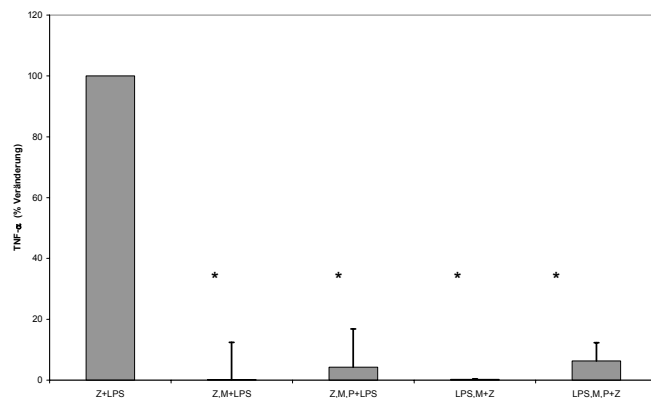


Abbildung 1

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Taurolidin führt in allen Testansätzen zu einer deutlichen Herabsetzung der TNF- α Produktion in den PBMC. (P<0,005). Diese Reduktion wird besonders deutlich bei der Vorinkubation der Zellen (Z,M,P+LPS) auf 2 % gegenüber der Kontrolle (P<0,005) und andererseits des Endotoxins (LPS,M+Z) auf 1% gegenüber der Kontrolle(P<0,005) mit Taurolidin. Diese Effekte werden durch die Zugabe von gepoolten Plasma, das im Vorfeld der Studie von septischen Patienten gewonnen wurde, leicht abgeschwächt.

6.1.2 Wirkung von Taurolidin 2% auf die TNF- α -Synthese in PBMC der Patienten

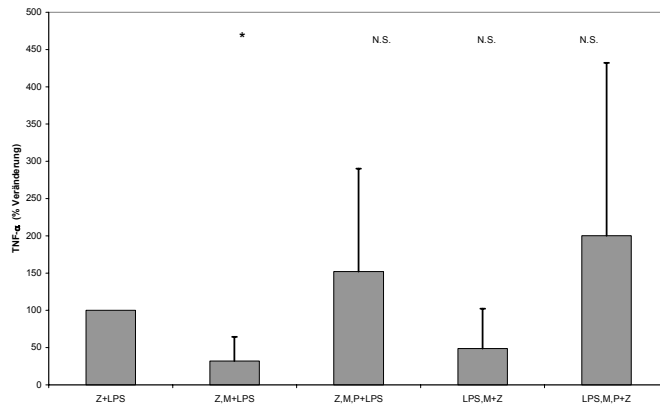


Abbildung 2

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Eine so deutliche Wirkung auf die TNF- α Synthese wie bei den Probanden lässt sich bei den PBMC septischer Patienten nicht finden. Weiterhin ergibt nur die Vorinkubation der Zellen (Z,M+LPS) mit Taurolidin ein signifikantes Ergebnis. So kommt es zu einer Reduktion auf 33% gegenüber der Kontrolle. Im Vergleich zu den Probanden (Reduktion auf 1%) ist dies jedoch eine deutlich abgeschwächte Wirkung. Die Reduktion bei der Vorinkubation des LPS mit Taurolidin ist im Vergleich zu den Probanden ebenfalls deutlich verringert und auch nicht signifikant. In den Testansätzen in denen Plasma zugesetzt wird kommt es sogar zu einer, wenn auch nicht signifikanten, Erhöhung der TNF- α Konzentration.

6.1.3 Wirkung von Taurolidin 2% auf die IL-6-Synthese in PBMC gesunder Probanden

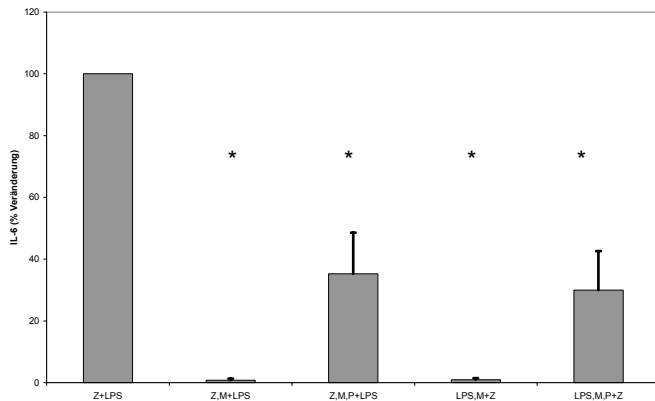


Abbildung 3

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Taurolidin führt wieder in allen Testansätzen zu einer deutlichen Herabsetzung, hier der der IL-6 Produktion in den PBMC ($P < 0,005$). Diese Reduktion wurde besonders deutlich bei der Vorinkubation einerseits der Zellen auf 2% gegenüber der Kontrolle und andererseits des Endotoxins auf 1% gegenüber der Kontrolle. Auffallend war hier jedoch die verringerte Reduktion der IL-6 Produktion in den Testansätzen in denen gepooltes Plasma zugesetzt wurde. Die Reduktion fiel durch die Zugabe des Plasmas von 98% auf 64% bei der Vorinkubation der Zellen und von 99% auf 70% bei der Vorinkubation des LPS mit Taurolidin.

6.1.4 Wirkung von Taurolidin 2% auf die IL-6-Synthese in PBMC der Patienten

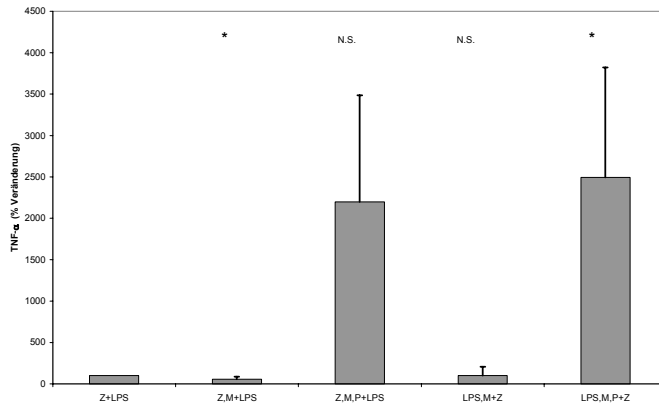


Abbildung 4

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Die Wirkung von Taurolidin auf die IL-6 Produktion der PBMC septischer Patienten zeigt wie die TNF- α Produktion deutliche Unterschiede zu dem Ergebnis der Probanden. Eine Reduktion findet nur bei der Vorinkubation der Zellen (Z,M+LPS) auf 57 % gegenüber der Kontrolle (P<0,005) und der Vorinkubation des Endotoxins (LPS,M+Z) auf 99,58% gegenüber der Kontrolle (N.S.) mit Taurolidin statt. Diese Effekte werden durch die Zugabe von dem Poolplasma abgeschwächt oder besser gesagt aufgehoben. Auffallend sind die massiv erhöhten IL-6 Werte in diesen Testansätzen. Sie steigen durch die Zugabe des Plasmas von 56,51% auf 2199,52% bei der Vorinkubation der Zellen (Z,M,P+Z) und von 99,58 % auf 2494,84% bei der Vorinkubation des LPS (LPS,M,P+Z) mit Taurolidin.

6.1.5 Einfluss von Taurolidin auf die IL-10-Synthese

Keine signifikante Messung von IL-10 wird bei den Zellen der Probanden beobachtet. Die Messergebnisse zeigen, wenn auch nicht signifikant, keinen oder einen leicht reduzierenden Effekt von Taurolidin. Bei den Patienten erbrachte wiederum kein Testansatz ein signifikantes Ergebnis. Jedoch zeigten alle Ansätze eine Erhöhung der IL-10 Messungen gegenüber der Kontrolle.

6.1.6 Wirkung von Taurolidin auf die IFN- γ -Synthese

Keine signifikante Messung von IFN- γ bei den Zellen der Probanden. Die Messergebnisse zeigen, wenn auch nicht signifikant, keinen oder einen leicht erhöhenden Effekt von Taurolidin. Bei den Patienten zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Messwerte zeigten auch hier keine Signifikanz. Wie jedoch schon bei IL-10 zeigten alle Testansätze auch eine erhöhte IFN- γ Konzentration gegenüber der Kontrolle.

6.1.7 Wirkung von Taurolidin auf die PCT-Synthese in PBMC gesunder Probanden

Zwei signifikanten Ergebnissen bei den Probanden wurden festgestellt. Bei der Vorinkubation der PBMC mit Plasma und Taurolidin und anschließender LPS-Stimulation kommt es zu einer fast dreifachen Messung von PCT. Eine ebenfalls starke PCT-Erhöhung wird in dem Testansatz gemessen in dem Taurolidin, Plasma und LPS miteinander inkubiert werden und die Zellen zu der zweiten Inkubation hinzugefügt werden (LPS,P,M+Z). Bei den Patienten zeigten sich ähnliche Ergebnisse. So konnte bei der Vorinkubation der PBMC

mit Plasma und Taurolidin und anschließender LPS-Stimulation PCT erhöht gemessen werden.

6.2 Einfluss von Pentaglobin

6.2.1 Wirkung von Pentaglobin auf die TNF- α -Synthese in PBMC gesunder Probanden

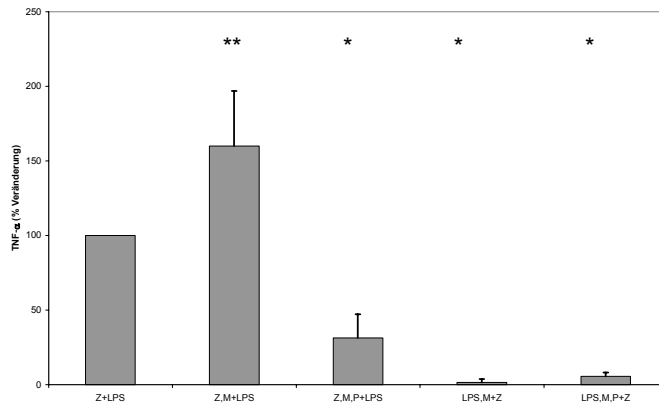


Abbildung 5

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Eine signifikante TNF- α Erhöhung wurde bei der Vorinkubation der Zellen mit Pentaglobin gemessen (Z,M+LPS). In allen anderen Testansätzen kam es zu sehr signifikanten Reduktionen gegenüber der Kontrolle. Die stärkste Reduktion zeigte sich bei der Vorinkubation des LPS mit Pentaglobin. Hier kam es zu einer Erniedrigung um 98,5% gegenüber der Kontrolle.

6.2.3 Wirkung von Pentaglobin auf die TNF- α -Synthese in den PBMC der Patienten

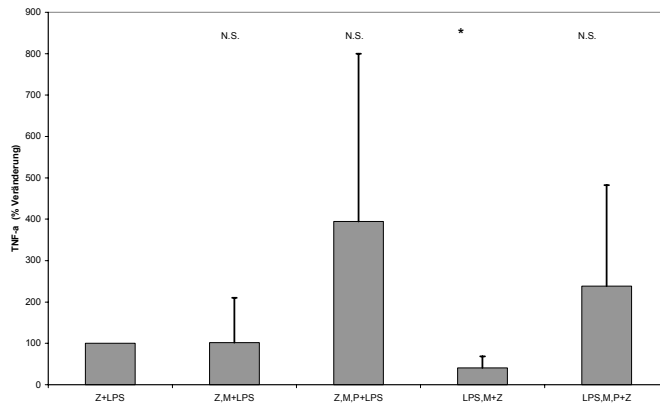


Abbildung 6

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Die Wirkung von Pentaglobin auf die TNF- α -Synthese in PBMC der Patienten erbrachte in den meisten Testansätzen kein signifikantes Ergebnis. Lediglich die Vorinkubation des LPS mit Pentaglobin führte hier zu einer signifikanten Reduktion auf 40% gegenüber der Kontrolle. Diese ist aber im Vergleich zu der Reduktion im Probandendurchlauf, Reduktion auf 2% gegenüber der Kontrolle, gering.

6.2.4 Wirkung von Pentaglobin auf die IL-6-Synthese in PBMC gesunder Probanden

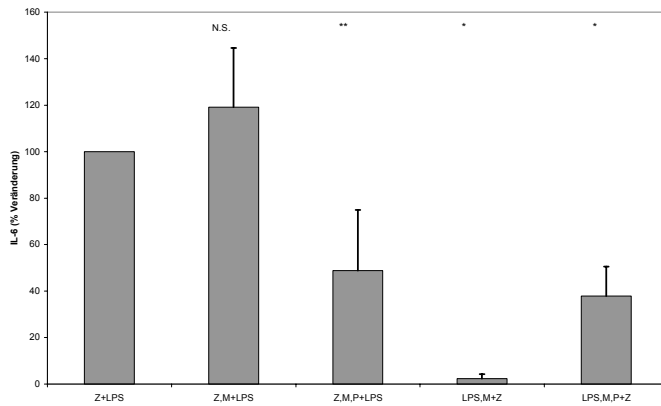


Abbildung 7

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Die zweistündige Vorinkubation der Zellen mit Pentaglobin (Z,M+LPS) resultierte in einer erhöhten Konzentration von IL-6 nach anschließender LPS-Stimulation. Diese Messung war jedoch nicht signifikant. In allen anderen Testansätzen kam es aber zu einer signifikanten Reduktion der gemessenen IL-6 Konzentrationen. Die stärkste Reduktion wurde wie schon bei TNF- α in dem Testansatz gemessen, in dem LPS mit Pentaglobin vorinkubiert wurde (LPS,M+Z). Es zeigte sich hier eine Reduktion um 98% gegenüber der Kontrolle.

6.2.5 Wirkung von Pentaglobin auf die IL-6-Synthese in den PBMC der Patienten

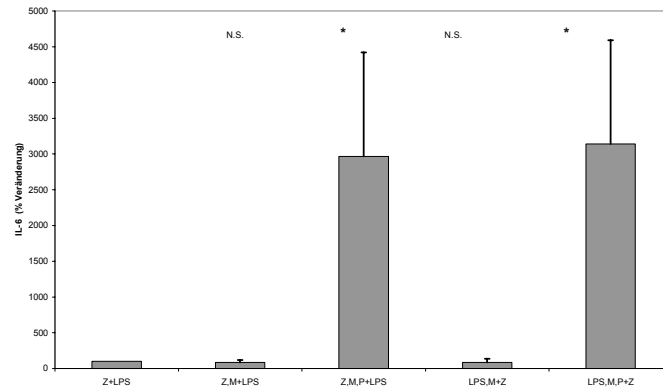


Abbildung 8

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Diese Testreihe erbrachte nur zwei signifikante Ergebnisse. Bei beiden Testansätzen wurde mit Poolplasma septischer Patienten gearbeitet (Z,M,P+LPS und LPS,M,P+Z). In diesen beiden Ansätzen kam es zu einer drastischen Erhöhung der gemessenen IL-6 Werte gegenüber der Kontrolle. Dieser Anstieg betrug 2865,52% und 3039,66% (LPS,M,P+Z).

6.2.6 Wirkung von Pentaglobin auf die IL-10-Synthese

Keine signifikante Messung von IL-10 wurde bei den Probanden beobachtet. Bei den Patienten zeigte sich eine sehr signifikante Messung. Bei der Vorinkubation der Zellen mit Pentaglobin und anschließender LPS-Stimulation kam es zu einer Reduktion der IL-10 Messung auf 66% gegenüber der Kontrolle.

6.2.7 Wirkung von Pentaglobin auf die IFN- γ -Synthese

Bei den Probanden wurde keine signifikante Messung von IFN- γ wurde beobachtet. Die Messergebnisse zeigten, wenn auch nicht signifikant, keinen oder einen leicht erhöhenden Effekt von Pentaglobin. Bei den Patienten zeigten die Messwerte keine Signifikanz.

6.2.9 Wirkung von Pentaglobin auf die PCT-Synthese

Bei den Probanden kam es zu einem sehr signifikanten Ergebnis in dem Testansatz LPS,P,M+Z. Bei der Vorinkubation des LPS mit Plasma und Pentaglobin und anschließender Zugabe der Zellen kam es zu einer fast dreifachen Messung von PCT. Auch bei den Patienten zeigte nur ein Ansatz ein signifikantes Ergebnis. Bei der Vorinkubation der Zellen mit Plasma und Pentaglobin und anschließender LPS-Stimulation kam es zu einer Verdoppelung der gemessenen PCT-Werte.

6.3 Einfluss von Arterenol

6.3.1 Wirkung von Arterenol auf die TNF- α -Synthese in PBMC gesunder Probanden

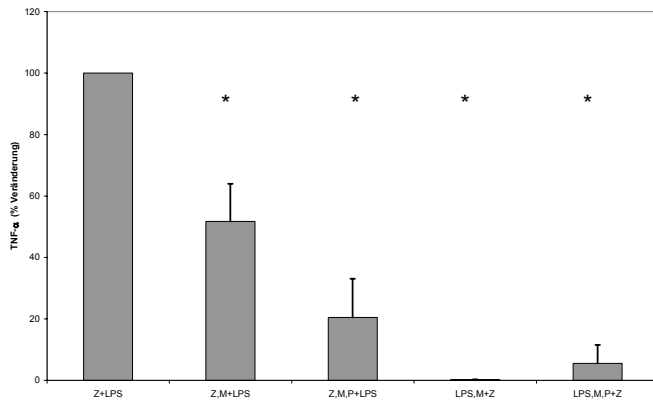


Abbildung 9

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Die Ergebnisse meiner Studie konnten einen reduzierenden Einfluss des Katecholamins Arterenol auf die TNF- α Synthese in allen Testansätzen zeigen (P<0,005). Die ausgeprägteste Reduktion wurde bei LPS,M+Z gemessen. Hier kam es zu einer fast 100%igen Erniedrigung gegenüber der Kontrolle. Bei der Vorinkubation des LPS mit Arterenol und Plasma kam es zu einer etwa schwächeren Reduktion als bei einer Vorinkubation der PBMC mit Arterenol und dem Plasma.

6.3.2 Wirkung von Arterenol auf die TNF- α -Synthese in den PBMC der Patienten

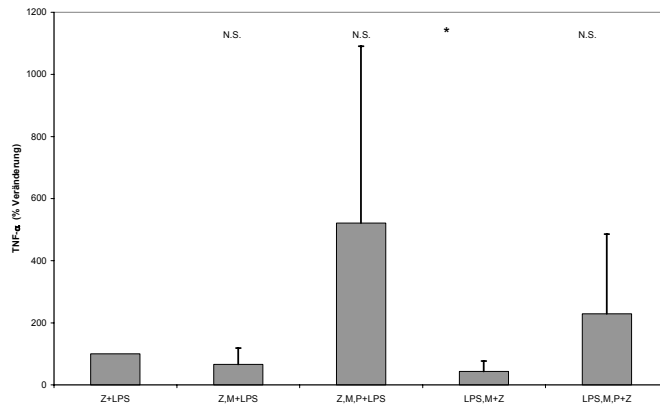


Abbildung 10

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Im Gegensatz zu dem Probandendurchgang fand sich hier nur ein signifikantes Ergebnis. Die Vorinkubation des LPS mit Arterenol (LPS,M+Z) führte zu einer Reduktion der gemessenen TNF- α Konzentration auf 43,49% gegenüber der Kontrolle. Im Vergleich zu der Reduktion bei den gesunden Probanden in diesem Testansatz erscheint sie aber deutlich abgeschwächt.

6.3.3 Wirkung von Arterenol auf die IL-6-Synthese in PBMC gesunder der Probanden

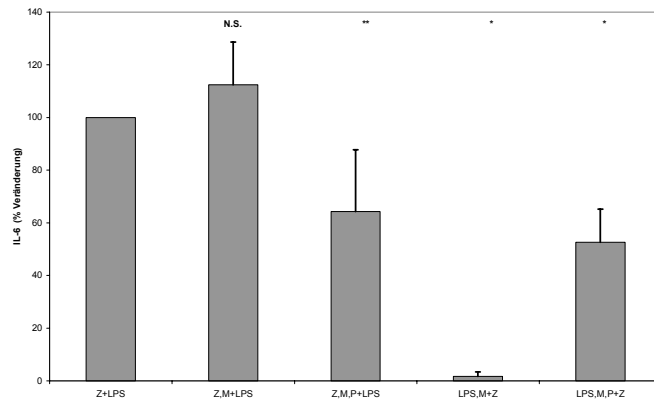


Abbildung 11

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Die Messung der IL-6 Konzentrationen zeigte sich wie bei TNF- α in den meisten Testansätzen reduziert. Ausnahme war jedoch eine leichte Erhöhung die, bei der Vorinkubation der Zellen mit Arterenol auftrat(Z,M+LPS). Diese war jedoch nicht signifikant.

6.3.4 Wirkung von Arterenol auf die IL-6-Synthese in den PBMC der Patienten

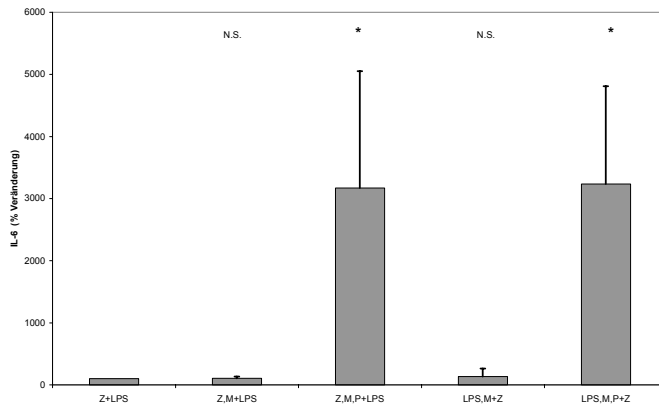


Abbildung 12

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Im Gegensatz zu dem Probandendurchgang fand sich hier nur ein signifikantes Ergebnis. Zu einer deutlichen und signifikanten Erhöhung der IL-6 Konzentrationen kam es in den beiden Testansätzen in denen Plasma zugefügt wurde.

6.3.5 Wirkung von Arterenol auf die IL-10-Synthese

Bei den Probanden wurde keine signifikante Messung von IL-10 wurde beobachtet. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Patienten. Wiederum blieben signifikante Messungen von IL-10 aus. Die Messergebnisse zeigten, wenn auch nicht signifikant, keinen oder einen leicht erhöhenden Effekt von Pentaglobin.

6.3.6 Wirkung von Arterenol auf die IFN- γ -Synthese

Eine signifikante Messung war bei den Probanden zu beobachten. In dem Testansatz in dem PBMC mit Plasma und Arterenol vorinkubiert und nachfolgend mit LPS stimuliert wurden, zeigte sich eine um 38% gegenüber der Kontrolle erhöhte IFN- γ Konzentration. Die Messwerte der Patienten zeigten auch hier weder eine Signifikanz noch eine Tendenz in den Messungen.

6.3.7 Wirkung von Arterenol auf die PCT-Synthese

Bei den Probanden kam es zu einem signifikanten Ergebnis. Bei der Vorinkubation des LPS mit Plasma und Arterenol und anschließender Zugabe der Zellen kam es zu einer fast doppelten Messung von PCT. Bei den Patienten kam es zu zwei signifikanten Ergebnissen. Im Testansatz Z, M, P + LPS kam es zu einer um 87 % gesteigerten Messung von PCT. Auch im Testansatz LPS, P, M+Z kam es zu einer um fast 90% erhöhten Messung von PCT gegenüber der Kontrolle.

6.4 Ultiva und Propofol

6.4.1 Wirkung von Ultiva/Propofol auf die TNF- α -Synthese in den PBMC der Probanden

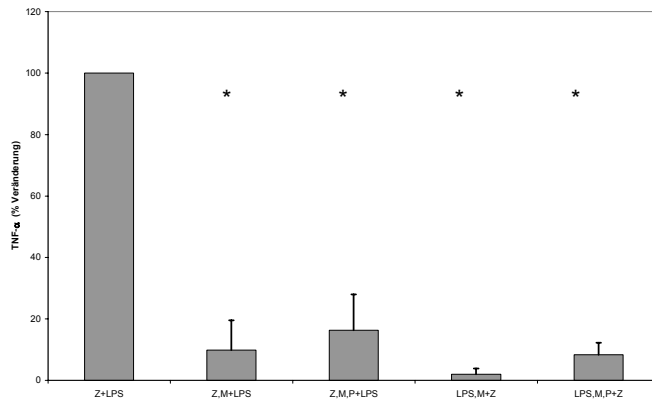


Abbildung 13

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

In allen Testansätzen wurde die TNF- α Ausschüttung deutlich reduziert (P<0,005). Die deutlichste Reduktion erbrachte der Testansatz in dem das LPS mit Ultiva/Propofol vorinkubiert wurde. Hier kam es zu einer Reduktion auf 1,96% gegenüber der Kontrolle. Auffallend war jedoch, dass das Plasma den erniedrigenden Effekt hemmte. Die Reduktion war aber immer noch sehr deutlich zu messen.

6.4.2 Wirkung von Ultiva/Propofol auf die TNF- α -Synthese in den PBMC der Patienten

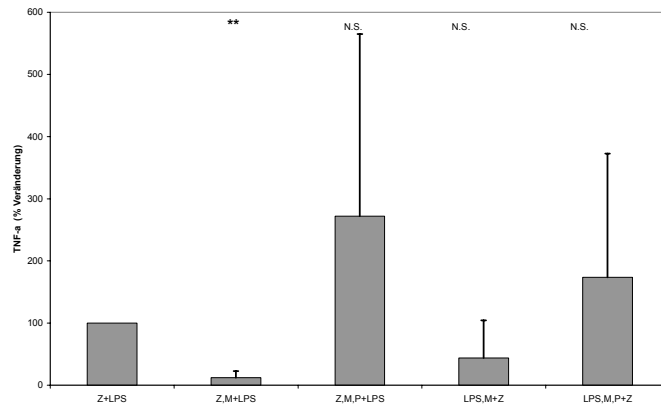


Abbildung 14

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Im Testdurchlauf der Patienten zeigt nur ein Testansatz ein signifikantes Ergebnis. Bei der Vorinkubation der Zellen mit Ultiva/Propofol (Z,M+LPS) kam es zur einer Reduktion um 87,65% im Vergleich zu der Kontrolle. Bei den Testansätzen in denen mit Poolplasma gearbeitet wurde zeigte sich eine drastische Erhöhung der gemessenen TNF- α Werte. Diese war aber nicht signifikant.

6.4.3 Wirkung von Ultiva/Propofol auf die IL-6-Synthese in den PBMC der Probanden

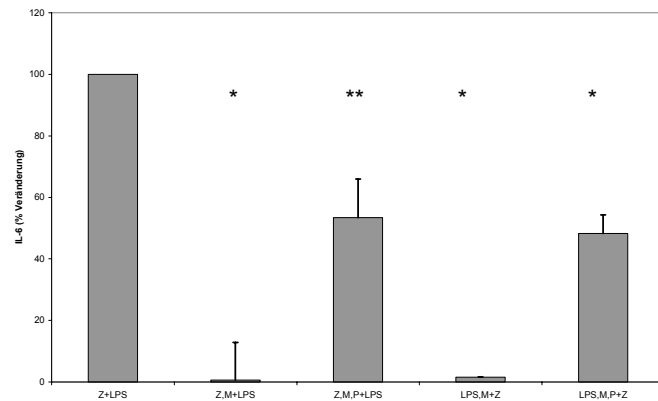


Abbildung 15

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

In allen Testansätzen wurde die IL-6-Ausschüttung deutlich reduziert. Auffallend war jedoch, dass durch das Plasma der erniedrigende Effekt deutlich abgeschwächt wurde. In den beiden Testansätzen ohne Poolplasma septischer Patienten kam es zu einer Reduktion auf 99,43% (Z,M+LPS) und 98,46% (LPS,M+Z) gegenüber der Kontrolle.

6.4.4 Wirkung von Ultiva/Propofol auf die IL-6-Synthese in den PBMC septischer Patienten

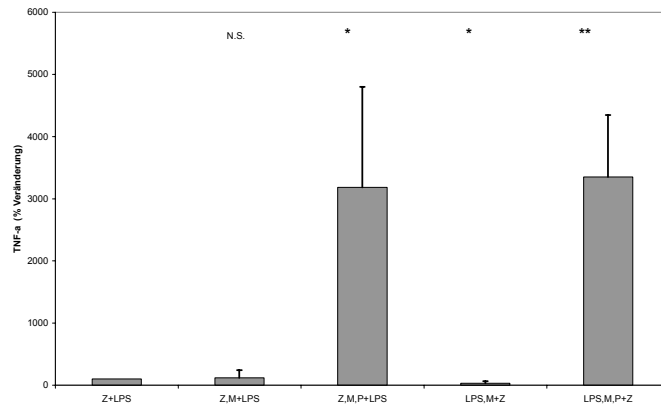


Abbildung 16

*P < 0,005 ; **P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Die Ergebnisse des Patientendurchlaufes zeigten eine signifikante drastische Erhöhung der IL-6 Werte in den Testansätzen in denen Plasma septischer Patienten zugefügt wurde. Die deutliche Reduktion wie man sie in den Testansätzen bei den Probanden beobachtete sah man in keinem Testansatz. Jedoch führte die Vorinkubation des LPS mit Ultiva/Propofol zu einer Reduktion auf 27,43% gegenüber der Kontrolle.

6.4.5 Wirkung von U/P auf die IL-10-Synthese

Bei den Probanden ergaben sich zwei signifikante Ergebnisse. In den Testansätzen Z, M+LPS und LPS, M +Z kam es zu einer sehr signifikanten Reduktion der IL-10 Messung auf 66 und 73 % gegenüber der Kontrolle. Bei den Patienten zeigten die Messwerte hier weder eine Signifikanz noch eine Tendenz In den Messungen.

6.4.6 Wirkung von U/P auf die IFN- γ -Synthese

Eine signifikante Messung war bei den Probanden zu beobachten. In dem Testansatz in dem PBMC mit Ultiva/Propofol vorinkubiert und anschließend mit LPS stimuliert wurden zeigte sich eine um 47 % erhöhte IFN- γ Konzentration. Die Messwerte der Patienten zeigten keine Signifikanz, jedoch eine Tendenz in den Messungen. So konnte man in den Testansätzen in denen Plasma hinzugefügt wurde eine Erniedrigung und in den Testansätzen ohne Plasma eine Erhöhung der IFN- γ Werte feststellen.

6.4.7 Wirkung von U/P auf die PCT-Synthese

Die Messreihe der Probanden zeigte ein signifikantes Ergebnis. Eine um 157 % erhöhte PCT-Messung zeigte sich in dem Ansatz Z,M,P + LPS. Bei den Patienten kam es zu zwei signifikanten Ergebnissen. In den Testansätzen Z,M,P+ LPS und LPS,P +Z kam es zu einer gesteigerten Messung von PCT.

6.5 Einfluss von Fentanyl und Dormicum

6.5.1 Wirkung von Fentanyl/Dormicum auf die TNF- α -Synthese in den PBMC der Probanden

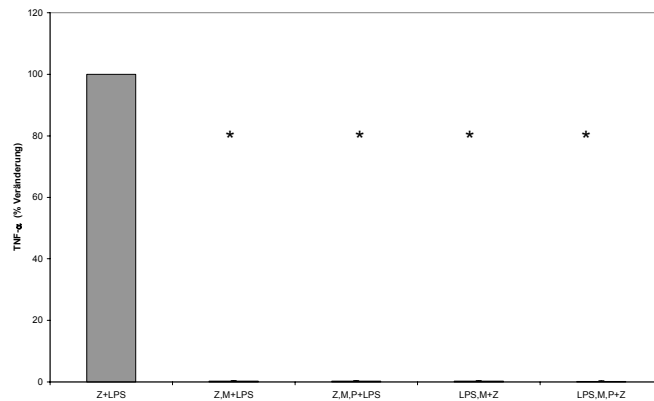


Abbildung 17

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Die Kombination Fentanyl/Dormicum führte in allen Testansätzen zu einer Reduktion der TNF- α Messergebnisse auf ca. 0,2% im Vergleich zu der Kontrolle. Diese Resultate waren alle signifikant.

6.5.2 Wirkung von Fentanyl/Dormicum auf die TNF- α -Synthese in PBMC der Patienten

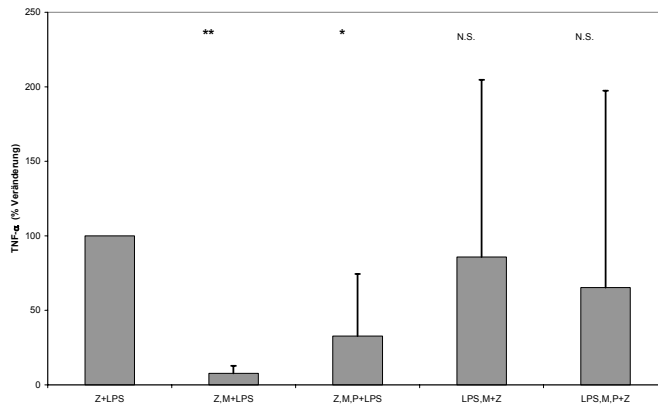


Abbildung 18

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Die TNF- α Konzentration wurde in allen Testansätzen, wenn auch nicht immer signifikant, erniedrigt gemessen. Die Vorinkubation der Zellen mit Fentanyl/Dormicum führte sogar zu einer sehr signifikanten Reduktion. Sie betrug 92,33%. Diese deutliche Erniedrigung wurde durch die Zugabe von Poolplasma abgeschwächt (Reduktion um 67,33%). Die übrigen beiden Testansätze führten zwar auch zu reduziert gemessenen TNF- α Werten, jedoch waren diese Messungen nicht signifikant.

6.5.3 Wirkung von Fentanyl/Dormicum auf die IL-6-Synthese in den PBMC der Probanden

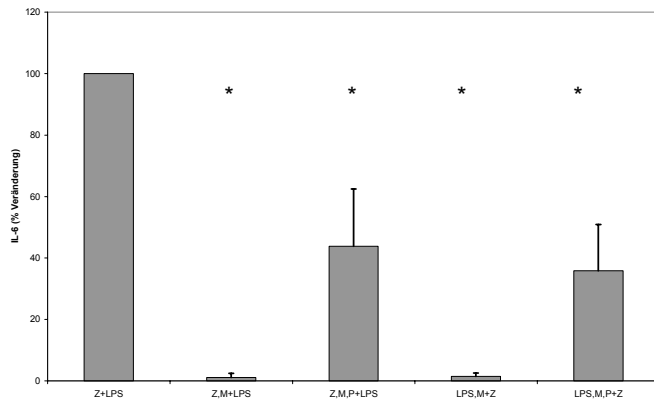


Abbildung 19

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Die gemessenen IL-6-Werte zeigten alle eine Reduktion gegenüber der gemessenen Kontrolle. Die Herabregulierung der IL-6 Werte war in den Testansätzen ohne Poolplasma septischer Patienten deutlicher. So reduzierte die Vorinkubation der Zellen mit Fentanyl/Dormicum die gemessene IL-6 Konzentration auf 11,09% gegenüber der Kontrolle. Noch deutlicher wurde die Reduktion bei der Vorinkubation des LPS (Reduktion auf 1,42% gegenüber der Kontrolle).

6.5.4 Wirkung von Fentanyl/Dormicum auf die IL-6-Synthese in PBMC der Patienten

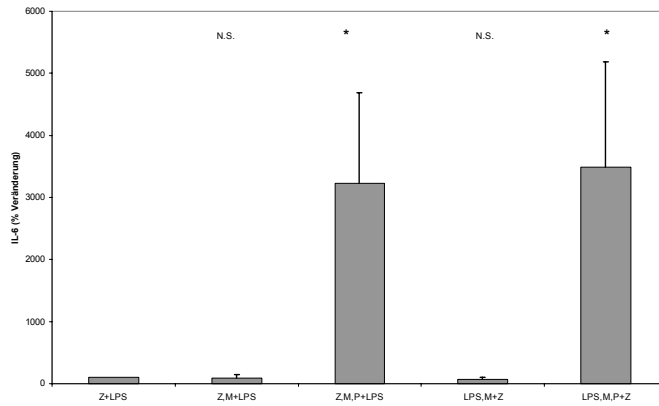


Abbildung 20

**P < 0,005 ; *P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

In dieser Testreihe kam nur zu zwei signifikanten Ergebnissen. IL-6 wurde in den beiden Ansätzen mit Poolplasma (Z,M,P+LPS und LPS,M,P+Z) signifikant erhöht gemessen. In den beiden Ansätzen ohne Poolplasma kam es zwar zu einer erniedrigten Messung von IL-6 jedoch waren diese Resultate nicht signifikant.

6.5.5 Wirkung von F/D auf die IL-10-Synthese in PBMC gesunder Probanden

Bei den Probanden konnten zwei Ergebnisse signifikant gemessen werden. In den Testansätzen Z, M, P +LPS und LPS, M +Z kam es zu einer sehr signifikanten Reduktion der IL-10 Messung auf 60 bzw. 80 % gegenüber der Kontrolle. Die Messwerte der Patienten zeigten hier weder eine Signifikanz noch eine Tendenz in den Messungen.

6.5.6 Wirkung von F/D auf die IFN- γ - Synthese

Die Messwerte der Probanden zeigten keine Signifikanz jedoch eine Tendenz in den Messungen. So konnte man in den Testansätzen in denen Plasma hinzugefügt wurde eine Erniedrigung und in den Testansätzen ohne Plasma eine Erhöhung der IFN- γ Werte feststellen. Die Messwerte der Patienten zeigten wiederum keine Signifikanz jedoch auch wieder eine Tendenz in den Messungen. So konnte man wie schon bei den Probanden in den Testansätzen in denen Plasma hinzugefügt wurde eine Erniedrigung und in den Testansätzen ohne Plasma eine Erhöhung der IFN- γ Werte feststellen.

6.5.7 Wirkung von F/D auf die PCT-Synthese

Zwei sehr signifikante Ergebnisse konnten bei den Probanden beobachtet werden. In den beiden Testansätzen in denen Plasma zugefügt wurde (Z,M,P+LPS und LPS,M,P+Z) wurde eine erhöhte PCT-Konzentration gemessen. Bei den Patienten kam es zu einem sehr signifikanten Ergebnis. In dem Testansätzen LPS,M, P + Z es zu einer um 80 % gesteigerten Messung von PCT im Vergleich zu der Kontrolle.

6.6 Plasma

6.6.1 Wirkung des Poolplasmas auf die TNF- α -Synthese in den PBMC gesunder Probanden

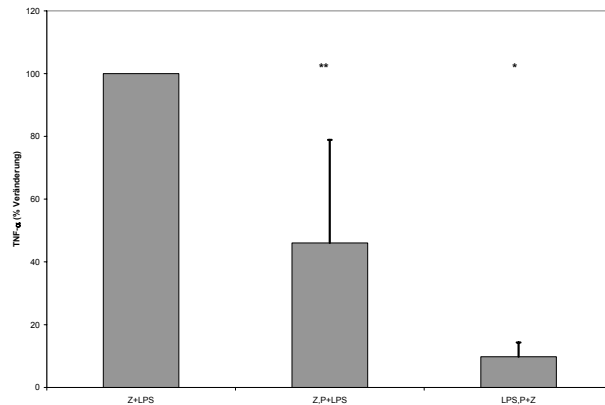


Abbildung 21

*P < 0,005 ; **P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Die Vorinkubation der Zellen mit Plasma septischer Patienten und folgender LPS-Stimulation hatte eine reduzierte TNF- α Messung zur Folge (P<0,05). In dem Ansatz in dem LPS mit Plasma vorinkubiert wurde kam es zu einer noch stärkeren Reduktion gegenüber der Kontrolle (P<0,05).

6.6.2 Wirkung des Poolplasmas auf die TNF- α -Synthese in den PBMC der Patienten

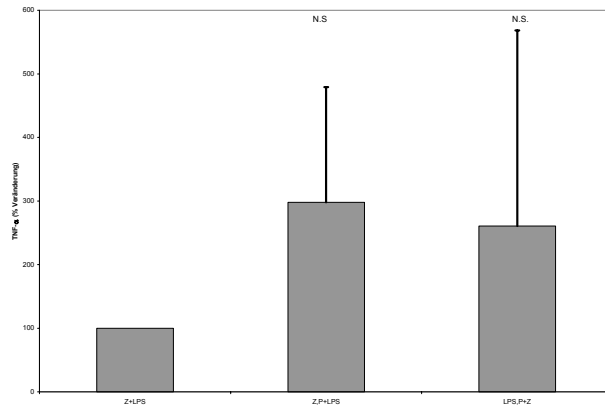


Abbildung 22

*P < 0,005 ; **P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Beide Testansätze zeigten erhöhte Werte. Diese Messungen waren allerdings nicht signifikant.

6.6.3 Wirkung des Poolplasmas auf die IL-6-Synthese in den PBMC gesunder Probanden

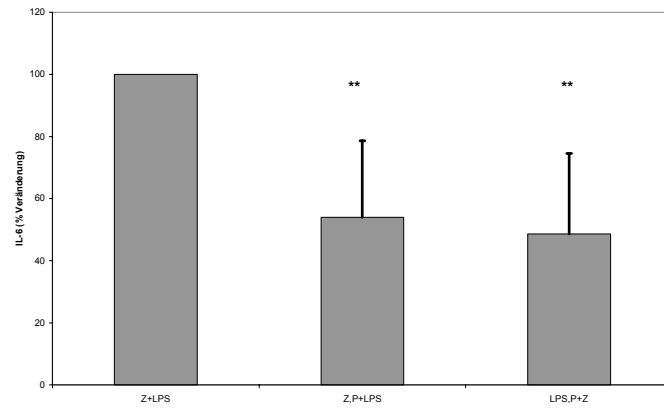


Abbildung 23

*P < 0,005 ; **P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Die Interleukin-6 Produktion wurde in beiden Testansätzen erniedrigt gemessen. Diese Reduktion war ausgeprägter bei der Vorinkubation des LPS (LPS,P+Z) als bei der Vorinkubation der Zellen (Z,P+LPS). Beide Messergebnisse waren sehr signifikant (P<0,005).

6.6.4 Wirkung des Poolplasmas auf die IL-6-Synthese in den PBMC Patienten

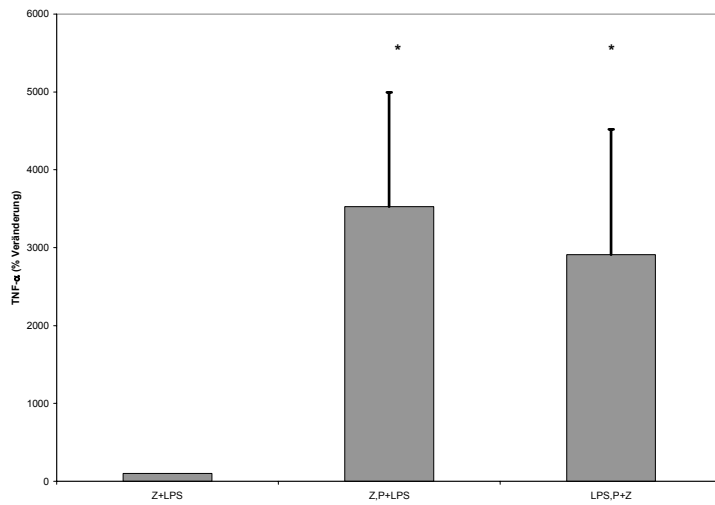


Abbildung 24

*P < 0,005 ; **P < 0,05 ; N.S. = nicht signifikant

Hier kam es in beiden Messungen zu sehr stark erhöhten und sehr signifikanten Ergebnissen.

6.6.5 Wirkung von Plasma septischer Patienten auf die IL-10-Synthese

Keine signifikanten Messungen bei den Probanden. Es wurde jedoch eine Tendenz zu erhöhten IL-10-Werten deutlich. Bei den Patienten ergaben sich wiederum keine signifikanten Messungen. Es wurde jedoch auch wie bei den Probanden eine Tendenz zu erhöhten IL-10-Werten deutlich.

6.6.6 Wirkung von Plasma septischer Patienten auf die IFN- γ -Synthese

Die Messwerte zeigten bei Probanden und Patienten weder eine Signifikanz noch eine Tendenz in den Messungen.

6.6.7 Wirkung von Plasma septischer Patienten auf die PCT-Synthese

Zwei sehr signifikante Ergebnisse konnten bei den Probanden beobachtet werden. In den beiden Testansätzen in denen Plasma zugefügt wurde konnte eine erhöhte PCT -Konzentration gemessen werden. Bei den Patienten kam es zu einem signifikanten Ergebnis. In dem Testansätzen Z, P + LPS kam es zu einer Erhöhung um 118% der von Messung von PCT gegenüber der Kontrolle.

6.7 Gegenüberstellung der Messwerte von TNF- α eines Patienten im Verlauf

6.7.1 Z,M+LPS

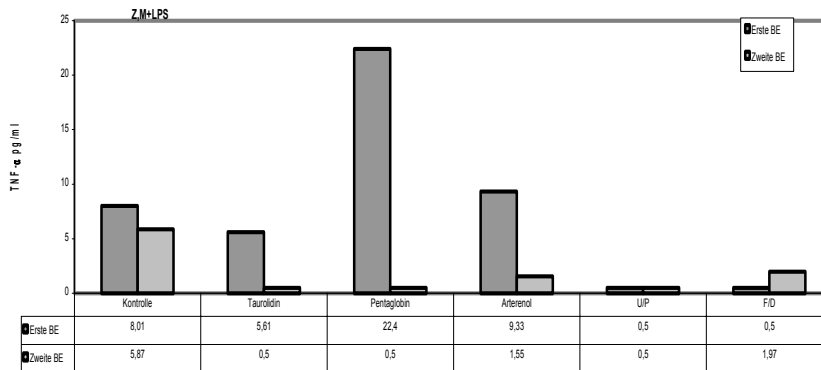


Abbildung 25

Taurolidin führte sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Blutentnahme zu einer Reduktion der TNF- α Konzentration im Vergleich zu der Kontrolle. Zu einer deutlichen Zunahme der TNF- α Wertes kam es bei der Zugabe von Pentaglobin bei der ersten BE. Bei der zweiten BE hingegen wurde TNF- α deutlich erniedrigt gemessen. Ähnliche Ergebnisse erbrachte die Zugabe von Arterenol. Die Analgesie/Sedativa- Kombination Ultiva/Propofol führte zu einer bemerkenswerten Reduktion bei beiden Abnahmen. Ebenfalls zu einer Erniedrigung bei beiden Messungen führte die Addition von Fentanyl und Dormicum.

6.7.2 Z,M,P+LPS

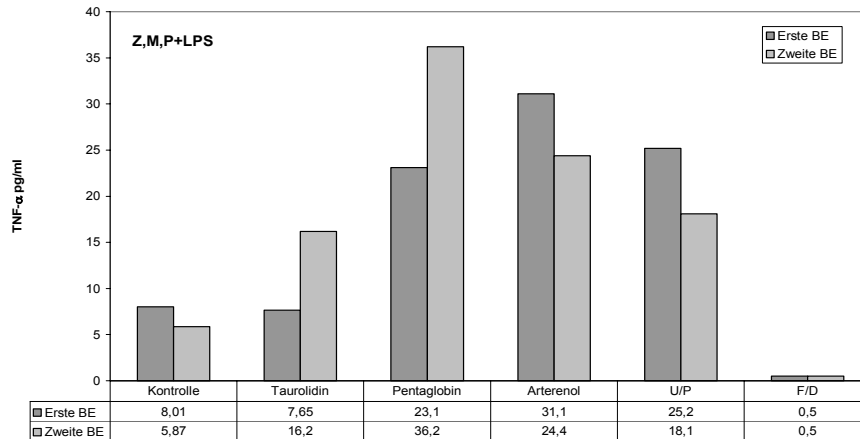


Abbildung 26

Durch die Zugabe von Plasma wurde die TNF- α Konzentration bei Pentaglobin, Arterenol und U/P erhöht bei beiden Abnahmen gemessen. Taurolidin führte in diesem Testansatz bei der ersten Blutentnahme zu einer leichten Reduktion, bei der zweiten Abnahme jedoch zu einer Steigerung. Fentanyl/Dormicum hingegen reduzierte bei beiden Blutentnahmen die Werte im Vergleich zu der Kontrolle deutlich.

6.7.3 LPS,M+Z

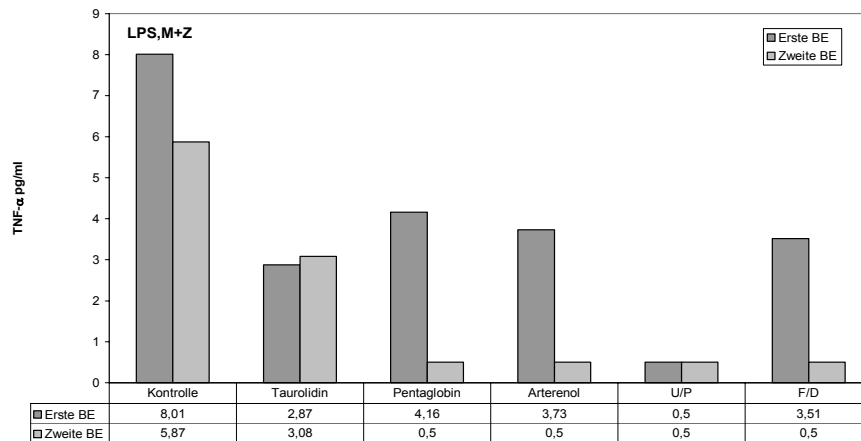


Abbildung 27

Die Vorinkubation des LPS mit den Medikamenten führte in allen Ansätzen zu einer reduziert gemessenen TNF- α Konzentration. Diese Erniedrigung wurde bei Pentaglobin, Arterenol und Fentanyl/Dormicum deutlicher bei der zweiten BE gemessen. Taurolidin hingegen führte bei der ersten BE zu einer stärkeren Abnahme der TNF- α Konzentration. Ultiva/Propofol erbrachte bei beiden Abnahmen stark reduzierte Werte im Vergleich zu der Kontrolle.

6.7.4 LPS,M,P+Z

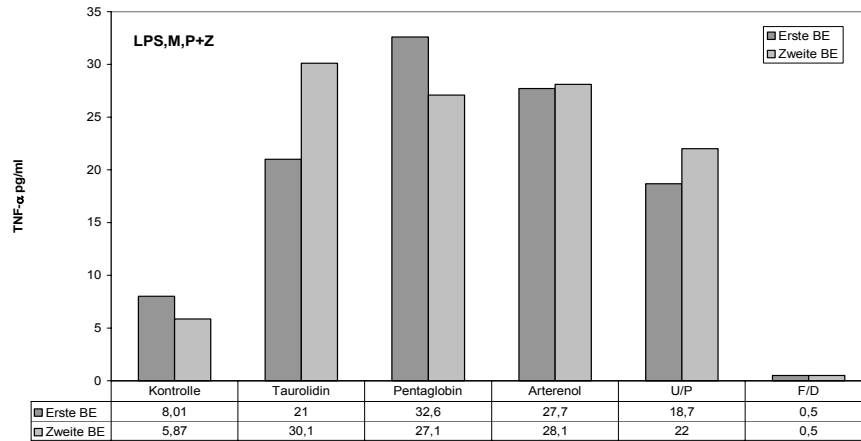


Abbildung 28

Die Zugabe von Poolplasma zu der Vorinkubation des Endotoxins führte zu erhöht gemessenen TNF- α Werten bei Taurolidin, Pentaglobin, Arterenol sowie Ultiva/Propofol.Fentanyl/Dormicum reduzierte die Messergebnisse bis an die Nachweisgrenze von 0,5 pg/ml.

6.7.5 Plasma

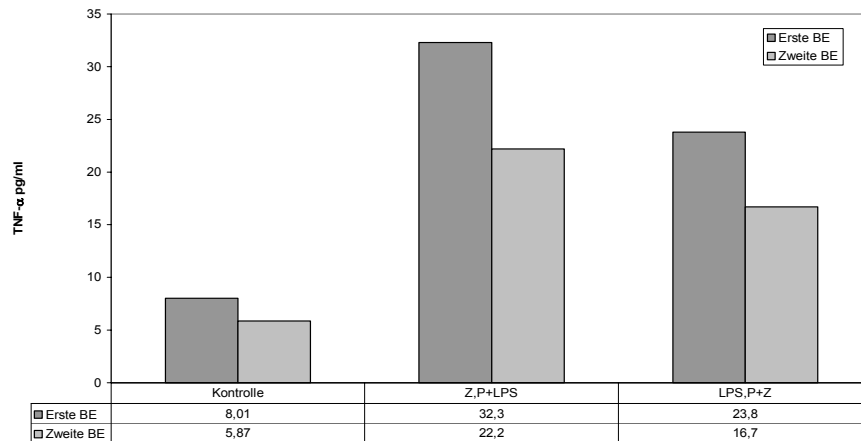


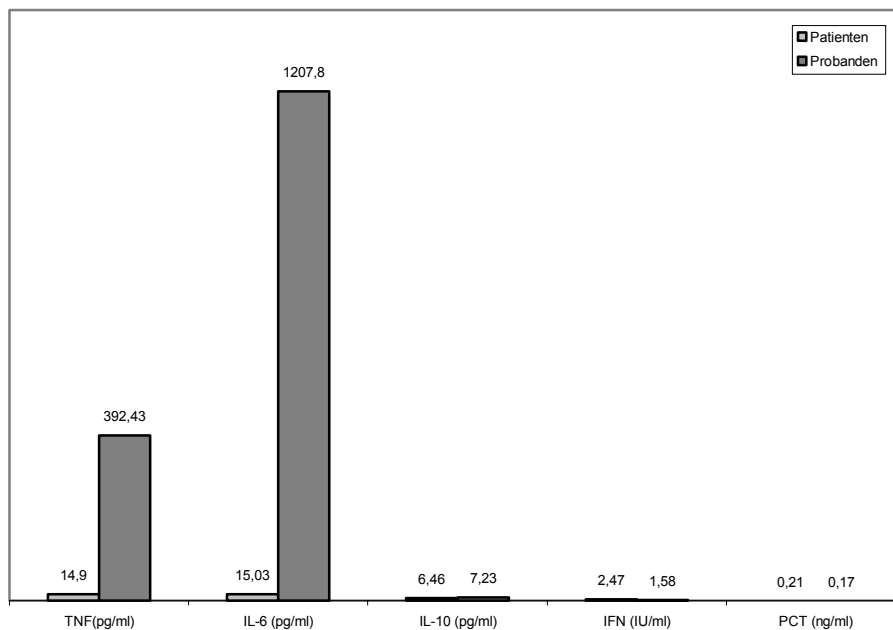
Abbildung 29

Bei beiden Testansätzen und bei beiden Abnahmen kam es zu einer Zunahme der TNF- α Konzentration.

7 Diskussion

Vorbemerkungen:

Es muss vor der Diskussion der Ergebnisse angemerkt werden, dass sowohl TNF- α , als auch IL-6 in der Kontrolle, d.h. im Testansatz 1 (Z+LPS), in deutlich niedriger Konzentration als bei den gesunden Probanden gemessen wurden. Ein ähnliches Bild zeigten auch die Studien von Ertel et al. [42] und Munoz et al. [43]. Die übrigen Parameter zeigten in der Kontrolle (Testansatz 1) ähnliche Werte. Dies sollte man bei der Ansicht der nachfolgenden Grafiken, in denen prozentuale Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen dargestellt werden berücksichtigt werden berücksichtigen.



Grafik 6

Erklärungen zu den Diagrammen:

- Z:** PBMC
- M:** Das jeweilige Medikament
- P:** Plasma aus dem Pool
- +**: Trennt die erste von der zweiten Inkubation

7.1 Taurolidin

Taurolidin ist ein Abkömmling der Aminosulfonsäure Taurin. Es wirkt bakterizid auf alle grampositiven, gramnegativen sowie obligat anaeroben Bakterien wie auch auf die meisten Pilzarten, insbesondere *Candida-albicans*-Stämme [9]. Taurolidin führt zur Zerstörung von Bakterienmembranen und gleichzeitig zur Vernetzung der Membrananteile und Funktionsproteinen (LPS) [10] und besitzt so auch eine endotoxin-neutralisierende Wirkung. In aktuellen Arbeiten werden unter anderem weiterhin ein antineoplastischer Effekt von Taurolidin auf Gehirntumorzellen des Menschen [12] *in vitro*, sowie ein wachstumshemmender Effekt auf kolorektale Tumorzelllinien von Ratten *in vivo* und *in vitro* beschrieben [13]. Nach *i.v.* Applikation von Taurolidin entsteht durch enzymatische Hydrolyse ein doppelt so aktiver Metabolit, nämlich Taurultam. Nach Freisetzung einer Methylol-Gruppe wird Taurultam über Methyloltaurinamid weiter zu Taurin hydrolysiert. Diese abgespaltenen Methylolgruppen haben eine lokale Aktivität zu Bestandteilen der Bakterien- und Pilzzellwand und verbinden sich mit diesen irreversibel. Hierdurch entsteht der bakterizide Effekt. Diese chemische Inaktivierung und Vernetzung erfolgt durch die oben genannten Methylolgruppen. Ebenso hemmt Taurolidin die bakterielle Adhärenz von Bakterien. Auch besitzt Taurolidin eine zytokinmodulierende Wirkung. Die reduzierende Wirkung auf die Freisetzung von TNF- α und IL-1 wurde von Bedrosian et al. [11] durch *in-vitro* Versuche an Makrophagenkulturen bekannt. Unabhängig, ob mit gramnegativen, grampositiven bzw. Endo- oder auch Exotoxin stimuliert wurde, die PBMC sezernierten dosisabhängig von Taurolidin signifikant weniger TNF- α und IL-1. So führte eine Konzentration von 40-100 μ g/ml zu einer 80-90%igen Verminderung der durch Endotoxin induzierten IL-1- und TNF- α -Synthese. In

der Studie von Bedrosian et al. wurden PBMC gesunder Spender untersucht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten gleiche Effekte des Taurolidin auf die TNF- α und IL-6 Synthese der PBMC gesunder Probanden. In allen Testansätzen wurde die TNF- α und IL-6 Produktion durch die isolierten peripheren mononukleären Zellen der gesunden Spender signifikant unterdrückt. Bei den PBMC der Patienten blieben diese deutlichen Ergebnisse aus. Die Zunahme von IL-6 und TNF- α in den Testansätzen in denen Plasma septischer Patienten verwendet wurde liegt wahrscheinlich an der Konzentration dieser Parameter im Plasma selbst. Als weitere mögliche Ursache muss die im Vergleich zu den Probanden niedrig gemessene Kontrolle bedacht werden. Die PBMC der Spender produzierten bedeutend mehr TNF- α und IL-6 als die Zellen der Patienten. Der Grund warum PBMC septischer Patienten weniger IL-6 und TNF- α produzieren wird z.B. in einer Endotoxintoleranz der Zellen gesehen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Erschöpfung der Syntheseleistung dieser Immunzellen im septischen Geschehen. Auf die IL-10 und IFN- γ Produktion der PBMC gesunder Probanden nahm Taurolidin in den Ansätzen dieser Arbeit keinen signifikanten Einfluss. Procalcitonin wurde in zwei Testansätzen bei den Probanden (Z,M,P+LPS und LPS,M,P+Z) signifikant gemessen. In beiden Testansätzen kam es zu einer Erhöhung der PCT-Konzentration. Da in diesen beiden Ansätzen wiederum Plasma, mit erhöhter PCT zugesetzt wurde, ist diese Steigerung wohl auf den PCT- Gehalt des Plasmas zurückzuführen. Es ist jedoch auch möglich das die erhöhten PCT- Werte nicht nur auf den PCT- Gehalt des Plasmas, sondern auch auf der einen Seite durch das LPS und auf der anderen Seite durch die im Plasma der septischen Patienten enthaltenen proinflammatorischen Zytokine zurückzuführen sind. Diesen Einfluss von LPS und proinflammatorischen Zytokinen auf die PCT-Freisetzung aus PBMC

beschrieb Oberhoffer et al. [44]. Auch bei den Patienten zeigten sich zwei signifikante Messungen der PCT- Konzentration. Wiederum konnte bei der Vorinkubation der PBMC mit Plasma und Taurolidin und anschließender LPS-Stimulation PCT erhöht gemessen werden. Zu einer Reduktion auf 64 % gegenüber der Kontrolle kam bei der Vorinkubation des LPS mit Taurolidin. Diese Reduktion ist wohl auf die Fähigkeit der Endotoxinneutralisation des Taurolidin zurückzuführen.

7.2 Pentaglobin

Immunglobulinen werden einige mögliche Wirkmechanismen bei der Therapie von Sepsis, MODS (multiple organ dysfunction syndrome) und SIRS zugeschrieben. Trautmann et al. [14] berichteten über die Fähigkeit von Immunglobulinen Endotoxin zu neutralisieren. Immunglobulinpräparate können auch Antizytokinautoantikörper enthalten, die zur Zytokinneutralisierung führen (Menezes et al. [15]). Des Weiteren sind in Immunglobulinpräparaten auch Zytokine enthalten, die einen Einfluss auf den Krankheitsablauf zeigen können (Kekow et al.[16]). Als weitere Wirkungsmechanismen wurden unter anderem eine beschleunigte LPS-Clearance (Koch et al. [17]) sowie eine Verminderung der bakteriellen Zelladhärenz und Zellinvasion (Fluckiger et al.[18]) beschrieben. Andersson et al. [19] berichteten über eine Beeinflussung der Freisetzung von Zytokinen und Zytokinantagonisten aus Endotoxin- und Supergenaktivierten mononukleären Blutzellen. Fazit der Studie von Andersson: Pro-Inflammation wird gehemmt, Anti-Inflammation wird gefördert. In unserer Studie verwendetes Pentaglobin ist ein IgM-haltiges Immunglobulinpräparat und enthält pro 100 ml 0,6g IgM, 3,8g IgG und 0,6g IgA. Auf die TNF- α Synthese der Pöbändenmonocyten

zeigte Pentaglobin bis auf einen Ansatz einen reduzierenden Effekt. Bei dem einzigen nicht reduzierendem Ansatz (Z,M+P) wurde signifikant eine erhöhte Konzentration von TNF- α gemessen. Dies deutet darauf hin, dass das Pentaglobin die PBMC der Probanden entweder selber zur Ausschüttung von TNF- α anregt oder die Zellen darauf einstimmt auf den Stimulus Endotoxin mit einer stärkeren Ausschüttung des Zytokins TNF- α zu reagieren. Ursächlich könnte aber auch der IgG-Anteil im Pentaglobin zu dieser TNF- α Erhöhung geführt haben. In einer in vitro Studie zeigte z.B. Aukrust et al. [21], dass es durch IVIG zu einer in vivo Erhöhung von sowohl TNF- α als auch IL-6 kommt. Die Arbeit von Anderson et al. [20] erbrachte wiederum das Ergebnis, dass IVIG die IL-6 Produktion humaner PBMC auf LPS-Stimulation reduzierte. Im Bezug auf meine Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass es sich bei der Studie von Anderson et al. um ein 94% IgG enthaltendes Präparat handelte. Pentaglobin hingegen enthält bedeutend weniger IgG. Des Weiteren wurden die PBMC in dieser Arbeit gleichzeitig sowohl dem LPS als auch dem IVIG ausgesetzt. Der Zusatz des gepoolten Plasmas führte (Z,M,P+LPS und LPS,M,P+Z) zu einer deutlichen Reduktion der gemessenen TNF- α Konzentration gegenüber der Kontrolle. Dies könnte mit einer erhöhten Konzentration von löslichen TNF- α Rezeptoren in dem gepoolten Plasma zusammenhängen, die zu einer Neutralisation von TNF- α führen. Die starke Reduktion (auf 2% gegenüber der Kontrolle) in dem Testansatz in den LPS mit Pentaglobin vorinkubiert wurde (LPS,M+Z) deutet darauf hin, dass in Pentaglobin Immunglobuline mit Anti-LPS-Aktivität vorhanden sind, die das Endotoxin neutralisieren. Dies bestätigt die Ergebnisse der Studie von Trautmann et al.[14], der über die Fähigkeit von Immunglobulinen Endotoxin zu neutralisieren berichtete. Auf die Kapazität der IL-6 Synthese der PBMC der Probanden nahm Pentaglobin einen ähnlichen Einfluss wie auf den Parameter

TNF- α . Die zweistündige Vorinkubation der Zellen mit Pentaglobin (Z,M+LPS) resultierte in einer zum Vergleich zu der Kontrolle erhöhten Konzentration von IL-6 nach anschließender LPS-Stimulation. Diese Aussage war jedoch nicht signifikant. Die Testansätze in denen mit Poolplasma gearbeitet wurde zeigten alle einen reduzierenden Effekt. Mögliche Gründe sind dieselben wie bei TNF- α (s.o.). Die deutlichste Reduktion, wie auch schon bei TNF- α , war in dem Testansatz zu bemerken in dem LPS mit Pentaglobin vorinkubiert wurde (LPS,M +Z). Dieser Effekt wurde durch die Zugabe von Poolplasma leicht abgeschwächt. Ursache dieses mildernden Effektes kann unter anderem die hohe IL-6 Konzentration im Poolplasma sein. Interessanterweise sollte daran gedacht werden, dass Pentaglobin in meiner Versuchsreihe sowohl die TNF- α (signifikant) als auch die IL-6 Konzentration (nicht signifikant) in demselben Testansatz (Z,M+LPS) erhöhte. Da es in allen anderen Testansätzen zu einer Reduktion von TNF- α und IL-6 kam, scheint zumindestens in diesem Testansatz, Pentaglobin einen stimulierenden Effekt zu besitzen, proinflammatorische Zytokine auszuschütten. Bei den Patienten zeigten die Messungen von IL-6 und TNF- α kaum signifikante Ergebnisse. Eine signifikante Reduktion von TNF- α wurde lediglich bei der Vorinkubation des LPS mit Pentaglobin gemessen. Signifikante Messungen von IL-6 ergaben nur die Testansätze in denen Plasma zugefügt wurde. Die gemessene Erhöhung von IL-6 beruht wahrscheinlich auf der hohen IL-6 Konzentration des Poolplasmas. Die Parameter IL-10, IFN- γ und PCT konnten in dieser Arbeit bei den Testansätzen mit Pentaglobin sowohl bei den Patienten als auch bei den gesunden Probanden kaum signifikante Ergebnisse erbringen und entziehen sich deshalb der Diskussion.

7.3 Arterenol

Die Therapie mit Katecholaminen bei Patienten mit Sepsis/septischen Schock und Multiorganversagen hat zum Ziel, die Herz-Kreislauf-Schädigung zu kompensieren und damit die Durchblutung und die O₂-Versorgung der Vitalorgane sicherzustellen. Das Katecholamin Noradrenalin (Arterenol) ist aufgrund seiner vorwiegend alphasymmetrischen vasokonstriktorisches Wirkung häufig als Mittel der ersten Wahl zur Aufrechterhaltung des Perfusionsdruckes in der Sepsis eingesetzt. Durch die Vasokonstriktion wird eine Anhebung des pathologisch erniedrigten Gefäßwiderstandes (Vasodilatation durch Mediatorwirkung) ermöglicht, und es kommt somit zum Ansteigen des Blutdruckes. Die Wirkung von Arterenol auf Zellen des Immunsystems wurde bereits zum Gegenstand einiger Studien. In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass Noradrenalin die Produktion von TNF- α und IL-6 in durch LPS stimulierten PBMC hemmt [22,23]. Die Frage über welchen Rezeptor Noradrenalin zur TNF- α und IL-6 Reduktion führt wird zum Teil kontrovers diskutiert. Maes et al. [23] beschrieb, dass der inhibierende Effekt von Noradrenalin auf die durch LPS induzierte IL-6 Synthese, komplett durch die Anwesenheit des Betablockers Metoprolol aufgehoben wurde. Gleiche Effekte konnten bei der Gabe von Phentolamine, einem α -Blocker, nicht beobachtet werden. Dies legt eine inhibitorische Wirkung des Noradrenalin auf die IL-6 Produktion über Stimulation von β -Rezeptoren nahe. Dies bestätigt auch die Arbeit von Izeboud et al.[24]. Dieser legte in seiner Studie dar, dass der β -Agonist Clenbuterol die LPS induzierte Produktion von TNF- α und IL-6 in vitro und in vivo hemmt. Guirao et al [24]. charakterisierte als für den für die TNF- α Reduktion verantwortlichen Rezeptor den β_2 -Rezeptor. Maes et al.[23] vermutet in seiner Arbeit, dass die

Suppression der TNF- α Produktion durch Noradrenalin wahrscheinlich α_2 -Rezeptor abhängig ist. In dieser Studie zeigten die PBMC der Probanden die gleichen Ergebnisse wie in den oben genannten Arbeiten [22,23]. Arterenol führte in allen Testansätzen zu einer sehr signifikanten Reduktion der TNF- α Konzentration. Am deutlichsten war die Reduktion bei der Vorinkubation des LPS mit Arterenol (LPS,M+Z). Das Ergebnis zeigte sich um 99% erniedrigt gegenüber der Kontrolle. Bei den Patienten zeigte sich bezüglich der TNF- α Messung nur ein signifikantes Ergebnis. Wiederum kam es zu einer Reduktion in dem oben genannten Testansatz (LPS,M+Z). Sie war mit 43,4 % gegenüber der Kontrolle nicht so ausgeprägt wie bei den Probanden. Diese abgeschwächt Wirkung des Arterenol auf PBMC septisch Kranker wurde beschrieben. Die Verminderung der TNF- α Konzentration in diesem Testansatz (LPS,M+Z) lässt vermuten, dass Arterenol einen direkten Einfluss auf das Endotoxin nimmt. Auch die bei den Probanden wurde die IL-6 Freisetzung in allen Testansätzen gehemmt. Bei den Patienten kam es in den beiden Testansätzen mit septischem Poolplasma zu einer Erhöhung der IL-6 Werte. Eine mögliche Ursache hierfür ist wahrscheinlich wieder der hohe IL-6 Gehalt des Poolplasmas. Als eine weitere Wirkung des Noradrenalins wurde ein Erhöhung der IL-10 Synthese in PBMC beschrieben [26]. Diese Erhöhung konnte in meiner Arbeit nicht bestätigt werden, da es sowohl bei den Patienten als auch bei den Probanden zu keiner signifikanten Messung von IL-10 kam. Die oben beschriebene Steigerung der IL-10 Produktion wurde auch für andere cAMP erhöhende Agentien [28] postuliert. Zu einer Erhöhung der [cAMP] führt die Stimulation von β -Rezeptoren. Nach Aktivierung der β -Rezeptoren kommt es durch die Stimulation der Adenylatcyclase zu der beschriebenen cAMP-Elevation. Die gesteigerte Synthese des second messengers cAMP ist für die Immunantwort sehr bedeutend. Dies trifft sowohl für die Hemmung der

Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6) als auch für die Steigerung der Synthese antiinflammatorischer Zytokine zu. In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, dass eine Erhöhung von cAMP zu einer reduzierten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α führt [29,30]. Farmer et al. [31] beschrieb die antiinflammatorische Wirkung von β -Rezeptor-Agonisten über den pathway von Transkriptionsfaktor NF- κ B. Die durch LPS induzierte Aktivierung und Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Kern wird durch Behandlung mit β -Rezeptor Agonisten und anderen cAMP erhöhenden Agenzien gehemmt. Diese fehlende Aktivierung führt zu einer Hemmung der Produktion von u.a. proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α . Eine deutliche Abschwächung der durch β -Rezeptoren beschriebenen cAMP-Elevation wurde bei septischen Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden von Bernardin et al. [28] beschrieben. Die Adenylatcyclase der PBMC wird sowohl indirekt mit Isoproterenol über den β -Rezeptor als auch direkt durch Natriumflorid aktiviert. Diese Stimulationen führte bei den Kranken zu einer deutlich niedrigeren [cAMP] als bei einer gesunden Vergleichsgruppe. Die Ergebnisse dieser Arbeit scheinen dies zu bestätigen. Dies ist eine mögliche Ursache für den abgeschwächten reduzierenden Effekt bei den Zellen der Patienten. Die PCT Konzentration wurde bei den Probanden einmal und bei den Patienten zweimal signifikant gemessen. In diesen Testansätzen kam es zu einem Anstieg von PCT. Da in diesen Ansätzen mit Poolplasma gearbeitet wurde ist der wahrscheinliche Grund dieser Erhöhung die PCT- Konzentration des Plasmas. IFN- γ konnte in dieser Arbeit bei den Testansätzen mit Arterenol sowohl bei den Patienten als auch bei den gesunden Probanden kaum einmal ein signifikantes Ergebnis erbringen und entziehen sich deshalb der Diskussion.

7.4 Ultiva/Propofol

Intensivpatienten, insbesondere beatmete Intensivpatienten, sind mannigfachem Stress ausgesetzt. Stressursache ist neben der häufig schmerzhaften Grunderkrankung unter anderem die Tatsache beatmet werden zu müssen und nicht in gewohnter Art und Weise mit der Umgebung kommunizieren zu können. Dazu kommen schmerzhaft diagnostische und therapeutische Manipulationen sowie Lärm, Stress und Hektik der Intensivstation. Die ungenügende Distanzierung von diesen Umständen und den notwendig werdenden intensivtherapeutischen Maßnahmen führt unter anderem zu unerwünschten vegetativen Veränderungen, wie Erhöhung des Sympathikotonus, negativer Beeinflussung hämodynamischer Parameter, Erhöhung des Sauerstoffverbrauches und eventuell Steigerung des intrakraniellen Druckes. Ein wesentliches Ziel der Intensivbehandlung muss es deswegen sein, dass die Intensivpatienten Manipulationen ruhig und gelassen ertragen, sprich sediert werden. Vorbedingung dafür ist neben adäquater Einstellung des Beatmungsgerätes die Schmerzfreiheit. Eine mangelhafte Analgesie kann trotz einer hochdosierten Verabreichung von Sedativa zu kaum beherrschbaren Unruhezuständen mit deren Folgen führen. Die Schmerzfreiheit ist deshalb als wichtigste Grundvoraussetzung jeder sedierender Behandlung anzusehen. Mittel der Wahl sind die Opioide. Remifentanil (Ultiva) ist ein kurzwirksames Opioid, dass wie Fentanyl, Alfentanil und Sufentanil in die Gruppe der 4-Anilinopiperidine einzuordnen ist. Es wirkt subtypspezifisch am μ -Opioidrezeptor. Die analgetische Potenz von Remifentanil ist mit der von Fentanyl vergleichbar. Das neue und zugleich besondere Charakteristikum im Vergleich zu den traditionellen Opioiden ist die Esterstruktur dieser Substanz, die einen schnellen enzymatischen Abbau

durch ubiquitär vorhandene Esterasen im Blut und Gewebe ermöglicht. In verschiedenen Arbeiten wurde die Kombination von Propofol und Remifentanil im Rahmen der totalen intravenösen Anästhesietechnik (TIVA) untersucht. In einer Studie von Hogue et al. [32] wurde gezeigt, dass die Kombination von Remifentanil und Propofol ein günstiges Regime ist, um in einer Vielzahl von chirurgischen Eingriffen mit unterschiedlicher Stimulation eine intraoperative Stabilität zu gewährleisten. Über die Wirkung von Opioiden auf PBMC ist bekannt, dass sie die Funktion dieser Zellen hemmen, d.h. antiinflammatorische Wirkung besitzen. So zeigte u.a. Chao et al. [33], dass Opiode die Freisetzung von TNF- α aus stimulierten PBMC erniedrigen. Auf die PBMC der Probanden, bezüglich der TNF- α Synthese, trifft in dieser Studie der gleiche Effekt zu. In allen Testansätzen wurde die TNF- α Ausschüttung deutlich reduziert ($P < 0,005$). Auch IL-6 wurde in allen Testansätzen bei den Probanden im Vergleich zu der Kontrolle erniedrigt gemessen. Bei den Patienten kam es hingegen kaum zu signifikanten Ergebnissen bei der Messung von TNF- α . Lediglich die Vorinkubation der Zellen mit Ultiva/Propofol (Z,M+LPS) führte zu einem signifikanten Ergebnis. Reduktion. Es kam zu einer Reduktion um 87,65% gegenüber der Kontrolle. Dies entspricht ca. dem Ergebnis bei den Probanden (Reduktion um 90,12% gegenüber der Kontrolle). Propofol hingegen ist ein kurz wirkendes intravenöses Narkosemittel ohne analgetische Wirkung. Es wird eingesetzt zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose (z.B. TIVA), zur Sedierung beatmeter Patienten im Rahmen der Intensivbehandlung sowie zur Sedierung bei chirurgischen und diagnostischen Eingriffen in Regional- und Lokalanästhesie. In einer aktuellen Studie zeigte Mammoto et al. [33], dass Propofol zu einer Abnahme der Invasivität verschiedener menschlicher Tumorzelllinien führt. Auf Zellen des Immunsystems wurden verschieden

Studien publiziert. Der Einfluss von Propofol auf die Freisetzung von Zytokinen wird zum Teil kontrovers diskutiert. So wurde gezeigt, dass Propofol zu einer Erhöhung der TNF- α Ausschüttung im LPS stimulierten humanen Vollblut [35,36] und Monocyten [37,38] führt. Takano et al. [39] hingegen zeigte, dass Propofol die Interleukin-6 und IL-10 Produktion von PBMC gesunder Probanden hemmt. In dieser Arbeit konnte dieser erhöhende Effekt von Propofol auf die TNF- α Produktion auf die PBMC der gesunden Probanden nicht bestätigt werden. Die wahrscheinliche Ursache dieses Ergebnisses ist wohl die Tatsache, dass Ultiva einen so starken negativen Einfluss auf die TNF- α Synthese der PBMC nimmt, dass der immunstimulatorische Effekt von Propofol von dem Opioid einfach überboten wird. Bei den Patienten zeigte sich wie oben erwähnt nur ein signifikantes Ergebnis. Auch hier setzte sich der immunsupprimierende Einfluss des Opioids durch. Bezüglich der IL-6 Synthese der PBMC stellte ich einen signifikante drastische Erhöhung der IL-6 Werte in den Testansätzen in denen Plasma septischer Patienten zugefügt wurde. Bedenken muss man bei diesem Ergebnis sicherlich wieder den niedrig gemessenen Kontrollwert der Patienten sowie die hohe IL-6-Konzentration im Poolplasma. Bezüglich der IL-10 Messungen kam es bei den Patienten zu keinem signifikanten Ergebnis. Bei den Zellen der Probanden wurde in zwei den Testansätzen (Z, M+LPS und LPS,M+Z) eine Erniedrigung der IL-10 Konzentration signifikant gemessen. Es kam zu einer sehr signifikanten Reduktion der IL-10 Messung auf 66% und 73 % gegenüber der Kontrolle. Dies deutet auf eine inhibierende Wirkung dieser Medikamentenmischung auf die IL-10 Produktion sowohl bei den PBMC als auch bei den Zellen der Patienten hin. IFN- γ wurde wieder einmal kaum signifikant gemessen. Lediglich ein Testansatz erbrachte ein signifikantes Ergebnis. In dem Testansatz in dem PBMC mit und U/P vorinkubiert und

anschließend mit LPS stimuliert wurden zeigte sich eine um 47 % erhöhte Interferon- γ Konzentration. Bei den Patienten zeigten die Messergebnisse keine Signifikanz jedoch eine Tendenz in den Messungen. So konnte man in den Testansätzen in denen Plasma hinzugefügt wurde eine Erniedrigung und in den Testansätzen ohne Plasma eine Erhöhung der IFN- γ Werte feststellen. Die PCT Konzentration bei den gesunden Probanden wurde in einem und bei den Patienten in zwei Testansätzen gemessen. Bei all diesen Testansätzen wurde mit Plasma gearbeitet. Dies deutet wieder darauf hin, dass die PCT Konzentration des Plasmas die PCT Messungen der betreffenden Ansätze erhöht.

7.5 Fentanyl/Dormicum

Dormicum (Midazolam) gehört zu der Gruppe Imidazobenzodiazepine und unterscheidet sich von den klassischen Benzodiazepinen dadurch, dass es einen Imidazolring besitzt. Der Imidazolring verleiht Midazolam günstige Eigenschaften: Löslichkeit seiner Salze in wässriger Lösungen mit niedrigem pH-Wert, Stabilität in Lösungen und schnellen Metabolismus. Wie andere Benzodiazepine beeinflusst es die Affinität der Gamma-Aminobuttersäure (GABA) für den GABA-Rezeptor im ZNS. In Abhängigkeit von der Dosis kann Midazolam unterschiedliche Sedierungsstadien induzieren. Einsatzgebiete sind unter anderem Prämedikation bei chirurgischen oder diagnostischen Eingriffen sowie die Narkoseleitung und Aufrechterhaltung. Ein Einfluss auf die Zytokinfreisetzung wurde beschrieben. So zeigte Helmy et al., dass Midazolam die Freisetzung der TNF- α und IL-6-Ausschüttung LPS stimulierten humanen Vollblut inhibiert [35]. Sogawa et al. [40] beschrieb einen direkten Effekt von Midazolam auf PBMC gesunder Spender. Er zeigte, dass Midazolam die IL-6

mRNA Expression in PBMC gesunder Spender signifikant inhibiert. Fentanyl ist wie Ultiva ein in der Anästhesie und Intensivmedizin eingesetztes Opioid. Es wird bei der Narkoseprämedikation, Neuroleptanalgesie, Neuroleptanästhesie, bei der Schmerzbehandlung in der Intensivmedizin, u.a. eingesetzt. Für Fentanyl gelten die bereit oben genannten Einflüsse von Opioiden auf Zellen des Immunsystems. Die für sowohl für Midazolam als auch für Fentanyl beschriebene inhibitorische Wirkung auf die Freisetzung bzw. die Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 scheinen sich in dieser Arbeit gegenseitig zu potenzieren. Bei den Probanden führte die Fentanyl/Dormicum-Mischung zu einer fast 100%igen Reduktion der gemessenen TNF- α Konzentration im Vergleich in allen Testansätzen. Auch IL-6 wurde sehr signifikant reduziert. Die Testansätze mit Poolplasma zeigten eine nicht so ausgeprägte Abnahme der IL-6 Konzentrationen. Grund hierfür ist wahrscheinlich die oben bereits erwähnte hohe Konzentration an IL-6 in dem gepoolten Plasma septischer Patienten. Diese hohe Konzentration ist wahrscheinlich auch für die signifikant erhöhten IL-6 Werte bei der Messung der Patientenzellen verantwortlich. TNF- α wurde bei der Testreihe mit PBMC septischer Patienten inhibiert, wenn auch nicht immer signifikant. IFN- γ , IL-10 und PCT konnte in dieser Arbeit bei den Testansätzen mit Fentanyl/Dormicum sowohl bei den Patienten als auch bei den gesunden Probanden kaum einmal ein signifikantes Ergebnis erbringen und entziehen sich deshalb der Diskussion.

7.6 Plasma

Haupt et al. beschrieb in seiner Studie einen reduzierenden Einfluss von Serum und separierten Plasma septischer Patienten auf die TNF- α Freisetzung aus

LPS- stimulierten PBMC gesunder Probanden [41]. Die Messung der IL-6 Produktion erbrachte in seiner Arbeit kein signifikantes Ergebnis [12]. Das Plasma septischer Patienten zeigte ähnliche Ergebnisse wie sie in der Studie von Haupt et al. [40] auf die PBMC der gesunden Probanden beschrieben wurden. Die TNF- α Produktion wurde bei der Vorinkubation einerseits der PBMC (Z,P+LPS) auf 54% ($P < 0,05$) und andererseits des LPS (LPS,P+Z) auf 90 % ($P < 0,005$) mit dem gepoolten gehemmt gegenüber der Kontrolle. In meiner Studie konnte auch ein signifikanter Effekt des Poolplasmas auf die IL-6 Produktion der Zellen der Probanden festgestellt werden Die IL-6 Werte zeigten sich in den beiden oben genannten Testansätzen signifikant reduziert. Die möglichen Ursachen wie es zu dieser Reduktion der beiden Parameter kam sind vielfältig. Unter anderem könnte eine hohe Konzentration von Lipoproteinbindenden Protein (LBP) die LPS-Wirkung abschwächen, indem es die freie LPS-Konzentration erniedrigt. Auch lösliche TNF- α und IL-6 Rezeptoren aus dem Plasma könnten die Parameter neutralisieren. Die TNF- α Konzentration in den Testansätzen der Patienten wurde erhöht, aber nicht signifikant gemessen. Die Messung von IL-6 zeigte in beiden Ansätzen erhöhte Werte. Diese Ergebnisse sind auch signifikant ($P < 0,05$). Ursache dieser hohen IL-6 Konzentration ist wahrscheinlich die hohe Konzentration von Interleukin-6 im Poolplasma. Es war kein bzw. kein signifikanter Einfluss des Plasmas auf die Ausschüttung von IL-10 und IFN- γ zu beobachten. Bei Patienten und Probanden blieb eine signifikante Veränderung der IL-10 Synthese in den Testansätzen aus. Es wurde jedoch bei den Probanden und den Patienten eine Tendenz zu erhöhten IL-10-Werten deutlich. Die Messwerte der IFN- γ zeigten weder eine Signifikanz noch eine Tendenz in den Messungen in beiden Kollektiven. Die PCT Konzentration wurde zweimal bei den Probanden und einmal bei den Patienten signifikant gemessen. In allen Testansätzen kam es zu

einer Erhöhung der PCT Konzentration. Diese führe ich auf die PCT Konzentration in dem Poolplasma zurück.

7.7 Patient im Verlauf

Hier wird der Einfluss der Medikamente und des Poolplasmas auf die TNF- α Ausschüttung eines Patienten graphisch bei zwei Blutentnahmen im Verlauf der Erkrankung beschrieben. Bei der ersten Blutentnahme war der Patient hochseptisch und es wurde ein stark erhöhter Procalcitoninwert (24,965 ng/ml) gemessen. Bei der zweiten Blutentnahme eine Woche später zeigte sich der Zustand des Patienten klinisch stark gebessert bei im Vergleich zur Erstabnahme deutlich reduziertem Procalcitoninwert (0,9ng/ml). Eine Interpretation der Ergebnisse erscheint schwierig. Es wird im folgenden versucht, einen Vergleich zwischen den Ergebnissen der beiden Blutentnahmen im Testansatz Z,M+LPS zu ziehen. Als Diskussionsgrundlage wird die erste BE den septischen Patienten und die zweite den Probanden gleichgestellt.

Die PBMC bei der ersten Blutentnahme (BE), d.h. in der septischen Phase des Krankheitsgeschehens, produzierten mehr TNF- α als die Zellen bei der zweiten BE. (8,01 pg/ml versus 5,87 pg/ml) auf den Stimulus LPS (Z+LPS). Dies steht im Gegensatz zu dem Ergebnis bei dem Vergleich der Probanden- und Patiententestreihe. Hier produzierten die Zellen der Gesunden deutlich mehr TNF- α (392,43 pg/ml versus 13,15 pg/ml). Mögliche Ursache hierfür könnte ein Erschöpfungszustand der Zellen in der Phase der Rekonvaleszens sein.

Bei der Vorinkubation der Zellen mit **Taurolidin** (Z,M+LPS) zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der Probanden/ Patienten -Versuchsreihe. Sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Blutentnahme zeigte sich eine reduzierte Messung von TNF- α im Vergleich zu der Kontrolle. Zur Erinnerung: Die Zellen der Probanden und Patienten reagierten beide mit einer Reduktion der TNF- α

Reduktion. Bei den Probanden war diese Erniedrigung jedoch deutlicher. (auf 0,18% gegenüber der Kontrolle bei den Probanden versus einer Reduktion auf 32,03% gegenüber der Kontrolle). Die stärkere Reduktion bei der zweiten BE (auf 8,52%) als bei der Ersten (auf 70,04%) ist also dem Ergebnis der Probanden /Patientenversuchsreihe ähnlich. Dieser Vergleich legt nahe, dass die PBMC des Patienten in der Rekonvaleszenz, sprich bei der zweiten Abnahme besser auf Taurolidin reagieren bzw. mit Taurolidin interagieren konnten als die PBMC in der septischen Phase. Als eine zusätzliche Erklärung dieses Ergebnisses ist aber auch ein möglicher Erschöpfungszustand der Zellen in der Erholungsphase zu nennen. Bei der These des Erschöpfungszustandes in der klinischen Rekonvaleszenz muss jedoch die Tatsache bedacht werden, dass auch die Zellen der Probanden deutlicher gehemmt wurden TNF- α zu produzieren als die PBMC der Patienten, obwohl die PBMC der Gesunden ja noch gar nicht durch ein septisches Geschehen belastet worden sind.

Der Zusatz von **Pentaglobin** zu den peripheren mononukleären Zellen erbrachte unterschiedliche Resultate. Während sich bei den Probanden eine signifikant erhöhte TNF- α Messung zeigte, kam es bei der zweiten Blutentnahme zu einer deutlichen Reduktion auf 8,51% gegenüber der Kontrolle. Bei den Patienten und bei der ersten Abnahme waren jeweils erhöhte Werte zu messen, wobei dieser Anstieg bei den Patienten nicht signifikant war. Eine Interpretation bzw. Diskussion dieser Ergebnisse fällt nicht leicht. Die deutliche Verringerung der TNF- α Messung bei der zweiten Blutentnahme könnte aus dem schon bei Taurolidin vermuteten Erschöpfungszustand der Zellen resultieren, der wiederum dazu führte, dass die Zellen nicht mehr so intensiv auf den Stimulus, dem Endotoxin, reagieren konnten. Die Erhöhung der TNF- α Konzentration bei der ersten Blutentnahme

ist eventuell vergleichbar mit der erhöhten TNF- α Messung, die bei dem Probandendurchlauf erfasst wurde. Da sich der Patient klinisch in der hyperinflammatorischen Phase einer Sepsis befand ist es denkbar, dass die Zellen vielleicht noch in der Lage waren auf das LPS mit einer deutlichen Ausschüttung von TNF- α zu reagieren. Diese gesteigerte Ausschüttung wurde dann wohlmöglich noch von Pentaglobin gesteigert oder getriggert.

Arterenol führte bei den Probanden und bei der zweiten Blutentnahme zu erniedrigt gemessenen TNF- α Werten. Diese Reduktion war bei der zweiten Blutentnahme (Reduktion um 73,47%) deutlicher als bei der Probandenmessreihe (Reduktion um 48,32%). Dies kann unterschiedliche Ursachen haben. Unter anderem könnte der oben genannte Erschöpfungszustand als auch eine Adaption der Zellen aufgrund der Katecholaminpflichtigkeit für die stärkere Reduktion bei der zweiten Abnahme gegenüber der Probandenmessreihe zugrunde liegen. Bei der ersten Blutentnahme kam es zu gesteigerten TNF- α Werten gegenüber der Kontrolle. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Patienten scheidet an dieser Stelle aufgrund des nichtsignifikanten Messergebnisses in dieser Testreihe aus.

Die Zugabe von **Ultiva/Propofol** führte sowohl bei der ersten als auch bei der zweiten Blutentnahme, bei den Patienten und auch bei den Probanden zu einem sehr ähnlichen Ergebnis. In all diesen Testreihen führte der Zusatz dieser Medikamentenkombination zu einer drastischen Reduktion der gemessenen TNF- α Werten. Die Reduktionen lagen in einem Bereich von 87,65% bis 93,76%.

Auch der Zusatz von **Fentanyl/Dormicum** führte in allen Testreihen zu deutlich reduziert gemessenen TNF- α Werten. Diese Messergebnisse zeigen,

dass die beiden Kombinationen sowohl unabhängig vom Krankheitsverlauf des Patienten als auch unabhängig ob Probanden- oder Patientenmessreihe in der Lage sind die TNF- α Ausschüttung deutlich zu unterdrücken.

8 Beantwortung der Fragen

1) Reagieren die Zellen auf den Stimulus Endotoxin mit Mediatorfreisetzung (Z+LPS)? Gibt es quantitative Unterschiede bezüglich der beiden Spenderkollektive?

Die PBMC beider Versuchsgruppen produzieren auf den Stimulus Endotoxin die Zytokine TNF- α , IL-6, IL-10, IFN- γ und PCT. Bezüglich der Parameter TNF- α und IL-6 ergeben sich große Differenzen zwischen den beiden Kollektiven. Die Zellen der Probanden produzieren eine wesentlich höher messbare Konzentration dieser beiden proinflammatorischen Zytokine. Bei den Messungen von IL-10, IFN- γ und PCT erscheinen die Unterschiede nur marginal.

2) Wird durch eine Vorinkubation der Zellen mit den Medikamenten der in 1) erzielte Effekt des LPS verändert. Wenn ja, wie? (Z,M+LPS)

Taurolidin, Arterenol, Ultiva /Propofol und Fentanyl/ Dormicum besitzen einen reduzierenden Effekt auf TNF- α Produktion der PBMC der Probanden im Vergleich zu den in 1) gewonnenen Werten. Die Vorinkubation mit Pentaglobin führt zu einer erhöhten TNF- α Messung. Taurolidin, Ultiva /Propofol und Fentanyl/ Dormicum reduzieren die IL-6 Synthese der Zellen gesunden Probanden. Auf die IL-10, IFN- γ und PCT-Werte haben die Medikamente kaum einen signifikanten Einfluss. Auf die PBMC der Patienten zeigen Taurolidin, Ultiva /Propofol und Fentanyl/ Dormicum bezüglich TNF- α ebenfalls einen reduzierenden Effekt. IL-6 wird nur bei der Messung mit

Taurolidin erniedrigt gemessen. Auf die IL-10-, IFN- γ und PCT- Werte haben die Medikamente kaum einen signifikanten Einfluss.

3) Interagieren die Medikamente mit dem Stimulus, so dass die Mediatorfreisetzung verändert wird? (LPS,M+Z)

Die Medikamente Taurolidin, Arterenol, Pentaglobin und Ultiva /Propofol führen bei der Vorinkubation des LPS zu einer zu einer reduzierten TNF- α Messung. Sie scheinen einen direkten Einfluss auf das Endotoxin zu besitzen. Die Reduktion ist ausgeprägter als bei 2). Auch IL-6 wird bei allen Medikamenten reduziert gemessen. Die Kombinationen Ultiva /Propofol und Fentanyl/ Dormicum reduzieren signifikant die IL-10 Produktion. IFN- γ und PCT werden nicht signifikant gemessen. Die PBMC der Patienten werden durch Pentaglobin und Arterenol zu einer geringeren TNF- α Produktion angeregt. IL-6 wird nur bei Ultiva/Propofol reduziert gemessen. Bei den Bestimmungen von IL-10, IFN- γ und PCT kommt es zu keinem Ergebnis.

4) Nimmt das Poolplasma Einfluss auf die Messwerte bei einer Vorinkubation mit den Zellen (Z,P+LPS) oder mit dem Endotoxin (LPS,P +Z)?

Auf die Zellen der Probanden besitzt das Poolplasma hinsichtlich der TNF- α und IL-6 Messung einen reduzierenden Einfluss. PCT wird erhöht gemessen, IL-10 und IFN- γ werden beide nicht signifikant beeinflusst. Bei den Zellen der Patienten kommt es zu erhöhten Werten von IL-6 und PCT. Die anderen Parameter werden nicht signifikant verändert.

5) Übertragung des Versuchmodells in die Praxis. Ansatzpunkte für den Einsatz der Medikamente in der Therapie der Sepsis aufgrund der durch die Medikamente modulierten Mediatorproduktion?

Hinsichtlich des reduzierenden Einflusses auf die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α in den Zellen der septischen Patienten von Taurolidin, Ultiva /Propofol und Fentanyl/ Dormicum könnten diese Medikamente einen positiven Effekt auf den Verlauf der hyperinflammatorischen Phase der Sepsis haben. Das gleiche gilt für den Parameter IL-6 bei Taurolidin. Die Ergebnisse bei der Vorinkubation des LPS mit den Medikamenten bestätigen diesen Gedankenansatz. Alle Medikamente führten zu einer reduzierten Antwort der Zellen mit TNF- α und IL-6 auf den Stimulus Endotoxin. Zu bedenken ist aber, dass wenn es im Verlauf der Erkrankung zum Stadium der Immunparalyse kommt, dieser hemmende Einfluss nicht erwünschenswert ist.

9 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von verschiedenen in der Intensivtherapie der Sepsis etablierten Medikamenten auf die peripheren mononukleären Zellen gesunder Probanden und septischer Patienten untersucht. Als ein weiteres Ziel untersuchten wir, ob Plasma, das von septischen Patienten gewonnen wurde, ebenfalls eine die Mediatorenproduktion der Zellen modifizierende Wirkung besitzt. Als Parameter dieser Studie dienten auf der einen Seite die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , Interleukin-6 und Interferon- γ auf der anderen Seite IL-10, dem antiinflammatorische Eigenschaften zugesprochen werden, und Procalcitonin (PCT).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass alle Medikamente bzw. Medikamentenkombinationen in der Lage sind, die Produktion der oben genannten Parameter in den mit Endotoxin stimulierten PBMC beider Kollektive zu beeinflussen. Die Messungen der Probandenmessreihe erbrachten mehrere signifikante bzw. sehr signifikante Ergebnisse. Auf die Zellen der Probanden besitzen die Medikamente in fast allen Testansätzen einen die Freisetzung bzw. die Synthese der proinflammatorischen Zytokine hemmenden Effekt. Bei den Patienten blieben diese deutlichen Resultate weitgehend aus. Ursache dieses Phänomens ist wahrscheinlich die unterschiedliche Immunitätslage innerhalb des Patientenkollektives. Klinisch befanden sich alle Patienten in der hyperdynamen Phase einer Sepsis. Wir untermauerten dies mit der Bestimmung der Procalcitoninkonzentration. Ob sich aber der eine oder der andere Patient bereits auf dem Weg in das Stadium der Immunparalyse oder in ein noch nicht näher definiertes Stadium der Sepsis

befand, lässt sich mit den heute vorhandenen laborchemischen Parametern nicht beweisen. Wohl erbrachten diese nicht fassbaren Unterschiede im Verlauf einer Sepsis diese zum Teil sehr unterschiedlichen Ergebnisse und zeigen, dass Sepsis eben nicht gleich Sepsis ist.

Das Plasma septischer Patienten besitzt modifizierende Effekte auf die Synthese der Parameter in beiden Kollektiven. Die gewonnenen Werte sind aber zum Teil sicherlich durch den Gehalt der entsprechenden Parameter in dem Poolplasma bedingt.

Hinsichtlich der Therapie septisch Kranker mit den Pharmaka lassen sich nur begrenzt Empfehlungen für die Klinik aussprechen. Dass die Medikamente in der Lage sind, das Immunsystem zum Teil deutlich zu beeinflussen, zeigen die Ergebnisse dieser in vitro Studie. Diese Resultate können aber nicht ohne weiteres in den klinischen Alltag transferiert werden. So kommt es z.B. beim Einsatz der Medikamente in der Klinik nicht zu einem Bild der Immunparalyse, obwohl man dies durch die Ergebnisse dieser Studie vermuten könnte. Hilfreich für die Zukunft könnte es sein, in großen epidemiologischen Studien den unterschiedlichen Stellenwert der verschiedenen Sepsisstadien zu untersuchen, und stadienbezogene Therapieansätze an Hand der in dieser Studie verwendeten Parameter zu überprüfen.

10 Quellen

1. **Fraunberger et al.** (2001) Zytokinanalytik; Was ist machbar-was ist sinnvoll? Internist 42:35-46
2. **Brunkhorst et al.** (2000) Procalcitonin und C3a:Nützlich zur Prognose und Verlaufsbeurteilung der Sepsis. Intensivmed 37:449-451
3. **Majetschak et al.** (2000) Meditorenmodulation bei Sepsis und Multiorganver- sagen. Der Unfallchirurg 103:903-907
4. **Wade et al.** (1998) Epidemiologie von SIRS, Sepsis und septischen Schock bei chirurgischen Intensivpatienten. Chirurg 69:648-655
5. **Bone R.C.** (1992) Definitions for Sepsis and organ failure. Crit. Care Med.20:724
6. **Carrol et al.** (2002) Procalcitonin as a marker of sepsis. International Journal of Antimicrobial Agents 20; 1-9
7. **Assicot et al.** (1993) High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. Lancet 341:515
8. **Tsokos et al.** (2001) Serum procalcitonin (PCT): a valuable biochemical parameter for the post-mortem diagnosis of sepsis. Int J Med 114:237-243

9. **Blenkharn JI** (1987) The antibacterial and anti-endotoxin activity of taurolidine in combination with antibiotics. *Surg Res Commun* 2:149
10. **H.B. Reith** Langenbecks (1997) Peritonitistherapie heute. *Arch Chir* 382 (Suppl 1): S14-17
11. **Bedrosian I** , Sofia RD , Wolff SM , Dinarello CA (1991) Taurolidin, an analogon of taurin, surpresses the syntheses of interleukin-1 and tumor necrosis factor in peripheral mononuclear human blood cells. *Cytokine* 3:451
12. **Stendel R et al.** (2002) The Effect of taurolidine on brain tumor cells. *Anticancer Res* 2002 Mar-Apr; 22(2A):809-14
13. **Mc Court et al.** (2000) Taurolidine inhibits tumor cell growth in vitro and in vivo. *Ann Surg Oncol* 2000 Oct;7(9):685-91
14. **Trautmann et al.** (1998) Bacterial lipopolysaccharide (LPS)-specific antibodies in commercial human immunglobulinpreparations: superior antibody content of an IgM-enriched product. *Clin. Exp. Immunol* 111:81-90
15. **Menez et al.** (1997) In vitro inhibitory activity of tumor necrosis factor alpha and interleukin-2 of human immunglobulin preparations. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 114: 323-328

16. **Kekow et al.** (1998) Intravenous immunoglobulins and transforming growth factor β . *Lancet* 351: 184-185
17. **Koch et al.** (1997) Effekte von humanen i.v.-Immunglobulin auf die Bakterien Clearance und Granulozytenfunktion bei Endotoxinämie. *Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 32: 420-425
18. **Fluckiger et al.** (1997) Immunoglobulins inhibit adherence and internalization of *Streptococcus pyogenes* to human pharyngeal cells. *Advances in experimental medicine and biology*, 418:909-91
19. **Andersson et al.** (1996) Intravenous Immune Globulin Has Effects on Superantigen -Induced Cytokine Synthesis. *Infusionsther. Transfusionsmed.* 23 (Suppl 4): 7-14
20. **J. Anderson et al.** (1996) Intravenous immune globulin affects cytokine production in T lymphocytes and monocytes macrophages. *Clin. Exp. Immunol* ; 104 (Suppl. 1) : 10-20
21. **Aukrust et al.** (1994) Release of cytokines, soluble cytokine receptors, and interleukin-1 receptor antagonist after intravenous immunoglobulin administration in vivo. *Blood*, Vol 84, No 7, pp 2136-2143
22. **Van der Poll et al.** (1994) Noradrenaline inhibit lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infections and Immunity* 62, 2046 – 2050

23. **Maes et al.** (2000) The effects of noradrenaline and alpha 2 Adrenoceptor agents on the production of monocytic products. *Psychiatry Research* 96, 245-253
24. **Izeboud et al.** (1998) The β -adrenoceptor agonist clenbuterol is a potent inhibitor of the LPS-induced production of TNF- α and IL-6 in vitro and in vivo. *Inflamm.res.* 48 497-502
25. **Guirao et al.** (1997) Catecholamines increase monocyte TNF receptors and inhibit TNF through 2-adrenoceptor activation. *AM. J. Physiol.* 273 (Endocrinol. Metab. 36):E1203-E1208
26. **Suberville, S. et al.** (1996) Regulation of interleukin-10 production by beta-adrenergic agonists. *European Journal of Immunology* 26,2601-2605
27. **Endres et al.** (1991) Cyclic nucleotides differentially regulate the synthesis of tumor necrosis factor- α and interleukin 1 β by human mononuclear cells. *Immunology* 72, 56-60
28. **Knudsen et al.** (1986) Prostaglandins posttranscriptionally inhibit monocyte expression of interleukin-1 activity by increasing intracellular cyclic adenosine monophosphate. *J. Immunol.* 137, 3189 – 3194
29. **Bernardin et al.** (1998) β -adrenergic receptor-dependent and – independent stimulation of adenylate cyclase is impaired during severe sepsis in humans. *Intensive Care Med* 24:1315-1326

30. **Eigler et al.** (1998) Anti-inflammatory activities of camp-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production. *Journal of Leukocyte Biology* 63:101-107
31. **Farmer et al.** (2000) β -Adrenergic agonists exert their "anti-inflammatory" effects in monocytic cells through the I κ B/NF- κ B pathway. *AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L675-L682
32. **Hogue et al.** (1995) Total intravenous anesthesia with remifentanil and propofol in patients undergoing elective inpatient surgery. *Anesthesiology* 83: A386
33. **Chao et al.** (1993) Morphine inhibits the release of tumor necrosis factor in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Int J Immunopharmacol* Apr;15(3):447-53
34. **Mammoto et al.** (2002) Intravenous anesthetic, propofol inhibits invasion of cancer cells. *Cancer Letters* 184, 165-170
35. **Helmy S. A. K. and Al-Attiyah R. J.** (2001) The immunomodulatory effects of prolonged intravenous infusion of propofol versus midazolam in critically ill surgical patients. *Anaesthesia* 56, pages 4-8
36. **Hoff et al.** (2001) Modulation of endotoxin-stimulated TNF- α gene expression by ketamine and propofol in cultured human whole blood. *Anästhesist* 50 : 494 – 499

37. **Larsen et al.** (1998) Effect of intravenous anesthetics on spontaneous and endotoxin-stimulated cytokine response in cultured human whole blood. *Anesthesiology* 89: 1218-1227
38. **Rossano et al.** (1992) Anesthetic agents induce human mononuclear leucocytes to release cytokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992;14(3):439-50
39. **Takano et al.** (2002) Effects of intravenous anesthetics on interleukin (IL)-6 and IL-10 production by lipopolysaccharide-stimulated mononuclear cells from healthy volunteers. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002;46:176-179
40. **Sogawa et al.** (2001) Effekt of midazolam on interleukin-6 mRNA expression in human peripheral blood mononuclear cells in the absence of lipopolysaccharide. *Cytokine* Sep 21;15(6):320-7
41. **Haupt et al.** (1996) Selective cytokine release induced by serum and separated plasma from septic patients. *Eur J Surg* 162: 769 – 776
42. **Ertel et al.** (1995) Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood*, Vol 85, No 5 (March 1), pp 1341-1347
43. **Munoz et al.** (1991) Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J. Clin. Invest.* 88: 1747-1754

44. **Oberhoffer et al.** (1999) Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *J Lab Clin Med* Jul;134 (1):49 -55
45. **Eigler et al.** (2001) Suppression der Synthese des Tumornekrose faktors. *Internist* 42:28-34
46. **Lauw et al.** (2000) Proinflammatory effects of IL-10 during human endotoxemia. *The Journal of Immunology*, 165: 2783-2789
47. **Döcke et al.** (1994) Verbesserung der Monozytenfunktion - ein neuer Therapieansatz. In Reinhart K. et al (eds):Sepsis; vol 18. Berlin, Springer
48. **Reith H.B. et al.** (1995) Immunparalyse und Sepsis - therapeutische Möglichkeiten. *Chir Gastroenterol* 1995;11 (suppl 2):5-8

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Gernot Bonkat
Geburtsdatum: 18. August 1970
Geburtsort: Mannheim
Eltern: Hartmut und Bergit Bonkat
Geschwister: Fünf jüngere Geschwister
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung

Schulbildung

1977 – 1980 Johann-Peter Hebel Grundschule in Mannheim
1980 – 1987 Karl-Friedrich Gymnasium in Mannheim
1987 – 1990 Wirtschaftsgymnasium in Tauberbischofsheim
1990 Abitur

Wehrdienst

1990 – 1991 Sportfördergruppe in Tauberbischofsheim

Studium

1993 – 1995 Ludwig-Maximilians- Universität München
(Teilstudienplatz)
1995 – 1997 Ludwig-Maximilians- Universität München
(Vollstudienplatz)
16.09.1997 Physikum
1997 Julius-Maximilians-Universität Würzburg
31.08.1999 Erstes Staatsexamen
28.03.2002 Zweites Staatsexamen
07.05.2003 Drittes Staatsexamen

Würzburg, den 01.06.2003

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. A. Thiede, Direktor der Chirurgischen Klinik

Meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. med. HB. Reith** danke ich für die Bereitstellung des Themas, seine uneingeschränkte ideelle und praktische Unterstützung sowie sein Vertrauen.

Frau Mariola Dragan gilt mein herzlicher Dank für Ihre unermüdliche Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeit.

Den **Kollegen** und dem **Pflegepersonal der Intensivstationen** danke ich für die Hilfsbereitschaft.

Weiterhin gilt mein Dank **Herrn Dr. rer. nat. Braun** vom Biomathematischen Institut sowie den Mitarbeitern des Rechenzentrums.

Abschließend danke ich meiner Lebensgefährtin **Simone Andermann**, meiner **Familie** und **meinen Freunden**, insbesondere **Cornelia Schrank** und **Günther Hirsch**, die mich während der ganzen Zeit begleitet haben.

