Universität Ulm
Institut für Klinische und Experimentelle Trauma-Immunologie
Direktor: Prof. Dr. med. Markus Huber-Lang

Entwicklung und Anwendung der Zellulären Reaktionskapazität (CRC) neutrophiler Granulozyten als Immunmonitoring bei experimenteller und klinischer Sepsis

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Paul Müller
geboren in Tübingen

2023

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Markus Huber-Lang
2. Berichterstatter: Prof. Dr. David Messerer
Tag der Promotion: 05.06.2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis III
1. Einleitung 1
1.1. Sepsis 1
1.1.1. Diagnostik von Sepsis 2
1.1.2. Relevante Biomarker zur Sepsisdiagnostik 3
1.2. Das Immunsystem 4
1.2.1. Rolle neutrophiler Granulozyten während Sepsis 4
1.3. Modelle zur Erforschung der Sepsis 6
1.4. Die Zelluläre Reaktionskapazität als neuer diagnostischer Marker 7
1.5. Ziele der Arbeit 8
2. Material und Methoden 10
2.1. Material 10
2.1.1. Chemikalien 10
2.1.2. Kits 11
2.1.3. Antikörper und Isotypen 12
2.1.4. Lösungen 12
2.1.5. Verbrauchsmaterial 13
2.1.6. Geräte 14
2.1.7. Software 15
2.2. Methoden 16
2.2.1. Ethikvotum 16
2.2.2. Blutentnahme 17
2.2.3. Probanden- bzw. Patientenkollektiv 17
2.2.4. Ex-vivo Vollblutmodell 19
2.2.5. Blutgasanalyse und klinische Blutanalyse 20
2.2.6. *E. coli* Titer Bestimmung 20
2.2.7. Plasmagewinnung 21
2.2.8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 21
2.2.9. In-vitro Stimulation und Antikörperfärbung 21
2.2.10. Durchflusszytometrische Analyse 22
2.2.11. Berechnung der Zellulären Reaktionskapazität 23
2.2.12. Statistische Auswertung 24
3. Ergebnisse 26

3.1. Charakterisierung des humanen Vollblutmodells 26
3.2. *E. coli* induziert Veränderungen der Oberflächenproteine neutrophiler Granulozyten und der daraus resultierenden CRC 30
3.3. Klinische Sepsis induziert Veränderungen der Oberflächenproteine neutrophiler Granulozyten und der daraus resultierenden CRC 39
3.4. Abgleich mit der Fragestellung 46
4. Diskussion 47
4.1. Humanes tierversuchsfreies ex-vivo Vollblutmodell als neue Plattform zur Erforschung der Sepsis 47
4.1.1. Stärken und Schwächen des ex-vivo Vollblutmodells 49
4.2. Die CRC als Ergänzung des diagnostischen Spektrums 50
4.2.1. Einschränkungen der humoralen Entzündungs-Biomarker bei experimenteller Sepsis 50
4.2.2. Oberflächenproteine Neutrophiler Granulozyten im Kontext Klinischer und Experimenteller Sepsis 50
4.2.3. Die CRC differenziert zuverlässig Bakteriämie und Patienten mit Sepsis von gesunden Probanden 51
4.2.4. Vorteile und Einsatzmöglichkeiten der CRC 53
4.3. Einschränkungen der Arbeit 54
4.4. Schlussfolgerung 55
5. Zusammenfassung 56
6. Literaturverzeichnis 58
7. Danksagung 69
8. Lebenslauf 70

Aufgrund der besseren Lesbarkeit wird im nachfolgenden Text das generische Maskulinum verwendet. Gemeint sind jedoch immer alle Geschlechter.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AU	Arbitrary Unit (dt. willkürliche Einheit)
BD	Becton Dickinson
BGA	Blutgasanalyse
CD	Cluster of Differentiation (dt. Cluster der Differenzierung)
CFU	Colony forming units (dt. koloniebildende Einheiten)
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CRC	Cellular response capacity (dt. Zelluläre Reaktionskapazität)
CRP	C-reaktives Protein
d	Day (dt. Tag)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC_{50}	Mittlere effektive Konzentration
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	Forward Scatter (dt. Vorwärtsstreulicht)
× g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GCS	Glasgow Coma Scale
GMCS-F	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
Hb	Hämoglobin
I.E.	Internationale Einheit
IL	Interleukin
IQR	Interquartilerange (dt. Interquartilsabstand)
JNK-Kinase	c-Jun-N-terminale Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol

Abkürzung	Bedeutung
MMP9	Matrix Metallopeptidase 9
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
nmol	Nanomol
PAF	Platelet-activating factor (dt. plättchenaktivierender Faktor)
PBS	Phosphat-Buffered Saline (dt. Phosphat gepufferte Salzlösung)
pCO_2	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PCT	Procalcitonin
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
pO2	Sauerstoffpartialdruck
ROC	Receiver Operating Characteristic (dt. Operationscharakteristik eines Beobachters)
SOFA	Sepsis-related Organ Failure Assessment Score
SSC	Side Scatter (dt. Seitenstreulicht)
TNF	Tumornekrosefaktor
WHO	World Health Organization (dt. Weltgesundheitsorganisation)
ZNS	Zentrales Nervensystem
µM	Mikromolar

1. Einleitung

1.1. Sepsis

Ein wirksames Immunsystem ist für den Menschen unentbehrlich, beispielsweise zur Abwehr von pathogenen Mikroorganismen [65], zur Kontrolle des Mikrobioms [68], zur Bekämpfung entarteter Zellen [14] und zum Beseitigen von geschädigten und abgestorbenen Zellen [32]. Bei einer Fehlregulation kann der Körper jedoch auch Schaden durch das eigene Immunsystem davontragen. Dies geschieht beim Krankheitsbild der Sepsis. Die aktuelle Definition (Sepsis-3 von 2016) beschreibt dieses als lebensbedrohliche Organdysfunktion infolge einer fehlregulierten Immunreaktion aufgrund einer vorhandenen Infektion [97]. Allein im Jahr 2017 erkrankten weltweit ungefähr 48,9 Millionen Menschen an Sepsis, ca. 11 Millionen davon starben. Das entspricht etwa 20% aller weltweiten Todesfälle [88]. Sepsis ist nicht nur medizinisch von großer Bedeutung, auch die volkswirtschaftlichen Konsequenzen sind enorm. In Krankenhäusern der USA entstanden allein im Jahr 2017 Behandlungskosten von ca. 38 Milliarden US-Dollar durch Sepsis [57, 88]. Pathophysiologisch entsteht eine Sepsis aufgrund einer akuten Infektion mit Bakterien, Viren oder Pilzen. Hierbei überwinden die pathogenen Mikroorganismen (nachfolgend Pathogene) die Barrieren der Haut, der Lunge oder des Gastrointestinaltrakts und gelangen so in den Körper sowie in die Blutbahn. Dort treten die Pathogene in Kontakt mit den Bestandteilen des angeborenen Immunsystems. Sogenannte pathogen associated molecular patterns (PAMPs), wie das Endotoxin LPS grammnegativer Bakterien [21], werden von Rezeptoren (pathogen recognition receptors, PRRs) erkannt. Diese aktivieren im weiteren Verlauf nachgeschaltete Signalkaskaden [53, 87]. Beispielhaft zu nennen wären die auf einer Vielzahl von myeloischen Zellen vorkommenden Toll-like-Rezeptoren, welche über JNK-Kinasen den Transkriptionsfaktor NF-κB freisetzen [86]. Dadurch kommt es zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie Interleukinen oder TNF, wodurch weitere Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen aktiviert werden [86]. Diese generalisierte Endothelzellaktivierung führt durch Vasodilatation und das sogenannte Kapillarleck zur Ödembildung und zum Austritt von Blutbestandteilen ins Gewebe [95]. Zudem kann es zur vermehrten Bildung des Gewebefaktors (tissue factor) und damit zu Störungen der Blutgerinnung und daraus resultierender Mikrothrombosierung kommen [116]. Die sonst ausgewogene Balance zwischen proinflammatorischen und antiinflammatorischen Signalen ist

beim Krankheitsbild der Sepsis erheblich verschoben. Es kommt zur Autoamplifikation pro-inflammatorischer Kaskaden und einer massiven Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine [15]. Man spricht hier vom sogenannten Zytokinsturm. Die inadäquate Immunantwort führt zu Störungen der Mikrozirkulation, oxidativem Stress und schlussendlich zu einer Funktionsstörung der betroffenen Organe. Kommt es im Verlauf zu einer massiven Kreislaufdysregulation und einer Anhäufung von Stoffwechselprodukten wie Laktat spricht man von einem septischen Schock.

Die leitliniengerechte Therapie der Sepsis besteht momentan aus zwei Säulen. Einerseits eine antiinfektiöse Therapie, welche meist aus einer kalkulierten intravenösen hochdosierten Antibiotikatherapie besteht [10], andererseits aus supportiven Maßnahmen zur Kreislaufstabilisierung und Unterstützung der betroffenen Organe [10]. Andere kausale Therapieansätze wie eine Substitution von GM-CSF haben bislang die Letalität nicht signifikant senken können [34]. Die Zeitspanne bis zum Beginn der Therapie ist hier von entscheidender Bedeutung, weshalb die rasche Diagnosestellung enorm wichtig ist [3, 52].

1.1.1. Diagnostik von Sepsis

Zur Diagnosestellung der Sepsis werden verschiedene Informationen zusammengetragen. Hierbei spielen die mikrobiologische Diagnostik, die Fokussuche mittels Bildgebung sowie die Labordiagnostik eine übergeordnete Rolle [10]. Trotz der modernen diagnostischen Möglichkeiten lässt sich jedoch nicht immer eine klare Diagnose stellen.

Harte Diagnosekriterien, wie sie bei anderen Krankheiten etabliert sind, fehlen bei der Sepsis. Auch die aktuelle Leitlinie drückt sich hier nur sehr vage aus [10]. Die akute Organdysfunktion lässt sich mithilfe des Sequential Organ Failure Assesment-Scores (SOFA-Score) quantifizieren [97]. Hierzu werden zwischen null und vier Punkte für die Funktion von Lunge, Niere, Leber, Hirn, Kreislauf und Gerinnung vergeben und aufsummiert. Ein Anstieg um zwei oder mehr Punkte ist ein Zeichen akuter Organdysfunktion (Tabelle 1). Im klinischen Alltag wird der SOFA-Score vornehmlich als Prädiktor der Mortalität herangezogen und spielt bei der Diagnostik nur eine untergeordnete Rolle. Doch auch diese Risikoeinschätzung wird aufgrund fehlender Präzision kritisiert [1]. Die Autoren der Sepsis-3 Publikation

berichten selbst von einer Fläche unter der ROC-Kurve von nur 0,74 für die Mortalität außerhalb von Intensivstationen [97].

Tabelle 1: SOFA Score, angepasst nach [97]. [a] Katecholamindosis (µg/kg/min) für mindestens eine Stunde. SOFA: Sequential Organ Failure Assessment Score; PaO_2: Sauerstoffpartialdruck; F_IO_2: Inspiratorische Sauerstoffkonzentration; MAP: Mittlerer arterieller Druck.

SOFA Score	0	1	2	3	4
Atmung: P_aO_2/F_IO_2, mmHg	≥400	<400	<300	<200 mit Beatmung	<100 mit Beatmung
Thrombo-zytenzahl, $\times 10^3/\mu L$	≥150	<150	<100	<50	<20
Leber: Bilirubin, mg/dL	<1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	>12,0
Kreislauf	MAP ≥70 mmHg	MAP <70 mmHg	Dopamin <5 oder Dobuta-min[b]	Dopamin 5,1-15 oder Adrenalin ≤0,1 oder Noradrenalin ≤0,1[a]	Dopamin >15 oder Adrenalin >0,1 oder Noradrenalin >0,1[a]
ZNS: GCS	15	13 – 14	10 – 12	6 – 9	<6
Niere: Kreatinin, mg/dL	<1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9	>5,0
Urinmenge, mL/d				<500	<200

1.1.2. Relevante Biomarker zur Sepsisdiagnostik

Nach heutigem Stand wurden mehr als 250 Biomarker identifiziert, welche in unmittelbarem Zusammenhang mit der Erkrankung der Sepsis stehen [80]. Leider zeigten sich nur wenige als vielversprechend. Zu nennen wäre das Peptidhormon Adrenomedullin, mit welchem das Behandlungsergebnis von Patienten mit Sepsis vorhergesagt werden konnte [64]. Doch vielen der bisher identifizierten Biomarkern fehlt die nötige Sensitivität und Spezifität [80, 85].

Daher sind im klinischen Alltag immer noch altbekannte Marker in der Anwendung. Die verbreitetsten Marker sind Interleukin-6, CRP und Procalcitonin [11]. Interleukin-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das vor allem zu Beginn einer Entzündungsreaktion freigesetzt wird [19]. CRP ist ein Akute-Phase-Protein,

welches von der Leber synthetisiert wird. Doch CRP ist als diagnostischer Marker sehr unspezifisch und ist beispielsweise auch bei nichtinfektiösen Gewebeschädigungen nach Trauma sowie chronisch entzündlichen Erkrankungen erhöht [33]. Nachteilig ist außerdem, dass maximale Plasmakonzentrationen erst nach ein bis zwei Tagen erreicht werden [83]. Procalcitonin ist vor allem bei bakteriellen Infektionen sehr sensitiv. Doch die mitunter drastischen Anstiege sind meist erst nach 12 Stunden zu beobachten [66]. So wird weiterhin ein Biomarker benötigt, welcher die nötige Sensitivität und Spezifität zur Diagnostik der Sepsis aufweist und bereits zu Beginn der Erkrankung anschlägt [77].

1.2. Das Immunsystem

Im täglichen Kontakt mit Umwelteinflüssen ist das menschliche Immunsystem ständig Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen und Prionen ausgesetzt. Das angeborene sowie das erworbene Immunsystem müssen Hand in Hand zusammenarbeiten, um potenzielle Infektionen abzuwehren. Die Dysbalance der pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Immunantwort führt beim Krankheitsbild der Sepsis zu den oben genannten Symptomen [107]. Hierbei kommt den neutrophilen Granulozyten eine besondere Bedeutung zu, da diese mit 40% – 60% die größte Fraktion der Leukozyten ausmachen.

1.2.1. Rolle neutrophiler Granulozyten während Sepsis

Neutrophile Granulozyten haben einen charakteristischen segmentierten Zellkern, daher werden sie auch als polymorphnukleär bezeichnet [84]. Die polymorphnukleären Neutrophilen (PMN) sind zwischen 9 und 15 µm groß und reifen im Knochenmark heran [58, 70]. Da die PMN eine Halbwertszeit von ca. 8 Stunden haben, findet sich dort die sogenannte Knochenmarkreserve von fast reifen und reifen PMN [20, 51]. Die PMN sind Teil des angeborenen Immunsystems, sie bilden die erste zelluläre Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene und sind die erste Zellpopulation, die an den Ort der Entzündung rekrutiert wird [22, 42, 58]. Die Aktivierung der PMN findet durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, aber auch durch Bakterien und deren Toxine statt [16, 51, 114]. Die Rekrutierung zum Ort der Entzündung läuft in mehreren Schritten ab. Nacheinander kommt es zur Anbindung, Abbremsen (Rolling), Adhäsion, Anlagerung und schlussendlich zur Transmigration (Diapedese) der PMN durch das Endothel [38, 51]. Die

Endothelzellen werden entweder durch die PMN oder das Pathogen selbst, beispielsweise LPS, aktiviert [25]. Dies führt zur Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen wie P-Selectin, E-Selectin, L-Selectin oder Integrinen [51, 58]. Die Selectine verstärken anschließend die Rekrutierung der PMN. Ebenso werden durch das Endothel Chemokine wie IL-8 und proinflammatorische Zytokine wie TNF freigesetzt, die den inflammatorischen Prozess weiter vorantreiben. Am Ort der Entzündung angekommen eliminieren die PMN Pathogene mittels Phagozytose, Degranulierung sowie Freisetzung oxidativer Sauerstoff Spezies (ROS) und Neutrophil Extracellular Traps (NETs) [70, 107]. Bei der Phagozytose werden Pathogene mittels Fc-Rezeptoren erkannt und dann in Phagosomen eingeschlossen. Nach Fusion mit Lysosomen zu Phagolysosomen findet dort die Proteolyse mittels Lysozymen statt [24, 40]. Reaktive Sauerstoff Spezies, bestehend aus freien Radikalen, Sauerstoffperoxid und Sauerstoffsuperoxid, werden durch die NADPH-Oxidase generiert und zerstören die DNA der Pathogene [24, 51]. Zusätzlich kann der PMN direkt Proteine aus seinen Granula ins extrazelluläre Milieu abgeben und so die Pathogene direkt angreifen. Außerdem immobilisiert der PMN Pathogene durch NETs, welche aus DNA bestehen, um diese dann leichter phagozytieren zu können [22, 24, 51]. Während der Sepsis findet vor allem zu Beginn der Erkrankung eine Zytokin vermittelte Ausschüttung der PMN Reserven aus dem Knochenmark statt [81]. So konnte beispielsweise in einem experimentellen Modell eine Verdopplung der Neutrophilenzahl innerhalb kürzester Zeit beobachtet werden [6]. Die Antwort der PMN bei Sepsis ist ebenfalls verändert. Normalerweise findet eine rasche Apoptose der PMN statt. Bei Sepsispatienten hingegen konnte eine hinausgezögerte Apoptose beobachtet werden [35, 79]. Ebenso wurde gezeigt, dass eine gesteigerte NETose bei Sepsispatienten mit Organversagen assoziiert ist [18]. Zudem wird angenommen, dass die gesteigerte Aktivierung der PMN zu Gewebeschäden und einer Verschlechterung der Immunantwort führt [113]. In unterschiedlichen Arbeiten konnte festgestellt werden, dass es verschiedene Subpopulationen neutrophiler Granulozyten während der Inflammation, aber auch bei neoplastischen Prozessen gibt [51, 81, 106]. So konnten nach Applikation von LPS in gesunde Freiwillige phänotypisch unterschiedliche Subpopulationen im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden [6]. Des weiteren zeigten Sepsistiermodelle und Patientenstudien Änderungen in der Expression von Oberflächenproteinen, welche

mit dem Aktivitätsstatus der PMN assoziiert sind [27, 37, 43, 98]. In experimenteller Sepsis konnten diese Effekte in-vitro und ex-vivo beispielsweise durch Stimulantien wie fMLP, LPS, C5a und PAF ebenfalls beobachtet werden [4, 43, 67, 112, 114]. Hier war bemerkenswert, dass PMN die bereits einem Stimulus exponiert waren, auf eine erneute Stimulation nur noch eingeschränkt reagierten [4, 43]. Die für diese Arbeit relevanten Oberflächenproteine der PMN sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Ausgewählte Oberflächenproteine neutrophiler Granulozyten sowie deren Eigenschaften und Funktion. CD: Cluster of Differentiation, MAC: membrane attack complex.

CD10	Neprylisin, Membrangebundene Metalloprotease [49, 74] Regulation der Immunantwort [61]
CD11b	Integrin α-M [54] MAC-1, Teil des Komplement-Rezeptors 3 [55]
CD15	Sialyl-Lewis^X [29] Vermittelt Zelladhäsion [29]
CD16	FcγRIII [30] Fc-Rezeptor aus der Immunglobulin-Superfamilie [30]
CD62L	L-Selectin [46] Zelladhäsionsmolekül [46, 51]

1.3. Modelle zur Erforschung der Sepsis

Translationale Modelle der letzten 30 Jahre zur Erforschung der Sepsis waren oftmals mit Limitationen behaftet [12]. So konnten in Interventionsstudien Mäuse vor den tödlichen Folgen einer Sepsis bewahrt werden, jedoch erwies sich keiner der untersuchten Ansätze beim Menschen als erfolgreich [12, 82]. Außerdem fehlen in-vitro als auch ex-vivo Modellen wesentliche Anteile des menschlichen Organsystems. So können hier keine Interaktionen mit beispielsweise dem Knochenmark, der Niere oder der Lunge simuliert werden [67]. Tiermodelle können an dieser Stelle weiterhelfen, doch auch hier sind erhebliche Limitationen vorhanden, welche die Übertragung auf die humane Sepsis nur bedingt zulassen. Mäuse weisen einige entscheidende Unterschiede in der pathophysiologischen Reaktion einer Sepsis auf. So sind beispielsweise die größte Fraktion der Leukozyten nicht die PMN, sondern die Lymphozyten [90]. Die Atemfrequenz, die Herzfrequenz und die Körpertemperatur der Mäuse bei Sepsis verhalten sich

regelhaft gegensätzlich zu der beim Menschen beobachteten Reaktion [39, 45, 117].

In Patientenstudien ergeben sich in Bezug auf Sepsis andere Herausforderungen. So ist die Sepsis ein ausgesprochen heterogenes Krankheitsbild, dessen Ätiologie vielschichtig ist und zudem ein ausgesprochen heterogenes Patientenkollektiv umfasst [8, 63]. Die Diversität der septischen Patienten ist enorm und umfasst alle Altersklassen und alle Arten von Vorerkrankungen [63]. So können unterschiedliche Orte der Infektion auch eine leicht veränderte systemische Reaktion auslösen [31, 41]. Es zeigen sich außerdem Unterschiede der Immunantwort auf die Ursache der Infektion. So werden bei grampositiven und gramnegativen Bakterien unterschiedliche Signalwege aktiviert und dadurch ändert sich beispielsweise die Zusammensetzung der ausgeschütteten Zytokine [13, 73, 75, 91, 99].

Die Verbesserung der translationalen Sepsisforschung stellt somit eine große Herausforderung dar, welcher aber durch neue Ansätze mittels humaner Organoide, Chip-Modellen sowie computergestützter Simulationen bereits begegnet wird [56, 76].

1.4. Die Zelluläre Reaktionskapazität als neuer diagnostischer Marker

In Vorarbeiten des Instituts wurde bereits die Reaktion neutrophiler Granulozyten während experimenteller Endotoxinämie untersucht. Endotoxine sind ein Bestandteil in der komplexen Pathophysiologie der Sepsis [22, 50]. In diesem Zusammenhang wurde das in dieser Arbeit weiterentwickelte humane ex-vivo Vollblutmodell erstmalig angewendet [67]. Hier konnte gezeigt werden, dass die neutrophilen Granulozyten nach Inkubation eine ausreichende Stabilität aufweisen und dieses Modell dadurch eine vielversprechende Plattform für weitere Untersuchungen bietet.

In diesen Arbeiten fiel auf, dass neutrophile Granulozyten nach dem Kontakt mit LPS nur noch eingeschränkt auf eine weitere Stimulation reagieren [4, 43, 67, 101]. Die Expressionsraten von Oberflächenproteinen konnten durch beispielsweise fMLP nicht weiter gesteigert werden. Es entstand die Hypothese, dieses Reaktionsvermögen der PMN als neuartige Immunmonitoringmethode zu nutzen. Dabei wurde aus (nach)stimulierter Zelle und unstimulierter Zelle ein Verhältnis gebildet. Dieser zelluläre Fixpunkt bestehend aus stimulierten und unstimulierten

Zellen, die Zelluläre Reaktionskapazität (CRC), wurde anschließend in weiteren Untersuchungen validiert. Im humanen Vollblutmodell zeigten sich LPS-Dosis abhängige Veränderungen von IL-6, der MFI der Oberflächenproteine sowie der daraus berechneten CRC. Die CRC war hier deutlich sensitiver zur Detektion der Endotoxinämie (unveröffentlichte Vorarbeiten des Institutes für Klinische und Experimentelle Trauma-Immunologie, Universitätsklinikum Ulm).

1.5. Ziele der Arbeit

Die in Kapitel 1.4. beschriebenen Vorarbeiten stellen vielversprechende Ergebnisse dar und zeigen den Bedarf an weiterer Erforschung der Zellulären Reaktionskapazität auf. Der nächste Schritt war von der Endotoxinämie zur Bakteriämie überzugehen, und das Konzept der CRC schlussendlich im Patienten zu bestätigen.
Daher untersucht diese Promotionsarbeit die folgenden drei Hypothesen:

H1: *Escherichia coli* induziert in einem experimentellen humanen Vollblutmodell humorale und zelluläre immunologische Veränderungen, welche mit den Blutveränderungen einer klinischen Sepsis vergleichbar sind.

H2: Die Zelluläre Reaktionskapazität neutrophiler Granulozyten ist ein sensitiverer Parameter zur Erfassung einer experimentellen Bakteriämie als konventionelle humorale Biomarker.
Hierzu werden von den Zellulären Reaktionskapazitäten neutrophiler Oberflächenproteine Cohen's D und die mittlere effektive Konzentration der Bakterien bestimmt und mit den humoralen Biomarkern IL-6, IL-8 und MMP9 verglichen. Die CRC ist definiert als Verhältnis von stimulierter und unstimulierter MFI des Oberflächenproteins.

H3: Die Zelluläre Reaktionskapazität neutrophiler Granulozyten eignet sich zum Immunmonitoring bei Patienten mit klinisch diagnostizierter Sepsis.
Diese Eignung soll durch Bestimmung des Cohen's D sowie den Flächen unter der ROC-Kurve im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt werden.

Die daraus resultierenden Schritte sind in Abbildung 1 graphisch zusammengefasst.

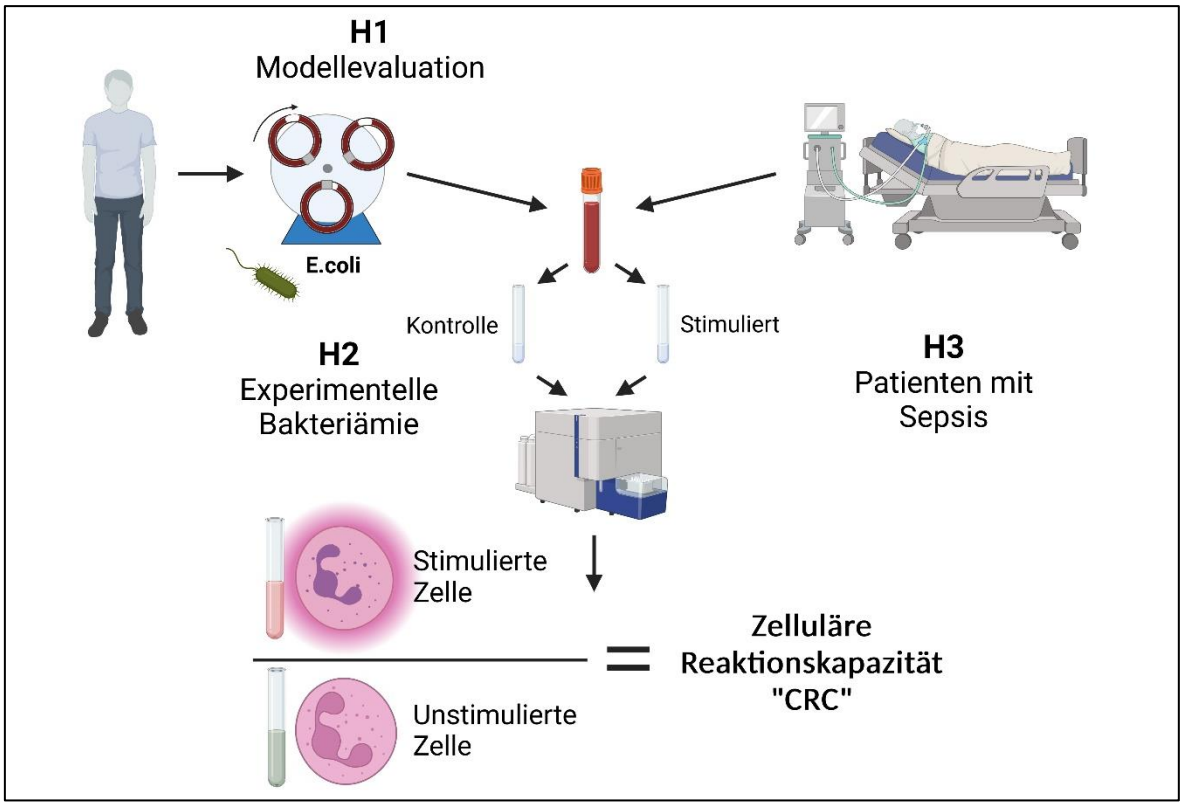


Abbildung 1: Graphische Zusammenfassung der Ziele und Hypothesen der Arbeit.

2. Material und Methoden

2.1. Material

Die Angaben zu den verwendeten Materialien, insbesondere Bestellnummern, beziehen sich auf den Stand von November 2023.

2.1.1. Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und deren Hersteller.

Chemikalie	**Hersteller**
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE
BD CS&T Beads	BD Biosciences, San Jose, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
Dulbecco's Phosphat gepufferte Saline ($PBS^{-/-}$)	Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltheim, USA
Dulbecco's Phosphat gepufferte Saline + $CaCl_2$ + $MgCl_2$ ($PBS^{+/+}$)	Gibco Thermo Fisher Scientific, Waltheim, USA
Escherichia coli (ATCC line, 25922)	DMSZ, Braunschweig, DE
FACS Lysing Solution	BD Biosciences, San Jose, USA
N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP)	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
Heparin-Natrium (10000 I.E./5 mL)	B. Braun AG, Melsungen, DE
Lipopolysaccharid aus *Escherichia coli* O55:B5	Sigma Aldrich, Steinheim, DE
Natriumchloridlösung 0,9%	Fresenius Kabi, Bad Homburg, DE
Platelet activating factor (PAF) C-16	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Tumor necrosis factor (TNF)	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.2. Kits

Tabelle 4: Verwendete ELISA-Kits und deren Hersteller.

Kit	Inhalt	Hersteller
BD OptEIA Set Human IL-6	▪ Capture Antibody Purified Anti-Human IL-6 ▪ Detection Antibody Biotin Anti-Human IL-6 ▪ Enzyme Reagent Streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (SAv-HRP) ▪ Recombinant Human IL-6 Lyophilized Standard	BD Biosciences, San Jose, USA
DuoSet Human IL-8/CXCL8	▪ Capture Antibody ▪ Detection Antibody ▪ Recombinant Standard ▪ Streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase (Streptavidin-HRP)	R&D Systems, Minneapolis, USA
DuoSet Human MMP-9	▪ Capture Antibody ▪ Detection Antibody ▪ Recombinant Standard ▪ Streptavidin conjugated to horseradish-peroxidase (Streptavidin-HRP)	R&D Systems, Minneapolis, USA
	▪ Red (eosin) staining solution ▪ Blue (azur) staining solution ▪ Phosphate buffer tablets pH 7.2	

2.1.3. Antikörper und Isotypen

Tabelle 5: Verwendete Antikörper sowie Isotypen und deren Hersteller.

Antikörper	**Label**	**Hersteller**
Anti-human CD10	Phycoerythrin/Cyanine 7 (PE/Cy7)	#312214, BioLegend, San Diego, USA
Anti-mouse/human CD11b	Allophycocyanin (APC)	#101212, BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD15	Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)	#301904, BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD16	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex (Per-CP)	#302030, BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD62L	Phycoerythrin (PE)	#304806, BioLegend, San Diego, USA
Isotyp	**Label**	**Hersteller**
Anti-human CD10	Phycoerythrin/Cyanine 7 (PE/Cy7)	#400126, BioLegend, San Diego, USA
Anti-mouse/human CD11b	Allophycocyanin (APC)	#400612, BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD15	Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC)	#401606, BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD16	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex (Per-CP)	#400148, BioLegend, San Diego, USA
Anti-human CD62L	Phycoerythrin (PE)	#400112, BioLegend, San Diego, USA

2.1.4. Lösungen

Tabelle 6: Verwendete Lösungen/Puffer und deren Hersteller.

Lösung / Puffer	**Herstellung**
Verdünnte FACS Lysing Solution 1:10	10mL FACS Lysing Solution, Auffüllen bis 100mL mit Ampuwa
$PBS^{-/-}$ + 1 % BSA	0.5 g BSA Auffüllen bis 50 mL mit $PBS^{-/-}$

2.1.5. Verbrauchsmaterial

Tabelle 7: Weitere verwendete Materialien und deren Hersteller.

Material	Hersteller
BD FACS Clean	BD Biosciences, San Jose, USA
BD FACS Flow	BD Biosciences, San Jose, USA
CB Konnektor 1/4 × 1/4	Medtronic, Meerbusch, DE
CB Schlauch 1/4 × 1/16 × 185 cm	Medtronic, Meerbusch, DE
Clinitubes Kapillarröhrchen 5 × 75 × 85 µl	Radiometer GmbH, Krefeld, DE
FACS Tubes	Corning Science, Reynosa, MEX
Falcon konische Zentrifugenröhrchen, 15 mL	Corning Science, Reynosa, MEX
Falcon konische Zentrifugenröhrchen, 50 mL	Corning Science, Reynosa, MEX
Kodan Tinktur forte farblos	Schülke & Mayr, Norderstedt, DE
Micro-Probengefäß 1 mL 9NC	Sarstedt, Nürnbrecht, DE
Micro-Probengefäß 1 mL LH	Sarstedt, Nürnbrecht, DE
Safe-Lock Reaktionsgefäß 0,5 mL	Eppendorf, Hamburg, DE
Safe-Lock Reaktionsgefäß 1,5 mL	Eppendorf, Hamburg, DE
Safe-Lock Reaktionsgefäß 2,5 mL	Eppendorf, Hamburg, DE
SafeSeal-Tips Professional Line	Biozym, Hessisch Oldendorf, DE
Safety-Multifly-Nadel 21G mit 80 mm Schlauch	Sarstedt, Nürnbrecht, DE
Serologische Pipetten (5 mL, 10 mL, 25 mL)	Corning Incorporate, New York, USA
S-Monovette 9 mL neutral	Sarstedt, Nürnbrecht, DE
S-Monovette 9 mL 9NC	Sarstedt, Nürnbrecht, DE
Tryptone Soya Agar with Sheep Blood	OXOID Deutschland GmbH, Wesel, DE

2.1.6. Geräte

Tabelle 8: Verwendete Geräte und deren Hersteller.

Gerät	Hersteller
BD FACS Lyric	BD Biosciences, San Jose, USA
Drehrad 34528	Snijders Scientific, Tilburg, NLD
Feinwaage Entris 323I-1S	Sartorius Lab Instruments, Göttingen, DE
Heracell 150i Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltheim, USA
Heraeus Multifuge 3 S-R Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltheim, USA
Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific, Waltheim, USA
Kolbenhubpipette Pipetboy	Integra Biosciences, Biebertal, DE
Mikroliterpipette Transferpette (D10, D20, D100, D200, D1000)	Brand, Wertheim, DE
pHenomenal pH 1100L	VWR International, Darmstadt, DE
Radiometer ABL 800 Flex	Radiometer GmbH, Krefeld, DE
Vortexer	VWR International GmbH, Darmstadt, DE
Wasserbad WNB14	Memmert, Schwabach, DE
Tecan FLuoroskan Ascent	Tecan, Crailsheim, DE
HeraFreeze Basic	Thermo Fisher Scientific, Waltheim, USA
Axio Imager M1 Microscope	Zeiss, Oberkochen, DE

2.1.7. Software

Tabelle 9: Verwendete Software, deren Hersteller und Nutzung in der Arbeit.

Software	Hersteller	Nutzung
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, San Diego, USA	Darstellung der Ergebnisse
Microsoft Office 365 ProPlus	Microsoft, Redmond, USA	
i-control 2.0 reader	Tecan, Crailsheim, DE	Konzentrationsermittlung der ELISAs
BD FACSuite Software	BD Biosciences, San Jose, USA	Gating und statistische Analyse der FACS-Daten
BFlow	Bertram Dietrich Thomaß, BFlow Project, www.bflow.science	Gating und statistische Analyse der FACS-Daten
BioRender	BioRender, Ontario, CA	Abbildungen 1 und 2

2.2. Methoden

2.2.1. Ethikvotum

Der Ethikantrag 319/20 erhielt durch die Ethikkommission der Universität Ulm am 28.10.2020 ein positives Votum. Dieser ermöglichte, nach vorheriger Aufklärung und schriftlicher Einwilligung, die periphervenöse Blutabnahme von gesunden Freiwilligen. Ausschlusskriterien waren bereits bekannte Erkrankungen, akute Infektionen sowie eine regelmäßige Medikamenteneinnahme.

Ebenso wurde die Validierung der Erkenntnisse anhand von Blutproben von Sepsispatienten ermöglicht. Hierfür wurde Patienten mit bestehender Sepsis zu definierten Zeitpunkten Blut abgenommen. Die Patientenrekrutierung und schriftliche Aufklärung erfolgte durch die Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums Ulm.

Einschlusskriterien waren:

- Sepsis gemäß aktueller Konsensusdefinition [97]: Neuaufgetretener Anstieg des SOFA-Score ≥2 und Verdacht auf eine Infektion innerhalb der letzten 12 Stunden
- Intensivmedizinische Behandlung

Ausschlusskriterien waren:

- Alter unter 18 Jahren
- Maligne Grunderkrankung des Immunsystems sowie Grunderkrankungen mit starker Auswirkung auf das Immunsystem
- Immunmodulierende Substanzen (z.B. IL-6 Antikörper)
- Lebenserwartung unter 24 Stunden

Des Weiteren erlaubte der Antrag jedem Patienten einen Kontrollprobanden ähnlichen Alters (± 5 Jahre) und gleichen Geschlechts zuzuordnen. Das Procedere entsprach dem der gesunden Probanden.

2.2.2. Blutentnahme

2.2.2.1. Probanden

Die Blutabnahme erfolgte nach den aktuellen Richtlinien der WHO [115] durch Punktion einer peripheren Vene mittels Flügelkanüle. Die Stauung wurde hierbei schnellstmöglich wieder gelöst, um eventuelle Einflüsse auf die Probe zu minimieren. Die Abnahme erfolgte in Citrat- Monovetten (Kontrollprobanden Sepsis) bzw. in Neutral-Monovetten, welche vorher mit 90 µl Heparin (Endkonzentration: 0,5 I.E./mL) befüllt wurden (Probanden ex-vivo Vollblutmodell). Die ersten zwei bis drei Milliliter Blut wurden verworfen.

2.2.2.2. Patienten

Die Blutabnahme erfolgte nach aktuellen Richtlinien der WHO [115] durch bereits bestehende Katheter oder im Rahmen einer indizierten Routineblutabnahme, um die Belastung für die Patienten zu minimieren. Die Abnahme erfolgte innerhalb von 12 Stunden nach Sepsisbeginn sowie 24, 72 und 120 Stunden später (+/- 10% Zeitpuffer). Es wurden Citrat-Monovetten verwendet. Die ersten zwei bis drei Milliliter Blut wurden verworfen.

2.2.3. Probanden- bzw. Patientenkollektiv

Die gesunden Probanden für das ex-vivo Vollblutmodell waren zwischen 22 und 32 Jahre alt. Die Geschlechter waren gleich verteilt, 50% Frauen, 50% Männer. Es wurde sichergestellt, dass die Probanden zum Zeitpunkt der Blutabnahme sowie in den letzten 7 Tagen fieberfrei sowie subjektiv infektfrei waren. Die Probanden nahmen keine Medikamente ein und es lagen keine Vorerkrankungen vor, welche einen potenziellen Einfluss auf das Immunsystem haben.

Die Sepsispatienten und deren Kontrollprobanden werden in Tabelle 10 beschrieben. Diese Erhebungen erfolgten gemeinsam im Rahmen routinemäßiger Kontrollen mit dem Stationspersonal. Zur Ermittlung des 90-Tage-Überlebens wurden, wie durch das Ethikvotum und die Einwilligungen der Patienten genehmigt, die Hausärzte der Patienten kontaktiert und hierzu befragt.

Für weitere Arbeiten des Instituts wurden dieselben Blutproben der Sepsispatienten verwendet und für anderweitige Analysen genutzt. Daher wird das in Tabelle 10 aufgeführte Patientenkollektiv in diesen Arbeiten ebenso dargestellt werden.

Tabelle 10: Patienten mit klinisch diagnostizierter Sepsis 0, 24, 72 und 120 Stunden nach Diagnosestellung sowie dazu gepaarte gesunde Kontrollprobanden. Klinisch relevante Parameter des Patientenkollektivs. Daten sind jeweils dargestellt als Median in der oberen Zeile, unteres und oberes Quartil in Klammern in der unteren Zeile. Abkürzungen: h = Stunden, w = weiblich, m = männlich, d = Tage, SOFA = Sequential Organ Failure Assessment, MAP = Mittlerer arterieller Druck, CRP = C-reaktives Protein, PCT = Procalcitonin. n = 14. Ungepaarter t-Test gegen gesunde Probanden. Signifikanzniveaus nur angegeben, wenn $p \leq 0,05$. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

	Patienten 0h	24h	72h	120h	Gesunde Probanden
Alter Jahre	80 (67; 88)				81 (68; 83)
Geschlecht w : m	6 : 8				6 : 8
Intensivstation Verweildauer / d	8 (4; 15)				
90d Überleben ja : nein	8 : 6				
SOFA Score	7 (****) (3,8; 9,3)	6 (****) (3; 8,3)	3,5 (***) (2,3; 6)	3 (**) (1; 4)	0 (0; 0,3)
Respiratorischer Anteil am SOFA	1 (****) (1; 2)	2 (****) (1; 2)	2 (****) (0; 2)	1 (**) (0; 2)	0 (0; 0)
Mechanische Beatmung ja : nein	9 : 5	6 : 8	2 : 12	0 : 13	
Kreatinin µmol/L	165,5 (**) (94,3; 241,3)	176 (*) (82,8; 221,8)	113,5 (*) (80,8; 215,3)	107 (*) (84,8; 217,3)	78 (71; 105)
Bilirubin µmol/L	25 (***) (16,5; 46)	23 (**) (18; 50,5)	16 (*) (12,5; 43)	12,5 (10,3; 29,3)	8 (5; 10)
MAP mmHg	79,5 (****) (76; 89)	81 (****) (77; 90)	88,5 (**) (77; 98)	97 (90; 107)	102,5 (97; 109)
Katecholamin-Bedarf ja : nein	10 : 4	9 : 5	0 : 14	1 : 12	
Thrombozyten Giga/L	171 (109,3; 241,5)	129 (**) (105,5; 188,5)	159,5 (**) (76,3; 236,5)	163 (103; 240,5)	235 (195; 295)
CRP mg/mL	210 (****) (130,6; 250,5)	220 (****) (155; 315,8)	158 (****) (114,8; 245,1)	101 (****) (51,5; 147,5)	1,3 (1,1; 2,8)
PCT µg/mL	8,0 (*) (4,1; 30,3)	12,4 (*) (4,6; 30,3)	3,8 (2,7; 10,2)	1,7 (0,8; 9,2)	0,05 (0,03; 0,07)
Interleukin 6 pg/mL	795 (*) (443; 6613)	209 (139; 642)	89 (25; 249)	61 (22; 178)	3 (2; 4)
Erythrozyten Tera/L	3,2 (****) (2,9; 3,5)	3 (****) (2,8; 3,3)	3,2 (****) (3; 3,5)	3,1 (****) (2,9; 3,8)	4,5 (4,3; 5,1)
Leukozyten Giga/L	10,6 (**) (7,8; 14,7)	10,6 (**) (9,5; 19,9)	9,9 (**) (7,7; 12,6)	9,8 (**) (7,1; 12,5)	5,3 (5; 7,3)
Neutrophile Giga/L	9,8 (***) (7; 14,1)	9,8 (****) (8,4; 19)	8,6 (****) (6,4; 10,5)	7,9 (**) (4,8; 9,7)	3,4 (2,6; 4)
Neutrophil-Lymphozyten -Ratio %	18,3 (***) (12,3; 37)	17,3 (****) (12; 26,1)	11,9 (****) (8,8; 17,8)	7,8 (***) (6,2; 15,6)	1,8 (1,6; 4)

2.2.4. Ex-vivo Vollblutmodell

In Kooperation mit Herrn Dr. Benjamin Hagemann, Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Ulm, wurde ein tierversuchsfreies ex-vivo Vollblutmodell durchgeführt. Hierbei wurde Blut gesunder Probanden direkt nach der Abnahme (genannt 0^-) sowie nach 60 min im Modell untersucht. Im Vollblutmodell wurden Proben mit lebenden *Escherichia coli* Bakterien (*E. coli*) stimuliert und mit unstimulierten (Sham) sowie mit LPS stimulierten Proben verglichen.

Die Aufbereitung der Bakterien erfolgte durch das Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Alle Puffer für diesen und folgende Versuche wurden auf einen physiologischen pH-Wert zwischen 7,3 und 7,4 eingestellt. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Bedingungen in einem Labor der Schutzstufe 2 nach Biostoffverordnung.

Als erstes erfolgte die Auswaschung des Lagerungspuffers der Bakterien mittels Zentrifugation auf 4000 g für 10 min. Anschließend wurden die Bakterien, je nach Ausgangskonzentration, auf 5×10^6, 2×10^6, 1×10^6, 5×10^5 und 2×10^5 koloniebildende Einheiten (colony forming units, CFU) pro mL mit $PBS^{+/+}$ verdünnt. Nach der Blutentnahme bei gesunden Probanden erfolgte die Weiterverarbeitung der heparinisierten Blutproben. Zur 0^- und Sham-Probe wurden je 90 µL $PBS^{+/+}$ zugegeben. Als Positivkontrolle wurde zu einer Monovette 90 µl LPS hinzugefügt (Endkonzentration 100 ng/mL). Ebenso wurden 90 µl der *E. coli* Verdünnungen hinzugefügt, um die Endkonzentrationen von 50000, 20000,10000, 5000 und 2000 CFU/mL zu erreichen. Die 0^- Probe wurde direkt verarbeitet und hatte somit keinen Kontakt mit dem Modell. Die übrigen Proben wurden in 33 cm lange, heparinbeschichtete Schläuche überführt und mit heparinbeschichteten Konnektoren zu einem Ring verbunden. Im Schlauch verblieb eine Luftblase von ca. 1,5 mL. Anschließend wurden die Schläuche auf ein Drehrad gespannt und für 60 min mit einer Rotationsgeschwindigkeit von sieben Umdrehungen pro Minute bei 37°C inkubiert (Abbildung 2). Die Luftblase in den Schläuchen sorgte dabei für einen kontinuierlichen Blutfluss.

Nach 60 min wurden die Schläuche mit einer sterilisierten Schere geöffnet. 1 mL des 0^-, Sham- und LPS-Blutes wurde in eine Heparin-Monovette zur Blutgasanalyse überführt. 1 mL des 0^-, Sham- und LPS-Blutes wurde in eine Citrat-Monovette zur

klinischen Blutanalyse überführt. Das restliche Blut wurde in eine weitere Citrat-Monovette überführt und für weitere Analysen aufbereitet.

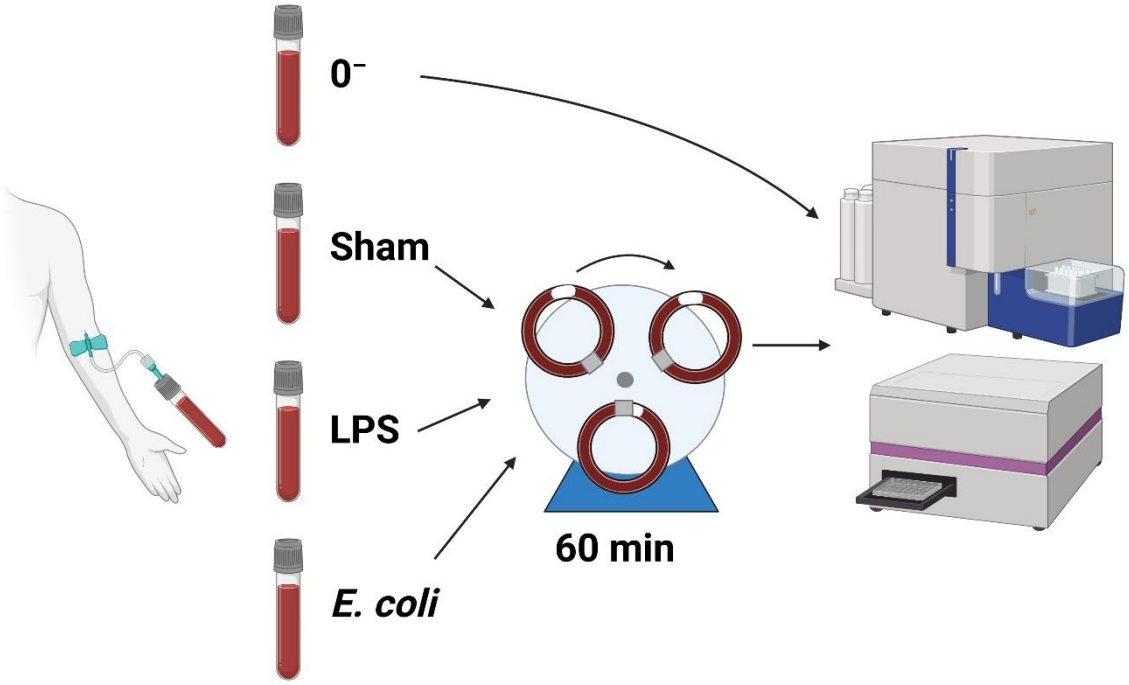


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Vollblutmodells mit anschließender Analyse, unter anderem mittels ELISA und Durchflusszytometrie.
0^-: kein Kontakt zum Modell; Sham: Kontrolle; LPS: Lipopolysaccharid 100 ng/mL; *E. coli*: lebende *Escherichia coli* Bakterien in Konzentrationen von 2000 bis 50000 CFU/mL.

2.2.5. Blutgasanalyse und klinische Blutanalyse

Zur Blutgasanalyse wurden 100 µl Blut in heparinisierte Glaskapillaren aufgezogen und innerhalb weniger Minuten in einem ABL800 FLEX Radiometer gemessen. Um zuverlässige Ergebnisse der klinischen Blutwerte zu erhalten, wurden Proben an die Zentrale Einrichtung Klinische Chemie des Universitätsklinikums Ulm gesendet und dort standardisiert analysiert. Diese Analysen wurden aufgrund von Infektionsschutzbestimmungen nur für die Konditionen 0^-, Sham und LPS durchgeführt.

2.2.6. *E. coli* Titer Bestimmung

Die Höhe des *E. coli* Titers wurde direkt nach Zugabe der Bakterien und nach 60 min im Vollblutmodell aus der Probe mit der Endkonzentration von 10000 CFU/mL bestimmt. Dazu erfolgte die Entnahme von 200 µl Blut aus der Monovette bzw. dem Schlauch. 100 µl Blut wurden direkt auf eine Blutagarplatte pipettiert und gleichmäßig mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen. Die übrigen 100 µl Blut wurden vier bis fünf Mal 1:10 mit NaCl 0,9% verdünnt und ebenfalls auf eine

Blutagarplatte ausgestrichen. Nach 24h bei 37°C wurden die Kolonien gezählt und die Titer bestimmt.

2.2.7. Plasmagewinnung

Plasma der Probanden und Patienten wurde aus Citrat-Monovetten gewonnen. Dazu wurden diese bei 400×g für 10 min zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei −80°C gelagert.

2.2.8. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der IL-6, IL-8 und MMP9 Spiegel wurden die bereits aufgeführten ELISA Kits verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Die Kurvenangleichung wurde mittels Microsoft Excel 2019 bestimmt.

2.2.9. In-vitro Stimulation und Antikörperfärbung

Zur Analyse der Aktivierung neutrophiler Granulozyten wurden deren Oberflächenproteine mittels Antikörperfärbung untersucht. Ebenfalls wurden die Veränderungen dieses Aktivierungszustandes nach Zugabe eines Stimulantiengemischs betrachtet. Dieses bestand aus PAF, fMLP und TNF, in den in Tabelle 11 aufgeführten Endkonzentrationen. Die Zusammenstellung des Gemischs wurde in bisher unveröffentlichten Vorarbeiten des Instituts etabliert. Die Antikörperfärbung erfolgte mit einem Antikörpergemisch, dessen Inhalt und Endkonzentrationen in Tabelle 12 aufgeführt sind. Zur Prüfung der Bindungsspezifität der Antikörper wurde eine Kontrollprobe mit den entsprechenden unspezifischen Isotypen der Antikörper angefertigt. Diese Untersuchungen wurden gleichermaßen für alle Konditionen des Vollblutmodells sowie für die Sepsispatienten und Kontrollprobanden durchgeführt.

Tabelle 11: Bestandteile des Stimulantiengemischs mit den jeweiligen Endkonzentrationen Platelet-activating factor (PAF), N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), Tumornekrose-Faktor alpha (TNF).

Stimulus	Endkonzentration
PAF	1 µM
fMLP	10 µM
TNF	2,3 µM

Es wurden Proben ohne Färbung und Stimulation, mit Isotypenfärbung, mit Antikörperfärbung (Ctrl) sowie mit Antikörperfärbung und Stimulation (Stimuliert) untersucht. Basierend auf Einzelfärbungen wurde eine Kompensationsmatrix zur Kontrolle der kanalunspezifischen Fluoreszenzsignale („Spill-Over“) durchgeführt. Hierbei wurden zu 5 µl Blut, je nach Kondition, Antikörper und Stimulantiengemisch hinzugegeben und mit $PBS^{-/-}$ auf insgesamt 50 µl aufgefüllt.

Die Proben wurden für 15 min bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend konnten durch Zugabe von 950 µl verdünnter FACS Lysing Solution die Erythrozyten lysiert und Leukozyten fixiert werden. Nach 30 min bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 340×g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die verbleibenden Zellen mit 100 µl $PBS^{-/-}$ + 1% BSA resuspendiert. Die Proben wurden dunkel bei 4°C gelagert und innerhalb weniger Stunden analysiert.

Tabelle 12: Verwendete Antikörper und sowie deren Fluorochrome mit den jeweiligen Endkonzentrationen. Die dazugehörigen Isotypen wurden mit denselben Endkonzentrationen eingesetzt.

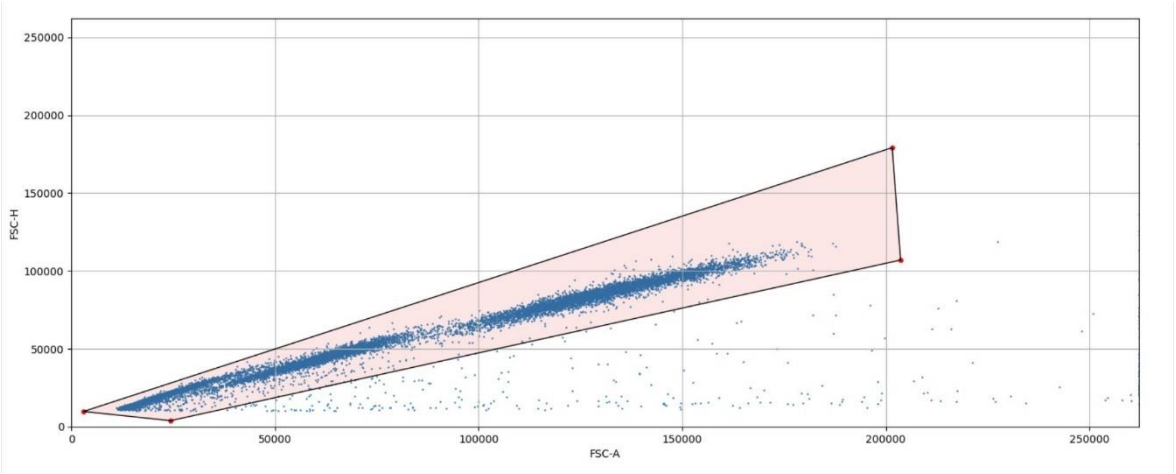
Antikörper	**Endkonzentration**
Anti-CD10 PE-Cy7	0,6 µg/mL
Anti-CD11b APC	0,3 µg/mL
Anti-CD15 FITC	1,0 µg/mL
Anti-CD16 Per-CP	0,5 µg/mL
Anti-CD62L PE	2,5 µg/mL

2.2.10. Durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse der Proben erfolgte mit einem BD FACSLyric. Die hierbei generierten FCS-files wurden in einem FACS Analyseprogramm (BFlow, https://bflow.science/) weiter ausgewertet.

Durch Analyse der Linearität von FSC-A und FSC-H wurden Dubletten abgegrenzt (Abbildung 3A). Die verbleibenden Zellen wurden mittels FSC-A (Zellgröße) und SSC-A (Granularität) in die Populationen der neutrophilen Granulozyten (rot), Monozyten (grün) und Lymphozyten (violett) abgegrenzt (Abbildung 3B). Anschließend wurden mediane Fluoreszenzintensitäten (MFI) der einzelnen Farbkanäle generiert.

A



B

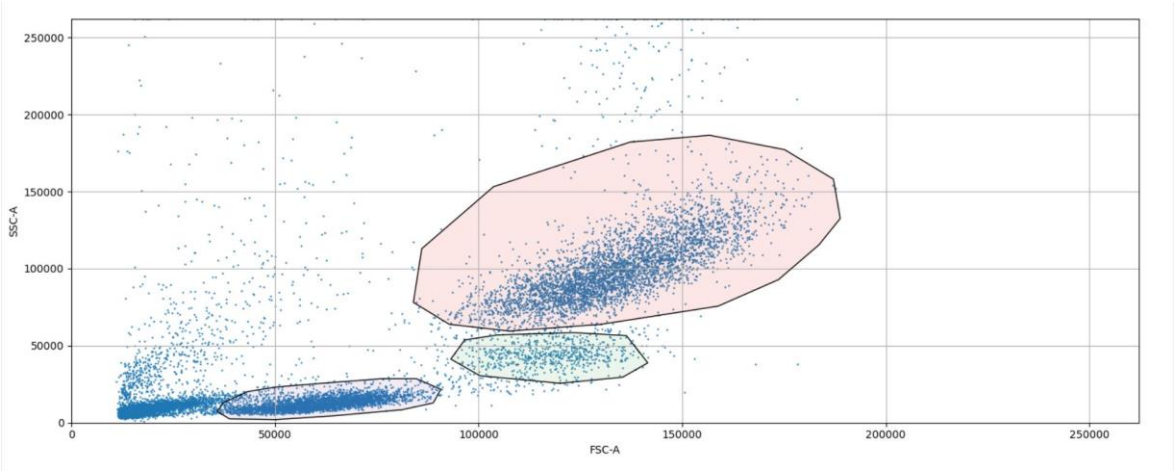


Abbildung 3: Beispielhafte Darstellung des Gatings.
A: Doublettenausschluss mittels FSC-A (forward scatter area) und FSC-H (forward scatter hight); **B** Populationsabgrenzung der neutrophilen Granulozyten (PMN), Monozyten und Lymphozyten mittels FSC-A und SSC-A (side scatter area). Abbildungen aus bflow, https://bflow.science/

2.2.11. Berechnung der Zellulären Reaktionskapazität

Die Berechnung der Zellulären Reaktionskapazität erfolgte nach der in Abbildung 4 dargestellten Formel.

$$CRC = \frac{MFI\ der\ Stimulierten\ Probe}{MFI\ der\ Unstimulierten\ Probe\ (Ctrl)}$$

Abbildung 4: Formel zur Berechnung der Zellulären Reaktionskapazität (CRC)
Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der stimulierten Probe geteilt durch die mediane Fluoreszenzintensität der unstimulierten Probe (Ctrl = Kontrolle).

2.2.12. Statistische Auswertung

Die gezeigten Daten sind, wenn nicht anders angegeben, als Median mit Interquartilsabstand (IQR) dargestellt. Es wurden nur Werte ausgeschlossen, bei welchen ein technischer Fehler vorlag. Das Vorliegen eines technischen Fehlers wurde durch zwei Experimentatoren (im Regelfall der Promovend und der Zweitgutachter) im Diskurs ermittelt. Konnte keine Einigung erzielt werden, wurde eine dritte Person, welche nicht an der Experimentdurchführung beteiligt war, hinzugezogen. Die Analyse und Aufbereitung der Daten wurde mittels Microsoft Excel 2019 durchgeführt.

Die statistische Testung erfolgte mittels GraphPad Prism 9. Es wurde ungepaart parametrisch getestet, was im Zweigruppenvergleich einem ungepaarten t-Test entspricht. Dies begründet sich damit, dass die meisten Parameter in der Natur normalverteilt sind. Bei dieser Arbeit handelt es sich um einen explorativen Ansatz mit begrenzter Fallzahl. Ein Test auf Normalverteilung wurde daher als nicht Zielführend angesehen. Daher, sowie aufgrund augenscheinlicher Prüfung in Verbindung mit Daten aus Vorexperimenten und der allgemeinen Häufigkeit von Normalverteilung in biologischen Systemen, wurde bei den hier vorliegenden Daten von einer Normalverteilung ausgegangen. Diese Annahme muss in weiteren Studien mit größerer Fallzahl überprüft werden. In dieser Arbeit wurden Mehrgruppenvergleiche durch multiple ungepaarte t-Tests durchgeführt. Dies birgt grundsätzlich die Gefahr der fehlenden Kontrolle für multiples Testen. In dieser Arbeit wurde sich bewusst dafür entschieden, da meist nur sehr wenige Gruppen verglichen wurden und manchmal das Nicht-Vorhanden-Sein von signifikanten Unterschieden (insbesondere bei stimulierten Zellen) einen wichtigen Teil der Aussage ergab und ein einheitliches Vorgehen angestrebt wurde. Die Signifikanz ist wie folgt angegeben: nicht signifikant $p > 0,05$; signifikant * $p < 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Die Berechnung der EC_{50} Werte aus dem humanen Vollblutmodell erfolgte in zwei Schritten. Für die gemessenen MFIs sowie die ELISA Daten wurden die Werte normalisiert mit 0% = Sham und 100% = *E. coli* 50000 CFU/mL. Für die berechnete CRC erfolgte die Normalisierung über 100% = Sham und 0% = *E. coli* 50000 CFU/mL. Anschließend wurde mit den normalisierten Daten eine nichtlineare Regressionsanalyse durchgeführt und die mittlere effektive Konzentration bestimmt.

Außerdem wurden receiver operating characteristics (dt. Operationscharakteristik eines Beobachters) nach Brown/Wilson Methode durchgeführt. Hierbei wurde die entsprechende Kondition im Vollblutmodell gegen Sham und bei den Sepsispatienten gegen den gesunden Probanden getestet.

Die Effektstärke wurde durch Berechnung des Cohen's D ermittelt. Hierzu wurde die in Abbildung 5 verwendete Formel genutzt. Für die Anwendung des Cohen's D in dieser Arbeit war nicht relevant, ob der Cohen's D ein positives oder negatives Vorzeichen trug. Daher werden die errechneten Werte grundsätzlich als Betrag davon angegeben.

$$Cohen's\ D = \frac{(x_1 - x_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2}{2}}}$$

Abbildung 5: Formel zur Berechnung des Cohen's D
x_1 = Mittelwert der entsprechenden Proben; x_2 = Mittelwert der dazugehörigen Kontrollproben; s_1 = Standartabweichung der entsprechenden Proben; s_2 = Standartabweichung der dazugehörigen Kontrollproben.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung des humanen Vollblutmodells

Zur Charakterisierung des humanen Vollblutmodells wurden vor und nach Kontakt mit dem Schlauchsystem Blutanalysen durchgeführt (Abbildung 6). Die Zellzahlen der drei Zelllinien des Blutes zeigten keine Unterschiede. Die Leukozytenzahl der Proben ohne Kontakt zum Modell (0^- Median: 5345 Giga/L, IQR: 5068 – 7475) war ähnlich hoch wie die nach 60 min im Schlauchsystem (Sham Median: 5380 Giga/L, IQR: 4973 – 7243). Auch die Stimulation mit LPS zeigte keine Veränderung der Zellzahl (LPS Median: 5230 Giga/L, IQR: 4868 – 6948). Ein vergleichbares Bild zeigte sich bei den Erythrozyten und Thrombozyten. Der Kontakt mit den Schläuchen als auch die Inkubation von LPS hatte keinen Einfluss auf den Hämoglobingehalt. Des Weiteren zeigten sich keine Unterschiede der Natriumkonzentration. Die Kaliumkonzentration war in Proben welche Kontakt zum Modell (Sham Median: 3,8 mmol/L, IQR: 3,5 – 3,9, $p < 0,05$; LPS Median: 3,8 mmol/L, IQR: 3,3 – 3,9, $p \leq 0,05$) hatten geringer als ohne Modellkontakt (0^- Median: 4,2 mmol/L, IQR: 3,7 – 4,4). Eine Blutgasanalyse konnte keine signifikanten Unterschiede des Blut pH-Wertes sowie der Partialdrücke von Sauerstoff und Kohlenstoffdioxid nachweisen. Nach 60-minütiger Inkubation war der Glucosespiegel des Blutes signifikant verringert (Sham Median: 71 mg/dL, IQR: 61 – 83, $p \leq 0,05$; LPS Median: 63 mg/dL, IQR: 54 – 72, $p \leq 0,01$) im Vergleich zur unmittelbaren Messung (0^- Median: 92 mg/dL, IQR: 79 – 98). Außerdem zeigten sich nach Inkubation im Schlauchsystem signifikant erhöhte Laktatwerte (0^- Median: 1,6 mmol/L, IQR: 1,2 – 2,2; Sham Median: 3,3 mmol/L, IQR: 2,9 – 3,9, $p \leq 0,01$; LPS Median: 4,0 mmol/L, IQR: 3,4 – 4,3, $p \leq 0,001$). Die im Vorangegangen beschriebenen Analysen konnten aufgrund von Infektionsschutzbestimmungen nicht für *E. coli* kontaminierte Proben durchgeführt werden.
Zur Validierung der Verdünnungsschritte wurde der Titer der Bakterien vor Befüllung der Schläuche bestimmt (Abbildung 6L). Dieser lag im Median bei 7650 CFU/mL (IQR: 5438 – 10125). Nach 60-minütiger Inkubation wurde eine erneute Titer Bestimmung durchgeführt. Hier zeigte sich ein signifikant erniedrigter Titer von im Median 1300 CFU/mL (IQR: 851 – 1738, $p < 0,001$).

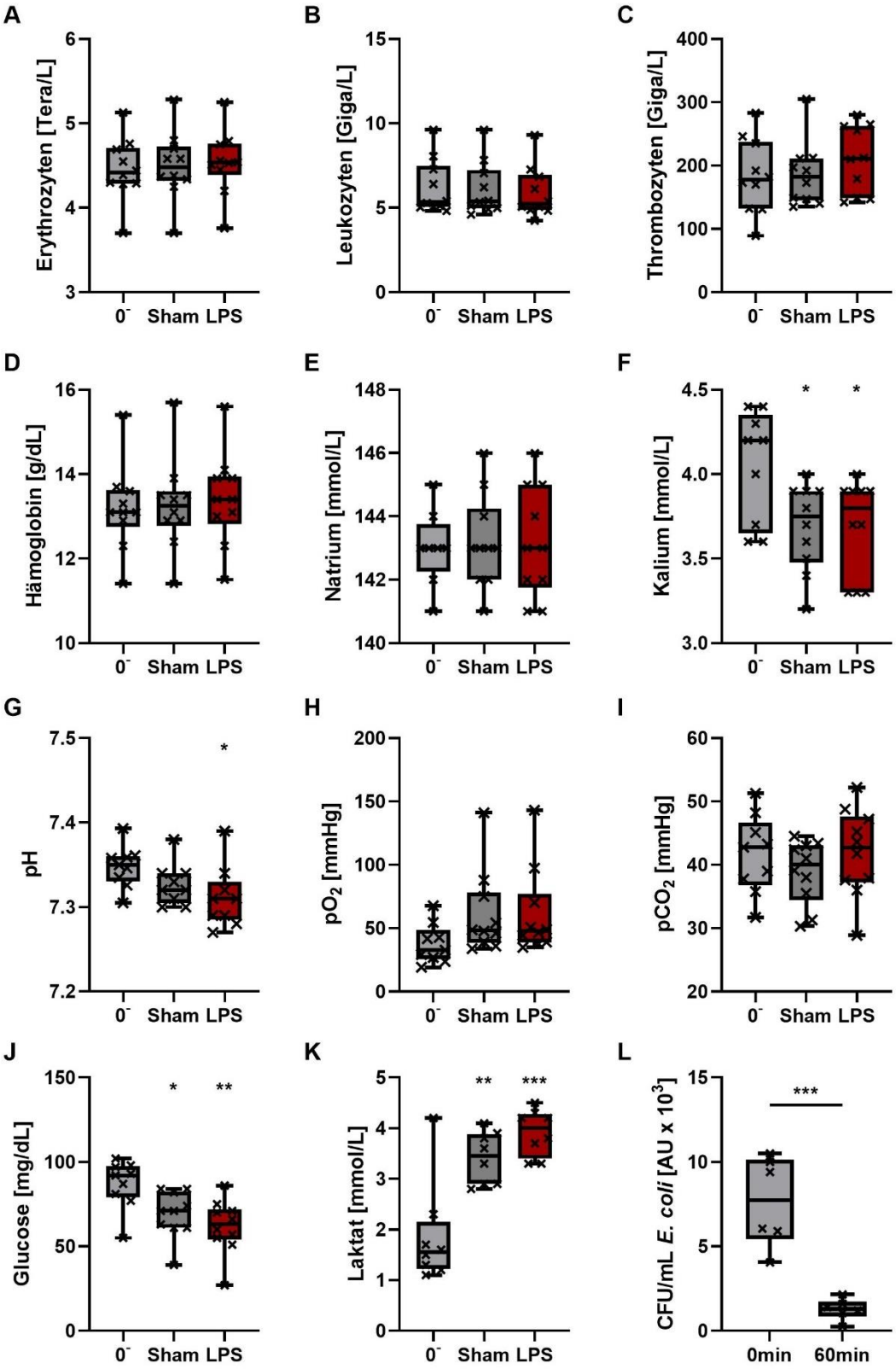


Abbildung 6: Klinische Blutanalyse, Blutgasanalyse und *E. coli* Titer des Vollblutmodells. 0^-: kein Kontakt zum Modell; Sham: Kontrolle nach 60 min Inkubation; LPS: Lipopolysaccharid 100 ng/mL nach 60 min Inkubation. Absolute Zellzahlen der Erythrozyten (**A**), Leukozyten (**B**) und Thrombozyten (**C**). Plasmakonzentrationen von Hämoglobin (**D**), Natrium (**E**), Kalium (**F**), Glucose (**J**) und Laktat (**K**). Blut pH-Wert (**G**). Sauerstoff- (pO_2) (**H**) und Kohlenstoffdioxid- (pCO_2) (**I**) Partialdruck des Blutes. L: *E. coli* Titer bei berechneter Ausgangskonzentration 10000 CFU/mL. Werte dargestellt als Median mit unterem und oberem Quartil sowie Minimal- und Maximalwert. n = 6-8. Ungepaarter t-Test gegen 0^-/0 min. * $p \leq 0{,}05$; ** $p \leq 0{,}01$; *** $p \leq 0{,}001$; **** $p \leq 0{,}0001$.

Die Plasmakonzentration von Interleukin 6 (Abbildung 7A) war mit steigender *E. coli* Konzentration signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Sham Median: 3,5 pg/mL, IQR: 0,5 – 7,4). Während bei 2000 CFU/mL noch kein Anstieg von IL-6 nachweisbar war, zeigten sich mit steigender Bakterienkonzentration auch erhöhte IL-6 Plasmaspiegel bis zu im Median 129,2 pg/mL (IQR: 58,0 – 204,2, $p \leq 0{,}001$) bei 50000 CFU/mL. Hervorzuheben ist, dass durch die Inkubation mit LPS zwar erhöhte IL-6 Plasmaspiegel gemessen werden konnten (LPS Median: 56,5 pg/mL, IQR: 28,5 – 94,3, $p \leq 0{,}01$), diese aber unter dem Level der bei 10000 (Median: 90,5 pg/mL, IQR: 35,7 – 143,7, $p \leq 0{,}01$), 20000 (Median: 81,0 pg/mL, IQR: 57,7 – 134,6, $p \leq 0{,}001$) und 50000 CFU/mL *E. coli* gemessenen Spiegel lagen. Die berechnete EC_{50} der *E. coli* Bakterien in Bezug auf den IL-6 Plasmaspiegel (Abbildung 7B) lag bei 9498 CFU/mL.

Vergleichbare Ergebnisse konnten bei den Plasmaspiegeln von Interleukin 8 und MMP9 (Abbildung 7C und E) beobachtet werden. Es zeigte sich ebenfalls eine von der *E. coli* Konzentration abhängige Erhöhung der jeweiligen Plasmaspiegel. Die durch LPS (LPS Median: 151,6 pg/mL, IQR: 114,3 – 213,9, $p \leq 0{,}0001$) induzierte IL-8 Konzentration lag leicht unter der mit 50000 CFU/mL (Median: 176,6 pg/mL, IQR: 134,7 – 252,8, $p \leq 0{,}0001$) erreichten Konzentration. In Bezug auf MMP9 konnte LPS (LPS Median: 1372 ng/mL, IQR: 1116 – 1952, $p \leq 0{,}0001$) höhere Plasmaspiegel als die Bakterien (50000 CFU/mL *E. coli* Median: 1168 ng/mL, IQR: 741 – 1775, $p \leq 0{,}001$) induzieren. In Bezug zum Plasmaspiegel von IL-8 konnte eine EC_{50} von 15776 CFU/mL *E. coli* ermittelt werden (Abbildung 7D). Die entsprechende EC_{50} im Bezug zum MMP9 Plasmaspiegel lag bei 10504 CFU/mL *E. coli* (Abbildung 7F).

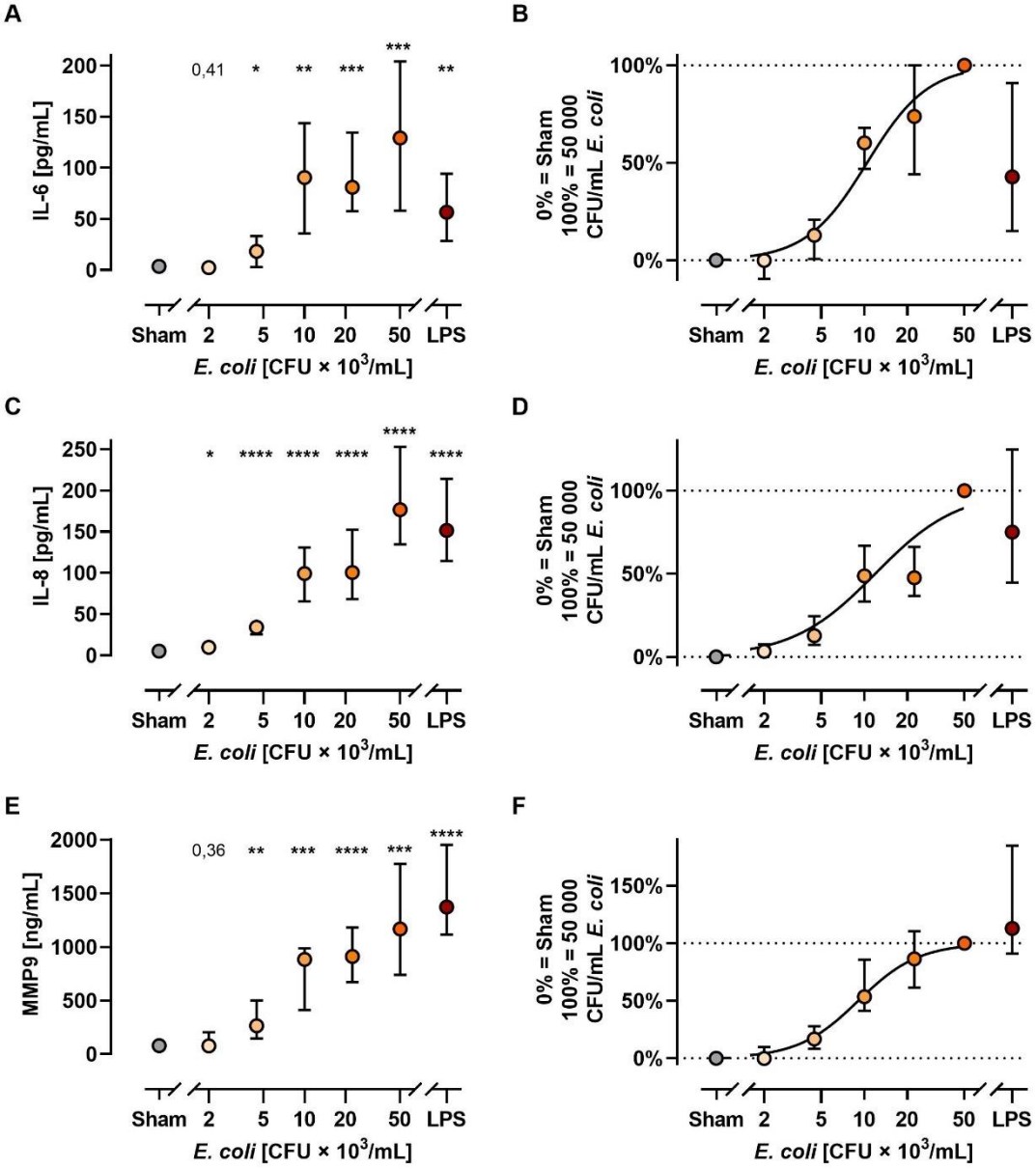


Abbildung 7: Konzentrationsabhängige Änderung der humoralen Entzündungsantwort durch die Inkubation mit *E. coli* im Vollblutmodell. Sham: Kontrolle nach 60 min Inkubation; *E. coli* Bakterien in Konzentrationen von 2000 bis 50000 CFU/mL nach 60 min Inkubation; LPS: Lipopolysaccharid 100 ng/mL nach 60 min Inkubation. Linke Spalte: Mittels ELISA bestimmte absolute Plasmakonzentrationen von IL-6 (**A**), IL-8 (**C**) und MMP9 (**E**) aus Vollblut der entsprechenden Schläuche des Modells. Rechte Spalte: Normalisierte Werte und EC_{50} Kurvenanpassung durch Sham = 0% und 50000 CFU/mL *E. coli* = 100% von IL-6 (**B**), IL-8 (**D**) und MMP9 (**F**). Werte dargestellt als Median und IQR. n = 8. Ungepaarter t-Test gegen Sham. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

3.2. *E. coli* induziert Veränderungen der Oberflächenproteine neutrophiler Granulozyten und der daraus resultierenden CRC

Die im folgenden Kapitel beschriebenen Daten beziehen sich auf durchflusszytometrische Messungen neutrophiler Granulozyten aus dem humanen Vollblutmodell.

Die Inkubation von *E. coli* Bakterien konnte eine Veränderung der Expression des Oberflächenproteins CD10 erzeugen (Abbildung 8A). Die CD10 MFI (Sham Median: 1659 AU, IQR: 1290 – 2055) stieg mit steigender *E. coli* Konzentration auf im Median 10875 AU (IQR: 6868 – 12843, $p \leq 0{,}0001$) bei 50000 CFU/mL an. Die Zugabe des Stimulantiengemischs konnte die MFI in allen Konditionen weiter erhöhen. Allerdings war die Steigerung bei den höheren *E. coli* Konzentrationen geringer. Daraus resultierend zeigte sich eine dosisabhängige Veränderung der CRC von CD10 (Abbildung 8B). Diese lag bei Sham im Median bei 9,2 (IQR: 7,3 – 11,5) und sank signifikant mit steigender *E. coli* Konzentration auf im Median 1,3 (IQR: 0,8 – 1,9, $p \leq 0{,}0001$) bei 50000 CFU/mL ab. Die berechnete EC_{50} der *E. coli* Bakterien in Bezug auf die MFI von CD10 lag bei 5392 CFU/mL (Abbildung 8C). Analog dazu lag diese in Bezug auf die CRC von CD10 bei 4056 CFU/mL (Abbildung 8D). Für die höheren *E. coli* Konzentrationen 10000 – 50000 CFU/mL konnte sowohl für die CD10 MFI als auch für die CD10 CRC Flächen unter der ROC Kurve von 1,0 berechnet werden (Abbildung 8E und F).

Die Expression des Oberflächenproteins CD11b konnte durch die Inkubation mit *E. coli* konzentrationsabhängig gesteigert werden (Abbildung 9A). So stieg diese auf im Median 19456 AU (IQR: 7791 – 28549, $p \leq 0{,}001$) bei 50000 CFU/mL im Vergleich zur Kontrolle an (Sham Median: 1143 AU, IQR: 884 – 2261). Eine weitere Stimulation war nur noch bei der Kontrolle und geringen *E. coli* Konzentrationen möglich. Bei 50000 CFU/mL konnte keine Steigerung der CD11b Expression gemessen werden (Stimuliert Median 22805 AU, IQR: 14700 – 44673). Die berechnete CRC zeigte sich ebenfalls durch die Inkubation mit *E. coli* und LPS signifikant verringert (Abbildung 9B). Die berechnete EC_{50} der *E. coli* Bakterien in Bezug auf die MFI von CD11b lag bei 7350 CFU/mL (Abbildung 9C). In Bezug auf die CRC von CD11b lag diese bei 4081 CFU/mL (Abbildung 9D). Für die CD11b MFI (Abbildung 9E) und CD11b CRC (Abbildung 9F) konnten für die höheren *E. coli*

Konzentrationen (10000 – 50000 CFU/mL) Flächen unter der ROC Kurve von 1,0 berechnet werden.

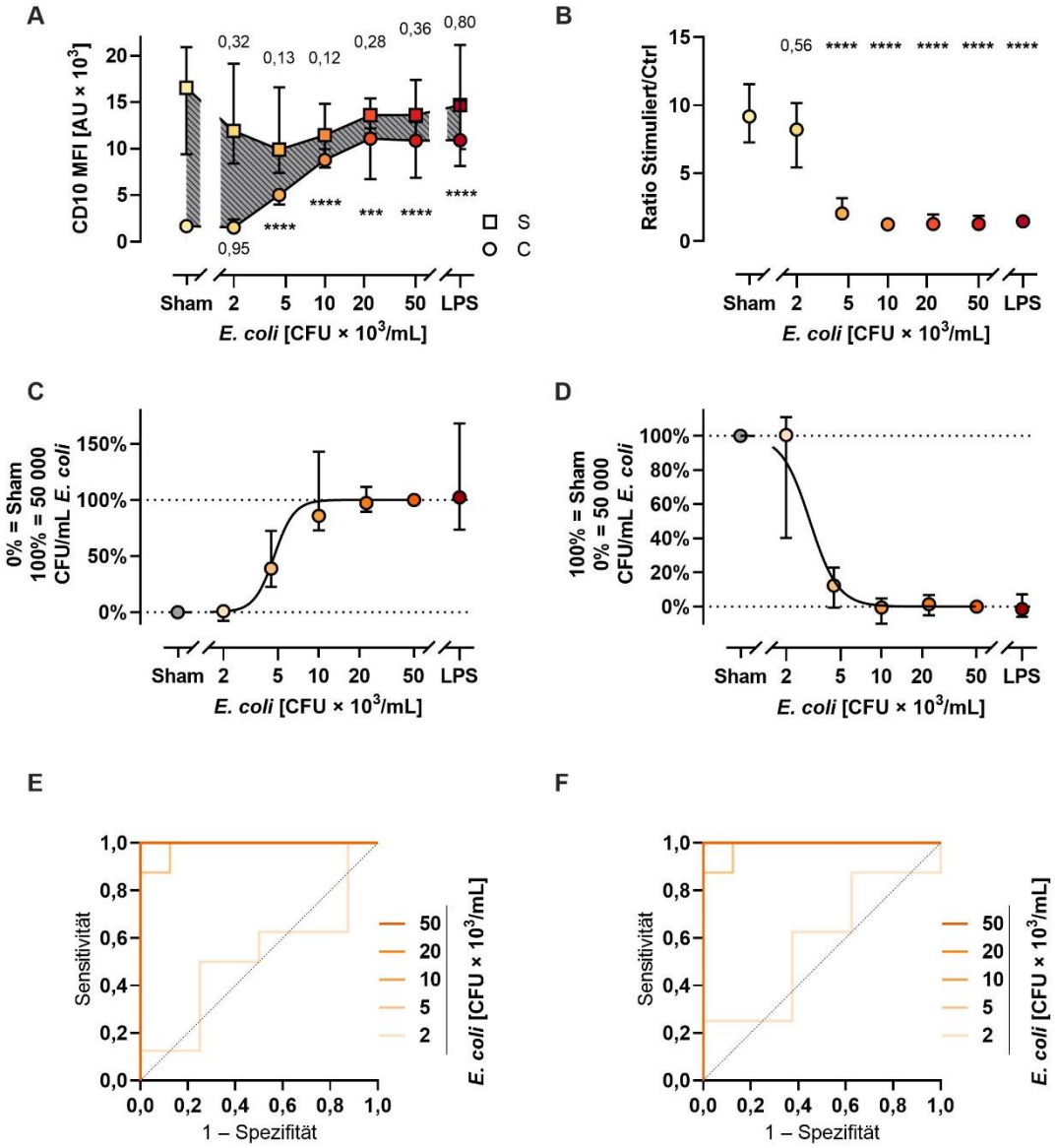


Abbildung 8: CD10 als Aktivitätsmarker neutrophiler Granulozyten während Bakteriämie in einem humanen Vollblutmodell. Sham: Kontrolle nach 60 min Inkubation; *E. coli* Bakterien in Konzentrationen von 2000 bis 50000 CFU/mL nach 60 min Inkubation; LPS: Lipopolysaccharid 100 ng/mL nach 60 min Inkubation. (**A**): Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD10 unstimulierter (C, Ctrl) und stimulierter (S, Stimulantiengemisch aus fMLP, PAF und TNF) PMN, Statistische Auswertung: Ctrl unter den Datenpunkten, Stimuliert über den Datenpunkten. (**B**): Verhältnis aus stimulierter und unstimulierter Probe aus (A), CRC (Zelluläre Reaktionskapazität). (**C**): Normalisierte Werte und EC_{50} Kurvenanpassung durch Sham = 0% und 50000 CFU/mL *E. coli* = 100% der unstimulierten Daten aus (A). (**D**): Normalisierte Werte und EC_{50} Kurvenanpassung durch Sham = 100% und 50000 CFU/mL *E. coli* = 0% der CRC aus (B). Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance von (**E**) unstimulierten CD10 MFIs und (**F**) berechneter CRC. Werte dargestellt als Median und IQR. n = 8. Ungepaarter t-Test gegen Sham. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

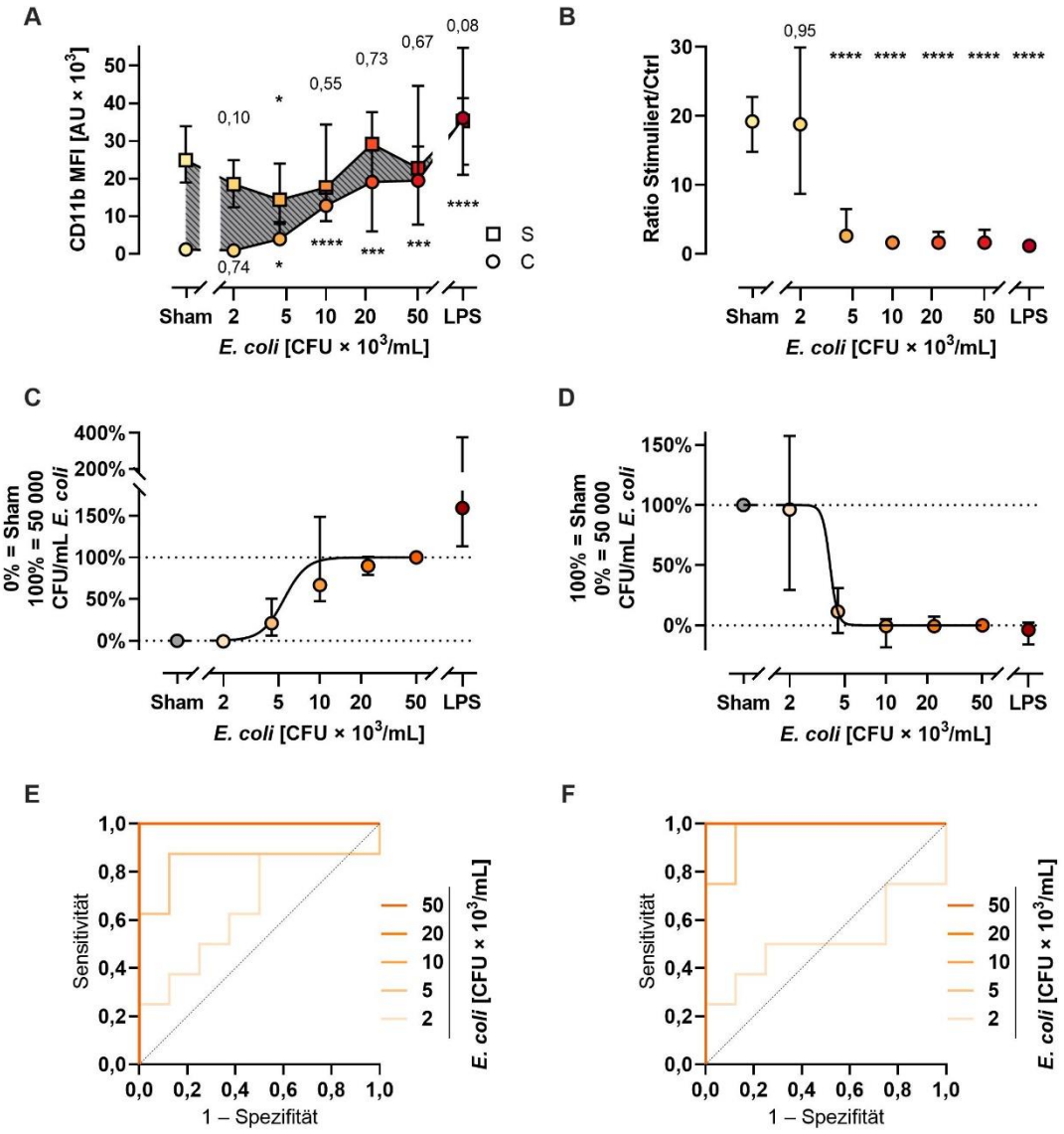


Abbildung 9: CD11b als Aktivitätsmarker neutrophiler Granulozyten während Bakteriämie in einem humanen Vollblutmodell. Sham: Kontrolle nach 60 min Inkubation; *E. coli* Bakterien in Konzentrationen von 2000 bis 50000 CFU/mL nach 60 min Inkubation; LPS: Lipopolysaccharid 100 ng/mL nach 60 min Inkubation. (**A**): Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD11b unstimulierter (C, Ctrl) und stimulierter (S, Stimulantiengemisch aus fMLP, PAF und TNF) PMN, Statistische Auswertung: Ctrl unter den Datenpunkten, Stimuliert über den Datenpunkten. (**B**): Verhältnis aus stimulierter und unstimulierter Probe aus (A), CRC (Zelluläre Reaktionskapazität). (**C**): Normalisierte Werte und EC_{50} Kurvenanpassung durch Sham = 0% und 50000 CFU/mL *E. coli* = 100% der unstimulierten Daten aus (A). (**D**): Normalisierte Werte und EC_{50} Kurvenanpassung durch Sham = 100% und 50000 CFU/mL *E. coli* = 0% der CRC aus (B). Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance von (**E**) unstimulierten CD11b MFIs und (**F**) berechneter CRC. Werte dargestellt als Median und IQR. n = 8. Ungepaarter t-Test gegen Sham. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.

Der Oberflächenmarker CD15 (Abbildung 10A) zeigte keine signifikant veränderte Expression durch die Inkubation mit *E. coli*. Allerdings konnte durch LPS eine gesteigerte Expression erreicht werden (Sham Median: 951 AU, IQR: 466 – 1339; LPS Median: 1980 AU, IQR: 1432 – 2310, p ≤ 0,01). Durch die weitere Stimulation mittels Stimulantiengemisch blieben die Expressionswerte nahezu unverändert. Die berechnete CRC (Abbildung 10B) unterschied sich durch den Kontakt mit *E. coli* nicht von der Kontrolle (Sham Median: 2,2, IQR: 1,7 – 2,6). Allein die LPS CRC lag signifikant niedriger (LPS Median: 1,1, IQR: 0,9 – 1,4, p ≤ 0,01). Die Berechnung mittlerer effektiver Konzentrationen war aufgrund der fehlenden Dosis-Wirkungs-Beziehung nicht möglich. Die Flächen unter der ROC Kurve lagen bei allen *E. coli* Konzentrationen, sowohl für die CD15 MFI (Abbildung 10C) als auch die CD15 CRC (Abbildung 10D), nicht über 0,7.

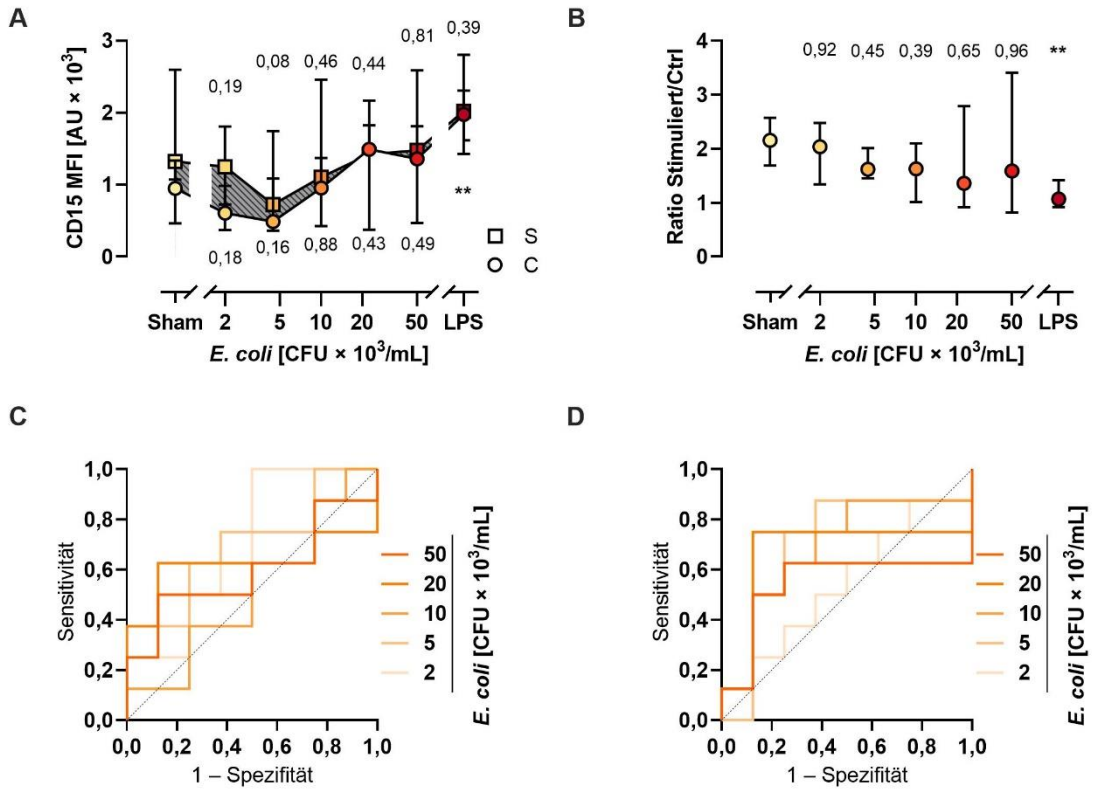


Abbildung 10: CD15 als Aktivitätsmarker neutrophiler Granulozyten während Bakteriämie in einem humanen Vollblutmodell. Sham: Kontrolle nach 60 min Inkubation; *E. coli* Bakterien in Konzentrationen von 2000 bis 50000 CFU/mL nach 60 min Inkubation; LPS: Lipopolysaccharid 100 ng/mL nach 60 min Inkubation. (**A**): Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD15 unstimulierter (C, Ctrl) und stimulierter (S, Stimulantiengemisch aus fMLP, PAF und TNF) PMN, Statistische Auswertung: Ctrl unter den Datenpunkten, Stimuliert über den Datenpunkten. (**B**): Verhältnis aus stimulierter und unstimulierter Probe aus (A), CRC (Zelluläre Reaktionskapazität). Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance von (**C**) unstimulierten CD15 MFIs und (**D**) berechneter CRC. Werte dargestellt als Median und IQR. n = 8. Ungepaarter t-Test gegen Sham. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.

E. coli Bakterien konnten keine signifikante Änderung der Oberflächenexpression von CD16 (Abbildung 11A) erzeugen. Die Inkubation von LPS erreichte eine signifikant höhere Expression von CD16 (Sham Median: 7225 AU, IQR: 6111 – 9360; LPS Median: 13632 AU, IQR: 10788 – 18511, $p \leq 0,01$). Das zugegebene Stimulantiengemisch konnte die Expression, teils signifikant, senken (*E. coli* 10000 CFU/mL Median: 5912 AU, IQR: 3616 – 7182, $p \leq 0,01$). Die CRC (Abbildung 11B) war nach *E. coli* (10000 CFU/mL Median: 0,7, IQR: 0,5 – 1,6, $p \leq 0,05$) und LPS Inkubation (LPS Median: 0,7, IQR: 0,6 – 0,7, $p \leq 0,0001$) verringert. Die Berechnung der mittleren effektiven Konzentrationen war aufgrund der fehlenden Dosis-Wirkungs-Beziehung nicht möglich. Für die CRC (Abbildung 11D) konnten Flächen unter der ROC Kurve von maximal 0,84 bei 10000 CFU/mL berechnet werden. Die MFI Werte (Abbildung 11C) erreichten hier geringere Flächen unter der Kurve.

Durch die Inkubation mit *E. coli* konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion der Oberflächenexpression des Proteins CD62L (Abbildung 12A) erreicht werden (Sham Median: 3638 AU, IQR 2937 – 6720). Hervorzuheben ist, dass ab einer Konzentration von 10000 CFU/mL die minimale MFI erreicht war (*E. coli* 10000 CFU/mL Median: 238 AU, IQR: 137 – 378, $p \leq 0,001$). Eine weitere Stimulation konnte diese ebenfalls nicht weiter reduzieren. Die hieraus berechnete CRC (Abbildung 12B) erhöhte sich mit steigender *E. coli* Konzentration signifikant (*E. coli* 10000 CFU/mL Median: 0,7, IQR: 0,2 – 0,8, $p \leq 0,001$). Die berechnete EC_{50} der Bakterien in Bezug auf die CD62L MFI (Abbildung 12C) lag bei 1950 CFU/mL. In Bezug auf die CD62L CRC (Abbildung 12D) lag diese bei 8152 CFU/mL. Es konnten für die CD62L MFI (Abbildung 12E) und CD62L CRC (Abbildung 12F) der höheren *E. coli* Konzentrationen (10000 – 50000 CFU/mL) Flächen unter der ROC Kurve von 1,0 errechnet werden.

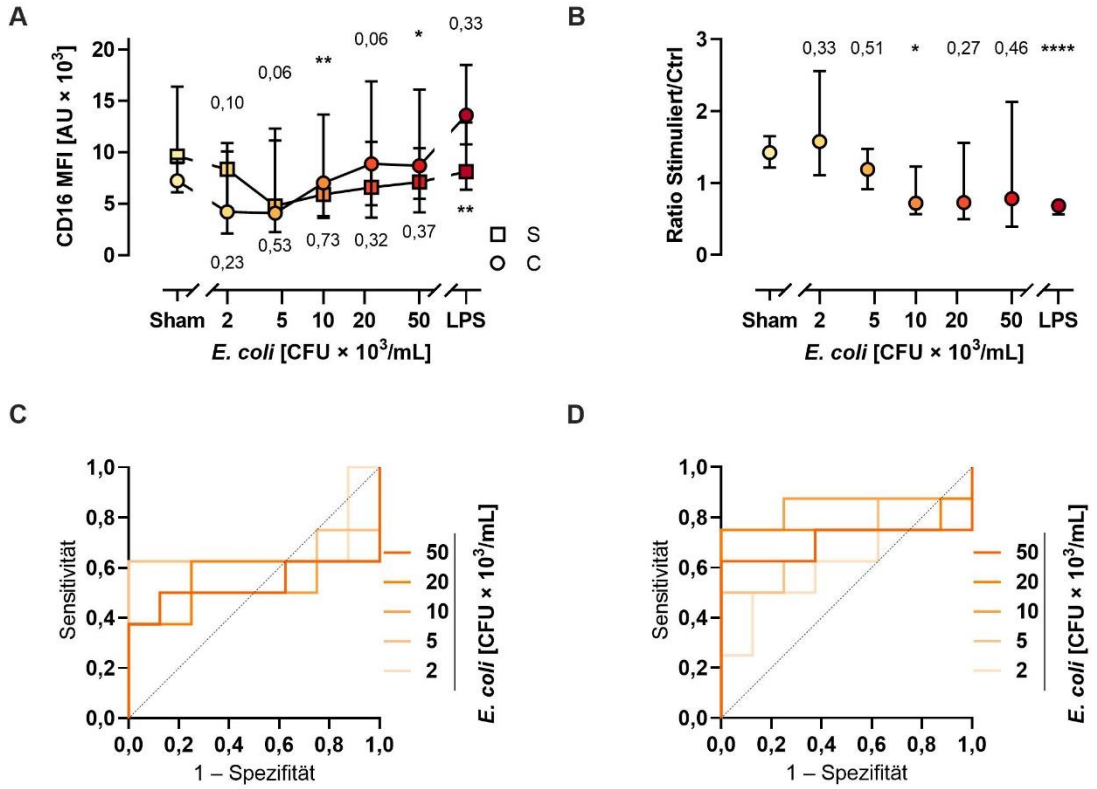


Abbildung 11: CD16 als Aktivitätsmarker neutrophiler Granulozyten während Bakteriämie in einem humanen Vollblutmodell. Sham: Kontrolle nach 60 min Inkubation; *E. coli* Bakterien in Konzentrationen von 2000 bis 50000 CFU/mL nach 60 min Inkubation; LPS: Lipopolysaccharid 100 ng/mL nach 60 min Inkubation. (**A**): Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD16 unstimulierter (C, Ctrl) und stimulierter (S, Stimulantiengemisch aus fMLP, PAF und TNF) PMN, Statistische Auswertung: Ctrl unter den Datenpunkten, Stimuliert über den Datenpunkten. (**B**): Verhältnis aus stimulierter und unstimulierter Probe aus (A), CRC (Zelluläre Reaktionskapazität). Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance von (**C**) unstimulierten CD16 MFIs und (**D**) berechneter CRC. Werte dargestellt als Median und IQR. n = 8. Ungepaarter t-Test gegen Sham. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.

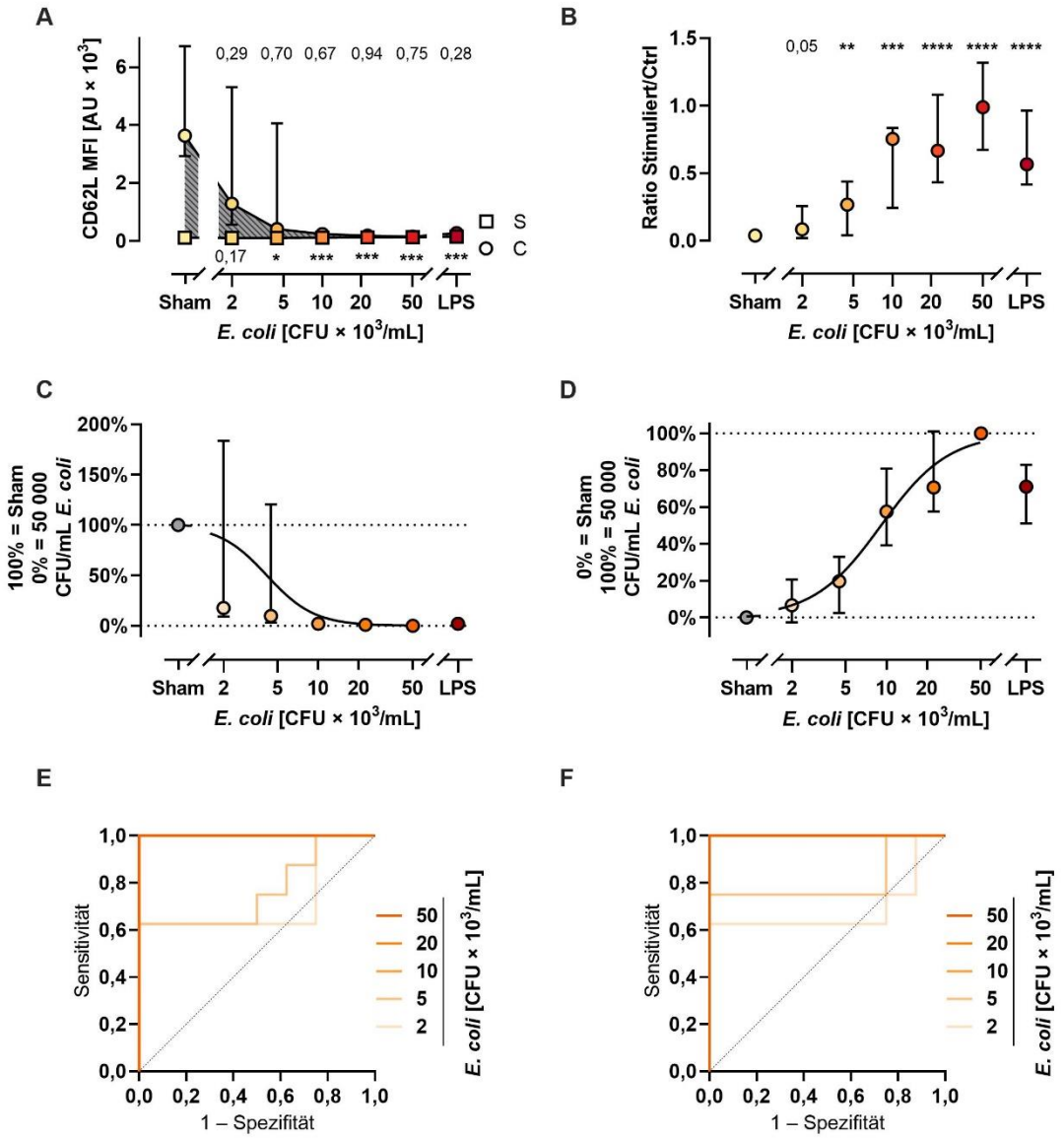


Abbildung 12: CD62L als Aktivitätsmarker neutrophiler Granulozyten während Bakteriämie in einem humanen Vollblutmodell. Sham: Kontrolle nach 60 min Inkubation; *E. coli* Bakterien in Konzentrationen von 2000 bis 50000 CFU/mL nach 60 min Inkubation; LPS: Lipopolysaccharid 100 ng/mL nach 60 min Inkubation. (**A**): Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD62L unstimulierter (C, Ctrl) und stimulierter (S, Stimulantiengemisch aus fMLP, PAF und TNF) PMN, Statistische Auswertung: Ctrl unter den Datenpunkten, Stimuliert über den Datenpunkten. (**B**): Verhältnis aus stimulierter und unstimulierter Probe aus (A), CRC (Zelluläre Reaktionskapazität). (**C**): Normalisierte Werte und EC_{50} Kurvenanpassung durch Sham = 100% und 50000 CFU/mL *E. coli* = 0% der unstimulierten Daten aus (A). (**D**): Normalisierte Werte und EC_{50} Kurvenanpassung durch Sham = 0% und 50000 CFU/mL *E. coli* = 100% der CRC aus (B). Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance von (**E**) unstimulierten CD62L MFIs und (**F**) berechneter CRC. Werte dargestellt als Median und IQR. n = 8. Ungepaarter t-Test gegen Sham. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.

Die in Abbildung 13A dargestellten Cohen's D Werte beziehen sich je auf eine *E. coli* Konzentration von 10000 CFU/mL. Im Vergleich zu IL-6 (1,97) zeigten vor allem CD10 und CD11b einen höheren Cohen's D, sowohl für die MFI (CD10: 2,82; CD11b 3,03), als auch für die CRC (CD10: 4,50; CD11b 3,65). Der Cohen's D von CD62L war geringgradig höher (MFI: 2,60; CRC: 2,32). Der Cohen's D der humoralen Marker IL-8 (2,70) und MMP9 (2,33) lag ebenfalls leicht höher als der von IL-6. Die Oberflächenmarker CD15 und CD16 wiesen einen niedrigeren Cohen's D für die MFI (CD15: 0,08; CD16 0,17) und CRC (CD15: 0,45; CD16 1,14) auf.

Die EC_{50} der *E. coli* Bakterien in Bezug auf die humoralen Marker sowie die Oberflächenproteine wurden bereits beschrieben. Ein direkter Vergleich dieser ist in Abbildung 13B zu sehen. Die EC_{50} in Bezug auf die MFI und CRC der Oberflächenproteine CD10 (MFI: 5392 CFU/mL, $p \leq 0,05$; CRC: 4056 CFU/mL, $p \leq 0,001$) CD11b (MFI: 7350 CFU/mL; CRC: 4081 CFU/mL, $p \leq 0,001$) und CD62L (MFI: 1950 CFU/mL, $p \leq 0,01$; CRC: 8152 CFU/mL) waren, teils signifikant, geringer als die EC_{50} in Bezug auf IL-6 (9498 CFU/mL). In Bezug auf IL-8 (15776 CFU/mL) und MMP9 (10504 CFU/mL) war die EC_{50} nicht signifikant höher.
Abbildung 13C zeigt die im Vorangegangenen bereits beschriebenen EC_{50} Kurvenanpassungen von IL-6 und der CRC des Oberflächenproteins CD11b im direkten Vergleich.

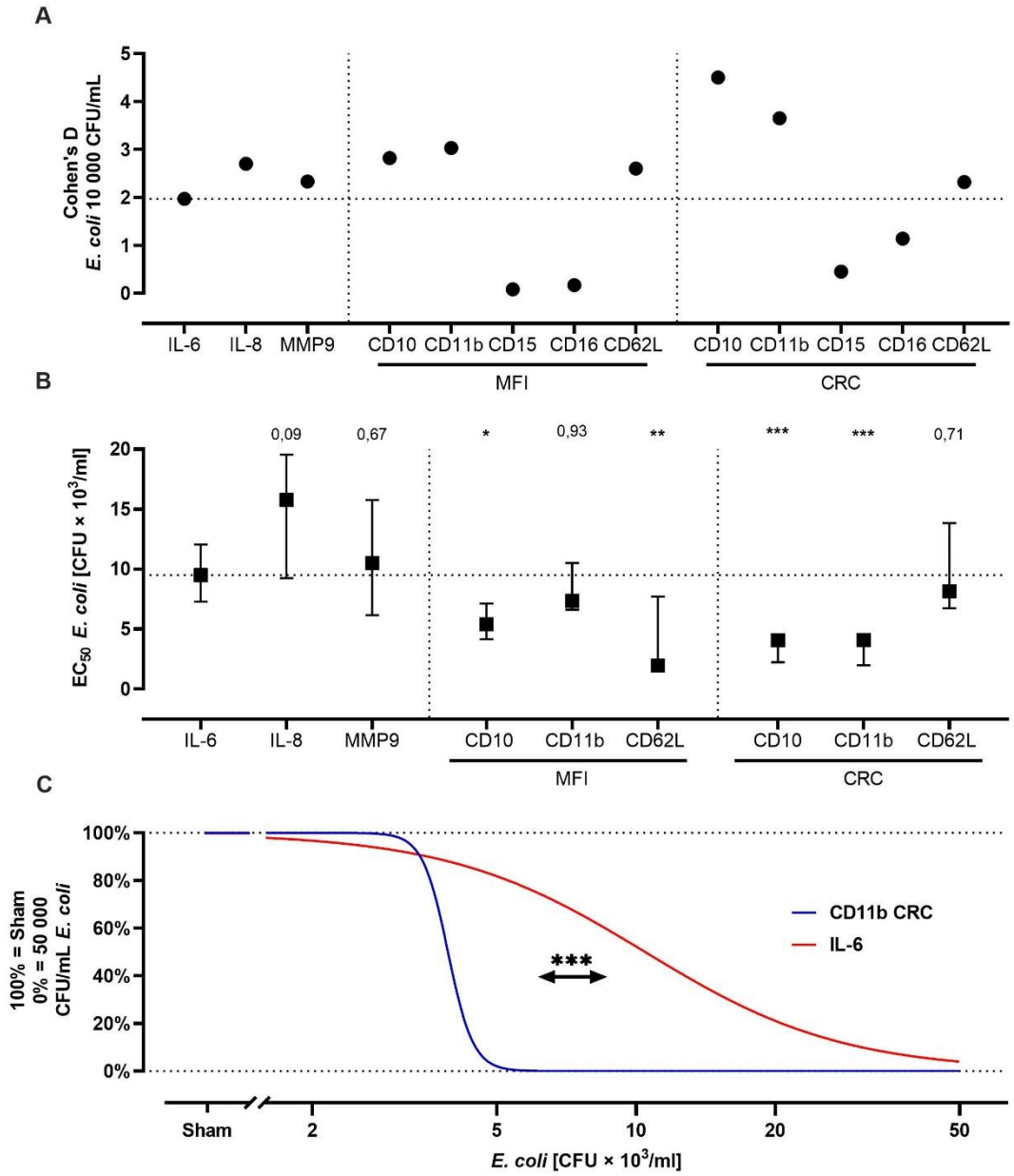


Abbildung 13: Diagnostische Performanz zur Detektion einer Bakteriämie mittels Analyse des Neutrophilen Phänotyps durch Ermittlung der Medianen Fluoreszenzintensität (MFI) und der Zellulären Reaktionskapazität (CRC) im Vergleich zu traditionellen Markern der humoralen Inflammation (IL-6, IL-8, MMP9). Sham: Kontrolle nach 60 min Inkubation; *E. coli* Bakterien in Konzentrationen von 2000 bis 50000 CFU/mL nach 60 min Inkubation. (**A**): Vergleich des Cohen's D (berechnet nach Kapitel 2.2.12.) bei 10000 CFU/mL *E. coli*, berechnet durch die in Abbildung 7 bis 12 dargestellten Daten. (**B**): Vergleich der EC_{50} in Abhängigkeit der *E. coli* Konzentration, berechnet durch die in Abbildung 7, 8, 9 und 12 dargestellten Daten. (**C**): Beispielhafter Vergleich der EC_{50} Kurvenanpassung durch Sham = 100% und 50000 CFU/mL *E. coli* = 0% für den humoralen Marker IL-6 (blau) und die durch die CD11b-CRC (rot) repräsentierte Änderung des Neutrophilen Phänotyps. Werte dargestellt als Median und IQR. n = 8. Ungepaarter t-Test gegen IL-6. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

3.3. Klinische Sepsis induziert Veränderungen der Oberflächenproteine neutrophiler Granulozyten und der daraus resultierenden CRC

Die im folgenden Kapitel beschriebenen Daten beziehen sich alle auf durchflusszytometrische Messungen neutrophiler Granulozyten aus Blutproben von Patienten mit klinisch diagnostizierter Sepsis.

Die Sepsispatienten (Abbildung 14A) wiesen zu Beginn des Beobachtungszeitraums signifikant geringere Expressionen des Oberflächenproteins CD10 auf (HV Median: 1084 AU, IQR: 841 – 1585; 0h Median: 313 AU, IQR: 245 – 421, $p \leq 0{,}001$). Im weiteren Verlauf näherten sich diese wieder an das Niveau gesunder Probanden an (120h Median: 1267 AU, IQR: 664 – 1938). Eine Stimulation mittels Stimulantiengemischs konnte bei Diagnosestellung die CD10 MFI nicht weiter steigern, zu späteren Messzeitpunkten war dies aber wieder möglich. Die daraus berechnete CD10 CRC (Abbildung 14C) war zu allen Messzeitpunkten signifikant geringer (0h Median: 1,4, IQR: 1,2 – 2,5, $p \leq 0{,}0001$), als die der gesunden Probanden (HV Median: 10,6, IQR: 8,0 – 13,4). Die ROC Analysen der CD10 MFI (Abbildung 14B) ergaben für 0h und 24h Flächen unter der Kurve von größer 0,94, wohingegen zu den beiden späteren Zeitpunkten deutlich geringere Werte berechnet werden konnten. Für die CD10 CRC (Abbildung 14D) konnten für alle Messzeitpunkte Flächen unter der ROC Kurve größer 0,88 ermittelt werden.

Das Oberflächenprotein CD11b (Abbildung 15A) wies bei Patienten mit Sepsis zu allen Messzeitpunkten eine signifikant höhere Expression auf (HV Median: 1051 AU, IQR: 659 – 1569; 0h Median: 4043 AU, IQR: 2176 – 6221, $p \leq 0{,}01$). Die weitere Stimulation erreichte bei CD11b zu allen Zeitpunkten etwa gleich hohe Fluoreszenzintensitäten. Die berechnete CD11b CRC (Abbildung 15C) war im Vergleich zu den gesunden Probanden zu allen Messzeitpunkten signifikant erniedrigt (HV Median: 19,0, IQR: 14,4 – 42,3; 0h Median: 4,0, IQR: 3,0 – 9,2, $p \leq 0{,}001$). Die Flächen unter der ROC Kurve lagen für die CD11b MFI (Abbildung 15B) für alle Messzeitpunkte über 0,85. Für die CD11b CRC (Abbildung 15D) waren diese jeweils noch größer.

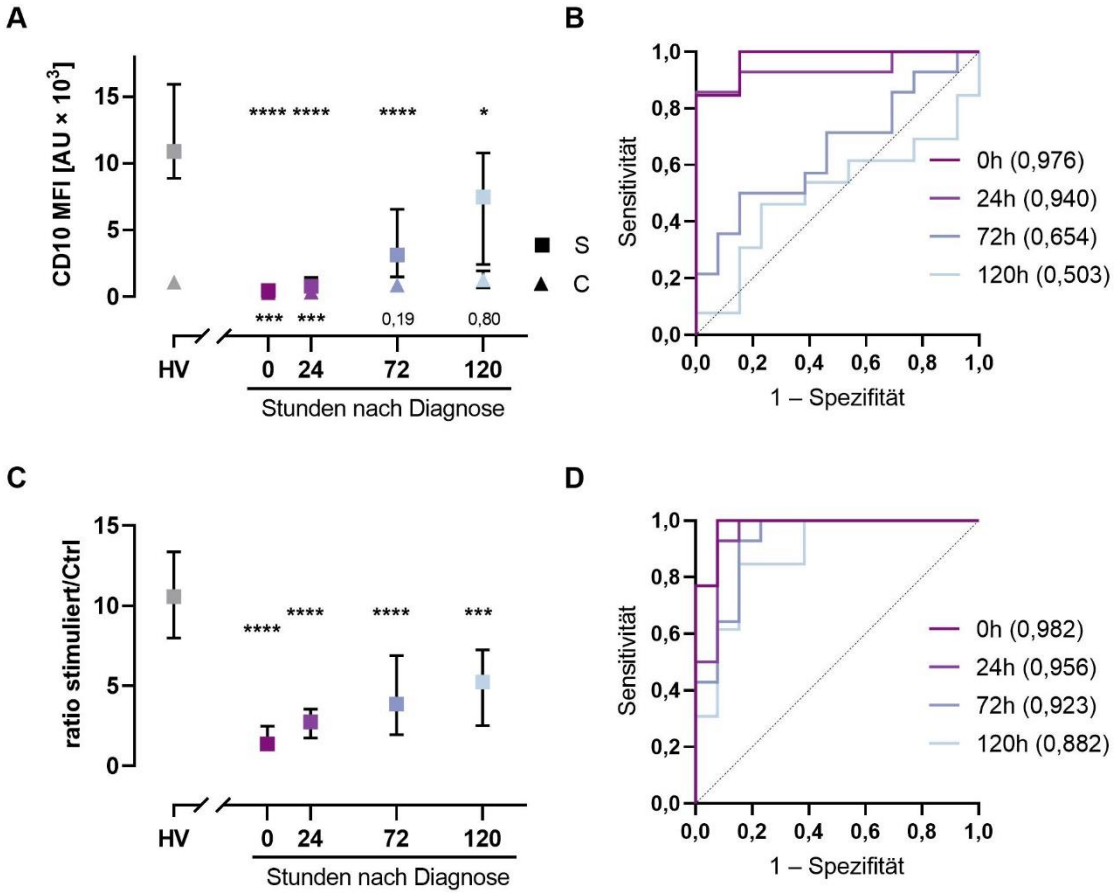


Abbildung 14: CD10 als Aktivitätsmarker neutrophiler Granulozyten während Sepsis. HV: Healthy Volunteer (Gesunde Probanden); Sepsispatienten zwischen 0 und 120 Stunden nach Diagnosestellung. (**A**): Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD10 unstimulierter (C, Ctrl) und stimulierter (S, Stimulantiengemisch aus fMLP, PAF und TNF) PMN, Statistische Auswertung: Ctrl unter den Datenpunkten, Stimuliert über den Datenpunkten. (**B**): Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance von unstimulierten CD10 MFIs aus (A), Fläche unter der Kurve in Klammern angegeben. (**C**): Verhältnis aus stimulierter und unstimulierter Probe aus (A), CRC (Zelluläre Reaktionskapazität). (**D**): Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance der berechneten CRC aus (C), Fläche unter der Kurve in Klammern angegeben. Werte dargestellt als Median und IQR. n = 13 – 14. Ungepaarter t-Test gegen HV. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

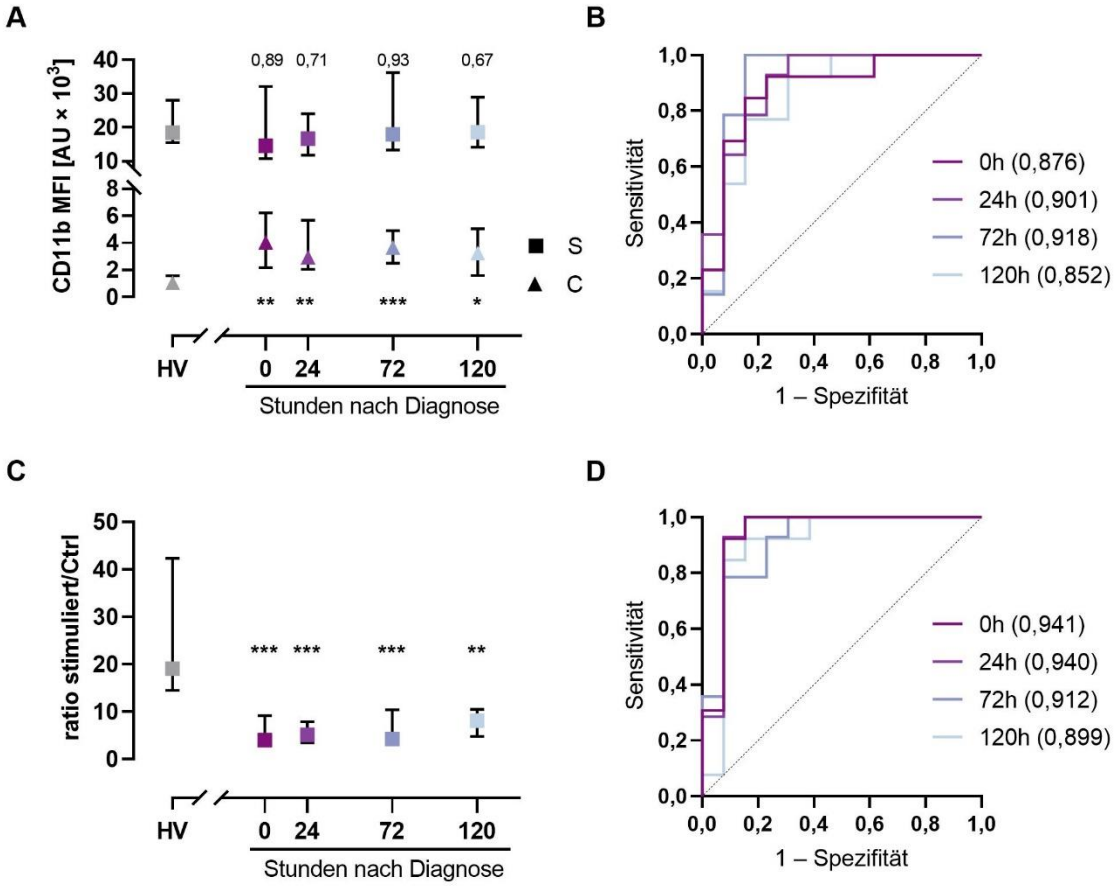


Abbildung 15: CD11b als Aktivitätsmarker neutrophiler Granulozyten während Sepsis. HV: Healthy Volunteer (Gesunde Probanden); Sepsispatienten zwischen 0 und 120 Stunden nach Diagnosestellung. (**A**): Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD11b unstimulierter (C, Ctrl) und stimulierter (S, Stimulantiengemisch aus fMLP, PAF und TNF) PMN, Statistische Auswertung: Ctrl unter den Datenpunkten, Stimuliert über den Datenpunkten. (**B**): Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance von unstimulierten CD11b MFIs aus (A), Fläche unter der Kurve in Klammern angegeben. (**C**): Verhältnis aus stimulierter und unstimulierter Probe aus (A), CRC (Zelluläre Reaktionskapazität). (**D**): Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance der berechneten CRC aus (C), Fläche unter der Kurve in Klammern angegeben. Werte dargestellt als Median und IQR. n = 13 – 14. Ungepaarter t-Test gegen HV. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

In der Expression des Oberflächenproteins CD15 (Abbildung 16A) konnte bei den Sepsispatienten weder vor noch nach Stimulation ein signifikanter Unterschied zu den gesunden Probanden gefunden werden (HV Median: 938 AU, IQR: 790 – 1161; 0h Median: 1195 AU, IQR: 659 – 2092). Auch die CD15 CRC (Abbildung 16C) der Patienten zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den gesunden Probanden (HV Median: 2,0, IQR: 1,5 – 3,0; 0h Median: 1,4, IQR: 1,1 – 1,7). Demnach waren die Flächen unter der ROC Kurve weder für die CD15 MFI (Abbildung 16B), noch die CD15 CRC (Abbildung 16D) größer als 0,75.

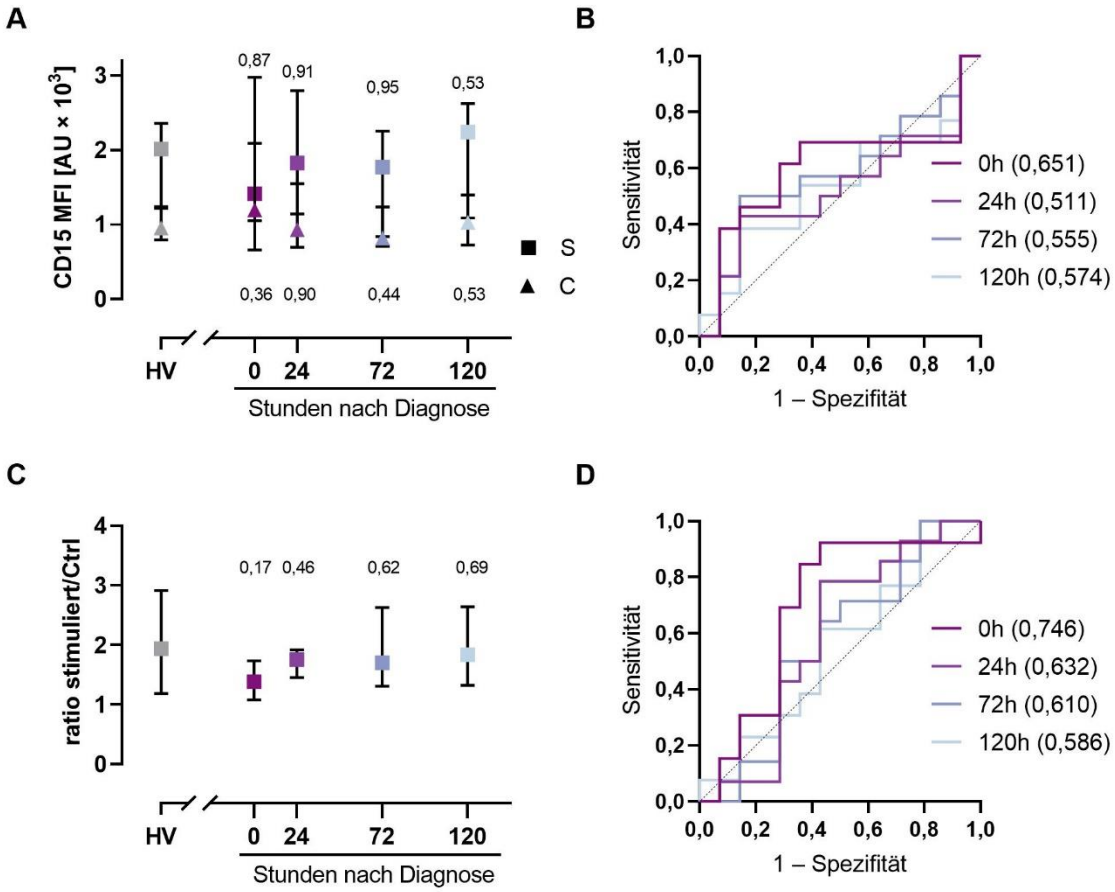


Abbildung 16: CD15 als Aktivitätsmarker neutrophiler Granulozyten während Sepsis. HV: Healthy Volunteer (Gesunde Probanden); Sepsispatienten zwischen 0 und 120 Stunden nach Diagnosestellung. (**A**): Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD15 unstimulierter (C, Ctrl) und stimulierter (S, Stimulantiengemisch aus fMLP, PAF und TNF) PMN, Statistische Auswertung: Ctrl unter den Datenpunkten, Stimuliert über den Datenpunkten. (**B**): Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance von unstimulierten CD15 MFIs aus (A), Fläche unter der Kurve in Klammern angegeben. (**C**): Verhältnis aus stimulierter und unstimulierter Probe aus (A), CRC (Zelluläre Reaktionskapazität). (**D**): Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance der berechneten CRC aus (C), Fläche unter der Kurve in Klammern angegeben. Werte dargestellt als Median und IQR. n = 13 – 14. Ungepaarter t-Test gegen HV. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.

Die Expression des Oberflächenproteins CD16 (Abbildung 17A) war bei Patienten mit Sepsis zu allen Messzeitpunkten signifikant geringer als bei gesunden Probanden (HV Median: 8134 AU, IQR: 5409 – 9113; 0h Median: 1418 AU, IQR: 607 – 2541, p ≤ 0,0001). Durch weitere Stimulation konnten die CD16 MFI Werte nicht weiter angehoben werden. Die berechnete CD16 CRC (Abbildung 17C) zeigte daher keinen signifikanten Unterschied zu gesunden Probanden (HV Median: 1,2, IQR: 0,9 – 1,6; 0h Median: 1,3, IQR: 1,0 – 1,5). So konnten für die CD16 MFI (Abbildung 17B), speziell für die beiden frühen Messzeitpunkte, Flächen unter der ROC Kurve größer 0,92 berechnet werden. Für die CD16 CRC (Abbildung 17D) gingen diese aber nicht über 0,57 hinaus.

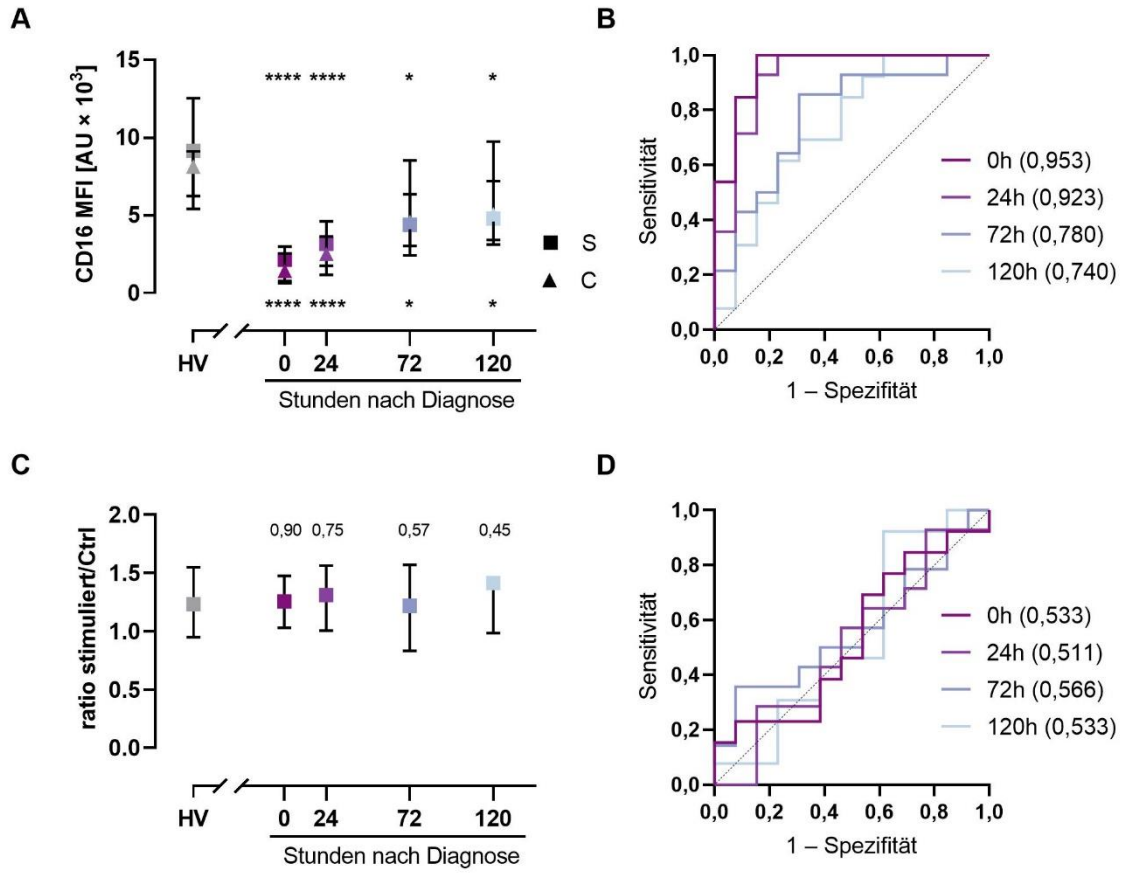


Abbildung 17: CD16 als Aktivitätsmarker neutrophiler Granulozyten während Sepsis. HV: Healthy Volunteer (Gesunde Probanden); Sepsispatienten zwischen 0 und 120 Stunden nach Diagnosestellung. (**A**): Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD16 unstimulierter (C, Ctrl) und stimulierter (S, Stimulantiengemisch aus fMLP, PAF und TNF) PMN, Statistische Auswertung: Ctrl unter den Datenpunkten, Stimuliert über den Datenpunkten. (**B**): Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance von unstimulierten CD16 MFIs aus (A), Fläche unter der Kurve in Klammern angegeben. (**C**): Verhältnis aus stimulierter und unstimulierter Probe aus (A), CRC (Zelluläre Reaktionskapazität). (**D**): Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance der berechneten CRC aus (C), Fläche unter der Kurve in Klammern angegeben. Werte dargestellt als Median und IQR. n = 13 – 14. Ungepaarter t-Test gegen HV. * p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,01; *** p ≤ 0,001; **** p ≤ 0,0001.

Patienten mit Sepsis (Abbildung 18A) zeigten im Vergleich zu gesunden Probanden zu keinem Messzeitpunkt signifikante Veränderungen in der Expression des Oberflächenproteins CD62L (HV Median: 4786 AU, IQR: 3197 – 6198; 0h Median: 4314 AU, IQR: 3678 – 6005). Die weitere Stimulation konnte die MFI deutlich reduzieren. Die hieraus berechnete CD62L CRC (Abbildung 18C) war zu den Messzeitpunkten 24h (24 Median: 0,06, IQR: 0,04 – 0,08, $p \leq 0,05$) und 120h signifikant erhöht. Zu den Messzeitpunkten 0h und 72h war die CRC, wenn auch knapp, nicht signifikant erhöht. Die Flächen unter der ROC Kurve der CD62L CRC lagen nicht über 0,65. Für die CD62L CRC waren diese geringfügig größer.

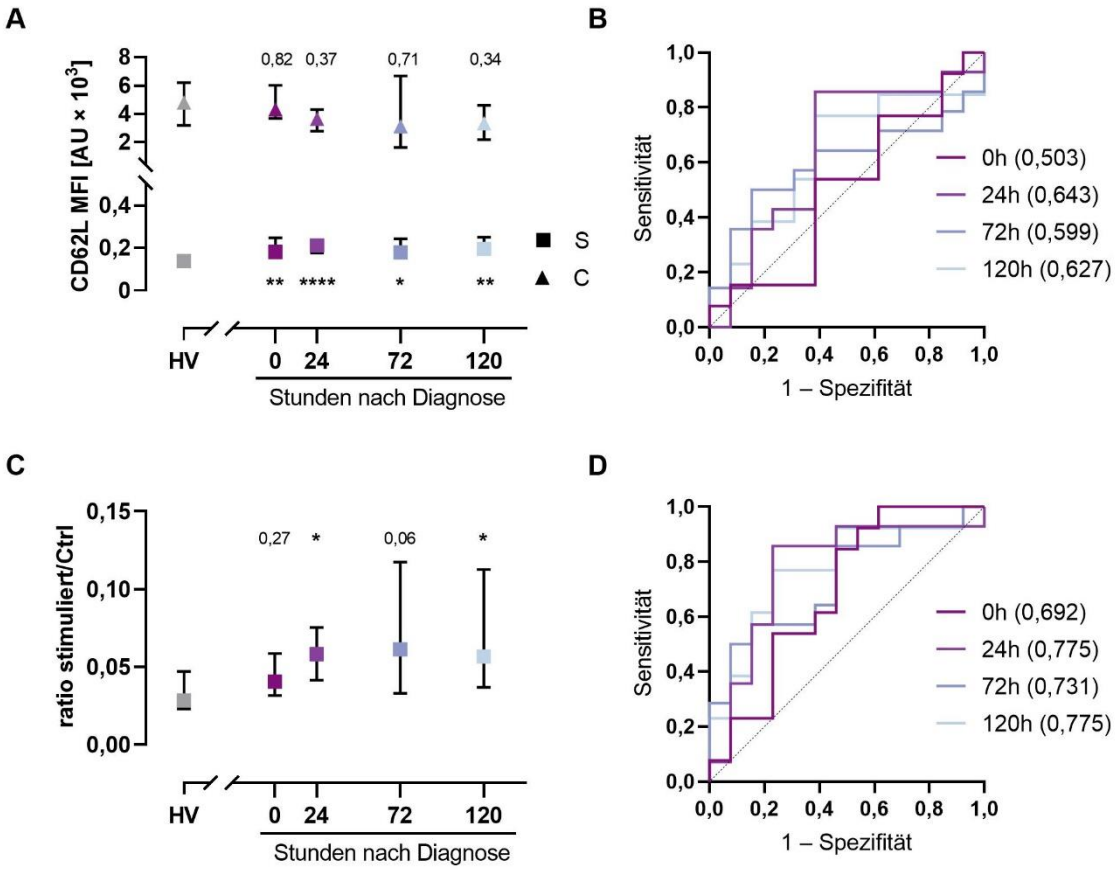


Abbildung 18: CD62L als Aktivitätsmarker neutrophiler Granulozyten während Sepsis. HV: Healthy Volunteer (Gesunde Probanden); Sepsispatienten zwischen 0 und 120 Stunden nach Diagnosestellung. (**A**): Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD62L unstimulierter (C, Ctrl) und stimulierter (S, Stimulantiengemisch aus fMLP, PAF und TNF) PMN, Statistische Auswertung: Ctrl unter den Datenpunkten, Stimuliert über den Datenpunkten. (**B**): Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance von unstimulierten CD62L MFIs aus (A), Fläche unter der Kurve in Klammern angegeben. (**C**): Verhältnis aus stimulierter und unstimulierter Probe aus (A), CRC (Zelluläre Reaktionskapazität). (**D**): Receiver operating characteristic (ROC) Kurven zur Analyse der Performance der berechneten CRC aus (C), Fläche unter der Kurve in Klammern angegeben. Werte dargestellt als Median und IQR. n = 13 – 14. Ungepaarter t-Test gegen HV. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$.

Abbildung 19 zeigt die Flächen unter der ROC Kurve (A) und Cohen's D Werte (B) von MFI und CRC der einzelnen Oberflächenproteine für den Messzeitpunkt 0h im Vergleich. Die Flächen unter der Kurve wurden im Vorangegangenen bereits beschrieben. Hervorzuheben ist die CD10 CRC mit einer Fläche von 0,982. Der Cohen's D ist ebenso für die CD10 CRC am höchsten. Cohen's D Werte über 1 erreichen außerdem die CD10 MFI, CD11b MFI und CRC sowie die CD16 CRC.

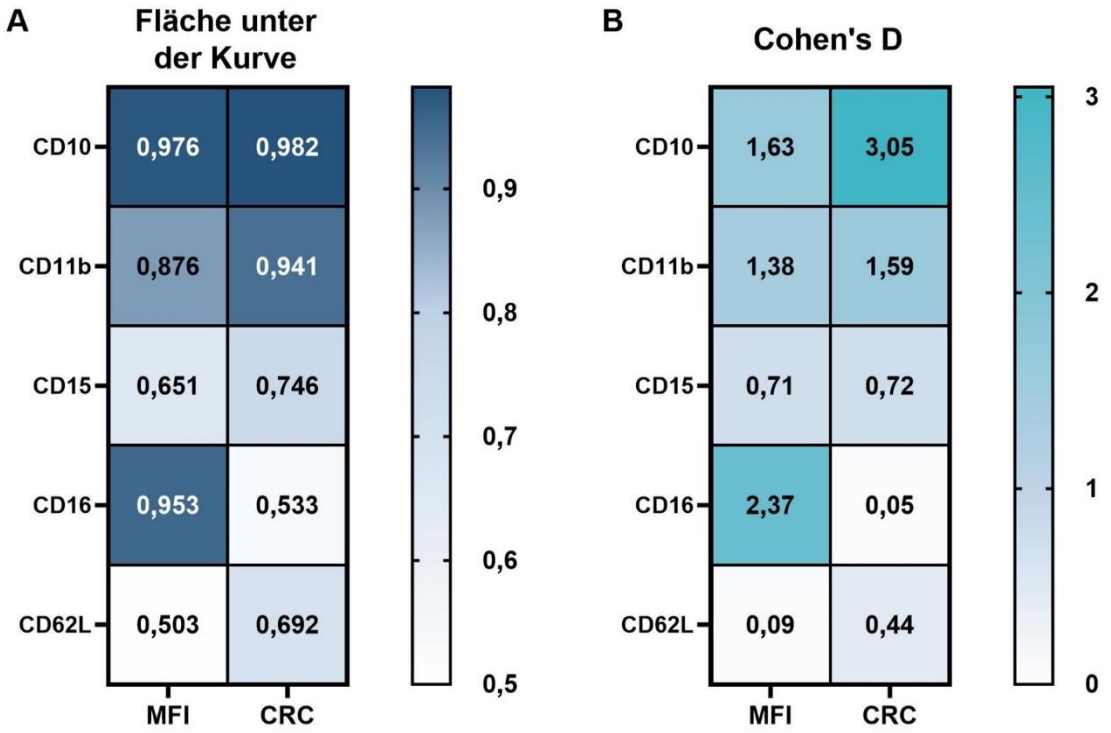


Abbildung 19: Vergleich der Performance unterschiedlicher Oberflächenproteine neutrophiler Granulozyten durch Analyse der Medianen Fluoreszenzintensität (MFI) und der Zellulären Reaktionskapazität (CRC) bei Patienten mit klinischer Sepsis. Dargestellte Werte sind aus den Daten 0h nach Diagnosestellung berechnet. (**A**): Fläche unter der Kurve einer Receiver operating characteristic (ROC) 0h gegen Healthy Volunteer (gesunde Probanden), linke Spalte Mediane Fluoreszenzintensität (MFI), rechte Spalte Zelluläre Reaktionskapazität (CRC). (**B**): Cohen's D berechnet nach Kapitel 2.2.12., linke Spalte Mediane Fluoreszenzintensität, rechte Spalte Zelluläre Reaktionskapazität (CRC). n = 13 – 14.

3.4. Abgleich mit der Fragestellung

Die Ergebnisse der Arbeit sollen nun mit den formulierten Zielen der Arbeit (siehe 1.5.) abgeglichen werden.

H1: *Escherichia coli* induziert in einem experimentellen humanen Vollblutmodell humorale und zelluläre immunologische Veränderungen, welche mit den Blutveränderungen einer klinischen Sepsis vergleichbar sind.
E. coli erzeugte nach Inkubation im humanen Vollblutmodell Veränderungen der humoralen Parameter IL-6, IL-8 und MMP9, welche auch in Patienten mit Sepsis zu finden sind. Die Oberflächenproteine neutrophiler Granulozyten verhielten sich teilweise gleich, teilweise gegensätzlich zu Patienten mit Sepsis.
Die Hypothese kann somit als teilweise verifiziert betrachtet werden.

H2: Die Zelluläre Reaktionskapazität neutrophiler Granulozyten ist ein sensitiverer Parameter zur Erfassung einer experimentellen Bakteriämie als konventionelle humorale Biomarker.
Die CRC der Oberflächenproteine CD10, CD11b und CD62L erkennt eine Bakteriämie sensitiver als die traditionellen Marker IL-6, IL-8 und MMP9. Zudem weist die CRC dieser Proteine eine Dosis-Wirkungs-Beziehung in Bezug auf die *E. coli* Konzentration auf.
Die Hypothese kann somit als verifiziert betrachtet werden.

H3: Die Zelluläre Reaktionskapazität neutrophiler Granulozyten eignet sich zum Immunmonitoring bei Patienten mit klinisch diagnostizierter Sepsis.
Die CRC der Oberflächenproteine CD10 und CD11b differenziert zuverlässig Patienten mit Sepsis von gesunden Probanden. Gerade zu Beginn des Beobachtungszeitraums, kurz nach Diagnosestellung, waren die Unterschiede in der CRC hoch signifikant. Mit Fortschreiten der Sepsis konnte auch ein Erholungseffekt der neutrophilen Granulozyten beobachtet werden.
Die Hypothese kann somit als verifiziert betrachtet werden.

4. Diskussion

4.1. Humanes tierversuchsfreies ex-vivo Vollblutmodell als neue Plattform zur Erforschung der Sepsis

Escherichia coli stellt eine der Hauptursachen für Bakteriämien dar [7]. Daraus ergibt sich die Notwendigkeit der Erforschung von *E. coli* als Induktor einer klinischen und experimentellen Sepsis. Aufgrund des Mangels tierversuchsfreier Alternativen wurde in dieser Arbeit ein bestehendes Vollblutmodell [67] für den Einsatz mit lebenden Bakterien adaptiert. Durch die Verwendung fünf verschiedener Konzentrationen von 2000 bis 50000 CFU/mL der *E. coli* Bakterien konnten verschiedene Reaktionsstärken des Immunsystems abgebildet werden. Die Konzentration von 100 ng LPS pro mL zeigte in Vorarbeiten eine starke Aktivierung des Immunsystems, vor allem der PMN, und konnte daher zuverlässig als Positivkontrolle eingesetzt werden.

Die Titer-Bestimmungen sowie der Vergleich der Effektstärken wurden mit 10000 CFU/mL *E. coli* durchgeführt um eine hohe, aber trotzdem klinisch relevante Konzentration zu repräsentieren [2]. Eine genaue Konzentration an lebenden Bakterien zu erreichen, gestaltet sich in der Praxis üblicherweise schwierig. Daher kann der Median von 7650 CFU/mL als verlässliches Ergebnis bezeichnet werden. Die Schwankungen könnten durch den Verlust von Bakterien bei der Entfernung des Puffers nach der Zentrifugation oder bei der Verdünnung zum Erreichen der Endkonzentration erklärt werden. Nach einstündiger Inkubation sank die *E. coli* Konzentration im Median auf 1300 CFU/mL ab. Hier ergeben sich zwei mögliche Erklärungsansätze. Erstens könnten die Immunzellen im Blut die Bakterien während dieser Zeit bereits zerstört haben. Das angeborene Immunsystem wird direkt nach dem Kontakt mit Pathogenen aktiviert. Beispielsweise beginnen neutrophile Granulozyten sofort mit der Eliminierung der Bakterien mittels Phagozytose und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies [51]. Zweitens könnten sich die Bakterien an die Oberfläche des Schlauchsystems angeheftet haben. Die Anheftung von *E. coli* Bakterien an Plastik-Oberflächen konnte bereits beobachtet werden [28]. Dies würde aber weiterhin einen zumindest teilweisen Kontakt der Bakterien mit den Blutzellen ermöglichen.

Heparin aktiviert neutrophile Granulozyten [110]. Die im vorgestellten Modell eingesetzten Mengen konnten aber auf deutlich geringere Konzentrationen von 0,5 I.E. pro mL reduziert werden. Andere Modelle nutzen Hirudin zur Antikoagulation, dieses ist aber teurer und würde die Vermischung zweier Antikoagulantien mit sich bringen da die Schläuche mit Heparin beschichtet sind. Die mittels BGA gemessenen Parameter zeigten sich weitgehend stabil über den Zeitraum der Inkubation. Die erhöhte Laktatkonzentration liegt im erwarteten Bereich, da aufgrund der fehlenden Sauerstoffzufuhr die Blutzellen zum Teil auf anaerobe Stoffwechselprozesse zurückgreifen müssen. Die Erniedrigung des Glucosespiegels kann durch den Zuckerverbrauch durch die Zellen oder eventuell auch der Bakterien erklärt werden. Die Stabilität des pO_2 und des pCO_2 sind vermutlich auf den Gasaustausch mit der eingeschlossenen Luftblase zurückzuführen.

Die gemessenen Plasmaspiegel von IL-6 (*E. coli* 10000 CFU/mL Median: 90,5 pg/mL) erreichten nicht den in den Patienten mit Sepsis (0h nach Diagnose Median: 795 pg/mL) gemessenen Bereich. Die Literatur gibt hier ein uneinheitliches Bild ab, welcher IL-6 Grenzwert für Sepsis angewendet werden sollte [69]. So setzt eine Arbeit diesen beispielsweise schon bei 40 pg/mL [105]. Die Zentrale Einrichtung Klinische Chemie des Universitätsklinikums Ulm verweist in ihrem Leistungsverzeichnis auf Mediane IL-6 Plasmakonzentrationen von 131 pg/mL bei Sepsis ohne schweren Verlauf [108]. So kann die im Modell erreichte Konzentration als durchaus realitätsnah betrachtet werden. Zudem sei hier zu erwähnen, dass bei den Patienten ein deutlich längerer Kontakt mit dem Pathogen bestand, wohingegen die im ex-vivo Modell gemessenen Werte bereits nach einer Stunde erreicht wurden. Außerdem fehlt im Vollblutmodell der Kontakt mit Organen, welche auch IL-6 produzieren wie beispielsweise die Lunge [102]. Auf die einzelnen Oberflächenmarker sowie deren Gemeinsamkeiten und Unterschiede bei experimenteller Bakteriämie und klinischer Sepsis wird detailliert in Kapitel 4.2.2. eingegangen. Vorausgreifend kann gesagt werden, dass neutrophile Granulozyten einen Sepsis ähnlichen Phänotyp nach dem Kontakt mit *E. coli* Bakterien zeigen.

So bietet das in dieser Arbeit vorgestellte Modell eine neue Plattform zur Erforschung von Sepsis, welche das Methodenspektrum experimenteller Ansätze erweitert.

4.1.1. Stärken und Schwächen des ex-vivo Vollblutmodells

Die Stärken des Modells sind vielfältig. Die Handhabung ist einfach und die Arbeitsschritte sind leicht reproduzierbar. Die eingesetzten Komponenten sind kostengünstig und kommerziell erhältlich. Daher bedarf es keiner weiteren Präparation und die Sterilität ist gewährleistet.
Besonders hervorzuheben ist an dieser Stelle das tierversuchsfreie Konzept. Hierdurch ist einerseits die Translation der Ergebnisse auf den echten Patienten deutlich erhöht und die Einflussfaktoren eines Tiermodells werden umgangen. Andererseits hilft das humane Vollblutmodell die 3-R Prinzipien zur Reduzierung von Tierversuchen zu verwirklichen [17].

Das Modell weist gewisse Limitationen auf. Wie bereits aus vorangegangenen Arbeiten bekannt ist, beschränkt sich die maximale Zeit der Inkubation im Schlauchsystem auf eine Stunde. Bei längeren Inkubationszeiten wird das Blut sauer, der Lakatatwert steigt in unphysiologische Bereiche und es stellt sich eine ausgeprägte Hypoglykämie ein [67]. Außerdem ermöglicht das Modell nur Analysen des Immunsystems im alleinigen Bezug auf dessen Bestandteile im Blut.
Des Weiteren fehlt der Kontakt mit anderen Organsystemen wie dem Knochenmark, der Leber, der Milz und der Lunge. Ebenso besteht kein Kontakt zum Endothel der Gefäße und dessen Glykokalix. Zuletzt stellt der durch Rotation mit eingeschlossener Luftblase simulierte Blutfluss eine nur unzureichende Imitation des physiologischen pulsatilen Flusses durch Hoch- und Niederdrucksystem dar. Diesen Einschränkungen könnte in Zukunft durch eine Kombination mit einer pulsatilen Pumpe, welche das Blut durch Organoide pumpt, begegnet werden. Dies stellt aber die bisher einfache Handhabung des Modells vor neue Herausforderungen.

4.2. Die CRC als Ergänzung des diagnostischen Spektrums

4.2.1. Einschränkungen der humoralen Entzündungs-Biomarker bei experimenteller Sepsis

Escherichia coli induzierte einen veränderten Phänotyp neutrophiler Granulozyten, welcher mit einem signifikanten Anstieg der Blutkonzentrationen von IL-6, IL-8 und MMP9 einherging. Diese Biomarker werden aber grundsätzlich nicht nur von Neutrophilen, sondern auch von anderen Zellen des Immunsystems gebildet.

Die humorale Immunantwort auf *E. coli* Bakterien führte jedoch nur dann zu nachweisbaren Veränderungen, wenn mindestens fünfstellige Konzentrationen der Bakterien pro mL vorlagen. Dies deutet darauf hin, dass die Reaktion der Neutrophilen und anderen Bestandteilen des Immunsystems, die diese Zytokine, Chemokine und Proteasen erzeugen, eine bestimmte Bakterien-Schwelle und eine gewisse Zeit benötigt. Gerade im Bereich niedriger Bakterienkonzentrationen scheint daher die Antwort dieser Entzündungsmediatoren nicht perfekt für die Diagnose geeignet zu sein.

4.2.2. Oberflächenproteine Neutrophiler Granulozyten im Kontext Klinischer und Experimenteller Sepsis

Die Expression von CD10 zeigte kein eindeutiges Verteilungsmuster. *E. coli* und LPS erhöhten die Expression signifikant. Die Neutrophilen der Sepsispatienten allerdings zeigten erniedrigte Expressionsmuster von CD10. Diese Differenz zwischen ex-vivo und in-vivo Untersuchungen konnte in anderen Arbeiten ebenso beobachtet werden [49, 60, 62]. Dies lässt sich am ehesten durch die Rekrutierung CD10 negativer neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark erklären, welche die T-Zell Proliferation beeinflussen [60].

CD11b wurde schon bei sehr geringen Mengen *E. coli* auf der Oberfläche der Neutrophilen hochreguliert. Die Neutrophilen der Patienten mit Sepsis zeigten ebenso eine signifikant erhöhte Expression von CD11b. Die Relevanz von CD11b bei der Differenzierung von septischen und nicht septischen Patienten konnte bereits in anderen Arbeiten bestätigt werden [71]. Ebenso konnten nach Inkubation mit *Staphylococcus aureus* für 15 Minuten erhöhte Expressionen von CD11b auf der Oberfläche Neutrophiler beobachtet werden [89].

Die Oberflächenexpression von CD15 auf Neutrophilen zeigte keine signifikanten Unterschiede, sowohl nach der Inkubation mit *E. coli* als auch bei klinischer Sepsis.

Eine Arbeit konnte leicht erhöhte Expressionen von CD15 bei Patienten mit Sepsis zeigen [94].

Die Expression von CD16 blieb nach Inkubation mit *E. coli* nahezu unverändert. Dahingegen zeigte sich bei den Sepsispatienten eine signifikant verminderte Expression von CD16 auf der Oberfläche der Neutrophilen. Passend zu diesem Muster konnte eine Arbeit erhöhte Plasmalevel von gelöstem CD16 detektieren, welches möglicherweise von den Neutrophilen abgespalten wurde [72]. Im Gegensatz hierzu steht eine weitere Arbeit, welche keine Unterschiede in der Oberflächenexpression von CD16 nachweisen konnte [36]. Eine jüngst veröffentlichte Sepsisstudie beschreibt eine erhöhte Anzahl unausgereifter Neutrophiler im Rahmen der Sepsis [104]. Das Profil dieser Neutrophilen wird einerseits, wie erwähnt als CD10 negativ beschrieben, andererseits zeigen diese unausgereiften Zellen auch eine deutlich verringerte Expression von CD16 auf deren Oberfläche [6, 104]. Dies bietet einen Erklärungsansatz, weshalb im ex-vivo Modell keine Veränderungen der CD16 Expression gemessen werden konnten.

Nach der Inkubation mit *E. coli* und LPS zeigten die Neutrophilen deutlich verringerte Expressionslevel von CD62L. Dies ist am ehesten auf ein Shedding des Oberflächenproteins zurückzuführen [9, 92]. Hierzu konnten erhöhte Plasmaspiegel von gelöstem CD62L gemessen werden [92], welches vornehmlich durch die Metalloproteinase ADAM-17 abgespalten wird [109]. Grundsätzlich wird der Abspaltung von CD62L eine protektive Funktion zugesprochen [26]. Interessanterweise konnten bei Patienten mit Sepsis keine signifikanten Unterschiede der CD62L Expression im Bezug zu gesunden Probanden gemessen werden. Dies steht im Gegensatz zu bestehenden Arbeiten, bei welchen beispielsweise Covid-19 Pateinten vermehrt Neutrophile mit geringerer CD62L Expression aufwiesen [6].

4.2.3. Die CRC differenziert zuverlässig Bakteriämie und Patienten mit Sepsis von gesunden Probanden

Das Patientenkollektiv stellt durch die strikten Ein- und Ausschlusskriterien eine sehr selektierte Kohorte dar, bei welcher bereits im Voraus mit einer Dysfunktion des Immunsystems zu rechnen war. Da es sich bei dieser Arbeit aber um eine erstmalige Anwendung der Zellulären Reaktionskapazität an Patienten handelt,

eignete sich diese Kohorte bestens zur grundsätzlichen Überprüfung der Methode im klinischen Kontext.

Nicht jedes Oberflächenprotein neutrophiler Granulozyten eignet sich als diagnostisches Werkzeug. Wie in Abbildung 13 und 19 dargestellt, unterscheidet sich die Performance der einzelnen Oberflächenproteine stark voneinander.

CD10 stellte in den durchgeführten Analysen sowohl bei experimenteller Bakteriämie, als auch klinischer Sepsis den trennschärfsten Parameter dar. Die CRC von CD10 reagiert bereits auf kleine Mengen *E. coli*, was sich auch durch eine geringe EC_{50} widerspiegelt. Bei klinischer Sepsis zeigt sich die CD10 CRC durchweg signifikant niedriger als im gesunden Probanden.
CD11b präsentiert sich mit ähnlichen Ergebnissen wie CD10. Auch die CD11b CRC ist sowohl bei experimenteller Bakteriämie, als auch klinischer Sepsis signifikant erniedrigt.
Die CD15 CRC kann in keinem Kontext überzeugen. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle oder den gesunden Probanden. Im Performancevergleich schneidet sowohl die CD15 MFI als auch die CD15 CRC schlecht ab.
CD16 zeigt ein heterogenes Bild. Auch wenn im Vollblutmodell keine Unterschiede beobachtet wurden, so kann die CD16 MFI eine Sepsis zuverlässig identifizieren. Interessanterweise kann nach Berechnung der CD16 CRC kein Unterschied zu gesunden Probanden mehr festgestellt werden. Hier scheint die alleinige Bestimmung der Oberflächenexpression der CRC überlegen zu sein.
Während die CD62L CRC im Kontext der Bakteriämie noch deutliche Unterschiede zur Kontrolle herausarbeiten konnte ist dies bei klinischer Sepsis nicht mehr der Fall.

Bei experimenteller Bakteriämie präsentierten sich vor allem die CD10 CRC und die CD11b CRC der Performance herkömmlicher Parameter wie IL-6, IL-8 und MMP9 deutlich überlegen. Auch im Kontext der klinischen Sepsis überzeugte die CRC von CD10 und CD11b. Die in dieser Arbeit eingeschlossenen Patienten konnten hierdurch sicher von gesunden Probanden abgegrenzt werden. Dies wird durch die

Flächen unter der Kurve der ROC-Analysen, welche beim Messzeitpunkt 0h bei der CD10 CRC bei 0,98 und der CD11b CRC bei 0,94 liegen, untermauert.
Um noch präzisere Ergebnisse zu erzielen, sollte zukünftig über eine multiparametrische Analyse nachgedacht werden. Die mathematische Kombination verschiedener Reaktionskapazitäten könnte möglicherweise noch aussagekräftigere Informationen über den Status der Immunzellen geben.
In den gezeigten Daten der Sepsispatienten deutet sich teilweise bereits ein Erholungseffekt der Neutrophilen im beobachteten Zeitraum an. Hier bietet sich eine Korrelation der CRC mit klinisch erfassten Daten der Patienten an. Durch eine Verlängerung des Beobachtungszeitraums sollte auch über eine prognostische Wirksamkeit der CRC nachgedacht werden. Dies bietet viel Potential für weitere Arbeiten. Auch weitere Ursachen eines Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) wie Trauma oder große Operationen, welche ebenfalls mit einer Veränderung der Neutrophilen einhergehen [42, 47, 96], sollten ebenfalls mit Hilfe der CRC charakterisiert werden.

4.2.4. Vorteile und Einsatzmöglichkeiten der CRC

Durchflusszytometrie ist mittlerweile ein weit verbreitetes und etabliertes Verfahren. Vielen Kliniken oder deren Partnerlaboren steht derzeit schon ein Standartgerät zur Verfügung. Zudem ist das Verfahren im Vergleich zu anderen Analysemethoden kostengünstig. Durch kurze Inkubationszeiten und einfache Präparationsschritte sind die Ergebnisse der CRC zuverlässig in weniger als einer Stunde abrufbar.
Eine Standardisierung bei durchflusszytometrischen Messungen ist schwierig und stark vom Gerät und dessen individuellen Einstellungen abhängig [48]. Die Bildung eines Verhältnisses von zwei Messungen bietet daher den klaren Vorteil einer Standort und Geräte unabhängigen Methode. Die Berechnung der CRC mittels des MFI-Wertes eines definierten Oberflächenmarkers einer maximal stimulierten Probe geteilt durch dessen unstimulierte Expressionsrate überzeugt durch die einfache Durchführbarkeit. Das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren kommt schon mit geringen Blutmengen von 5 µl pro Probe aus und ermöglicht daher auch den Einsatz bei Neugeborenen und Kindern [59].
Durch die Ermittlung des Phänotyps der PMN erfasst die CRC den Status der Immunzellen zu Beginn der Signalkaskade und ist nicht auf nachgeschaltete Prozesse und Endprodukte angewiesen. In zukünftigen Arbeiten sollte das Prinzip

der CRC auch an weiteren Zellen der direkten Immunabwehr, wie beispielsweise Monozyten, untersucht werden.

4.3. Einschränkungen der Arbeit

Auf die Limitationen des humanen Vollblutmodells wurde bereits in Kapitel 4.1.1. eingegangen. An dieser Stelle sollten die eingesetzten *E. coli* Konzentrationen erwähnt werden. Auch wenn 10000 CFU/mL eine durchaus im Patienten gemessene Konzentration darstellen [2], sind die beiden höheren Konzentrationen nicht mehr von klinischer Relevanz. Daher hätte man weitere Abstufungen zwischen 2000, 4000 und 10000 CFU/mL in Betracht ziehen sollen. In der Realität sind Patienten mit noch geringeren *E. coli* Konzentrationen konfrontiert [103]. Gerade bei Bakteriämien mit geringen Mengen an Bakterien gestaltet sich die Diagnostik schwierig [44, 78, 111] und eine mögliche Überlegenheit der CRC in diesem Bereich sollte genauer exploriert werden.

Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Oberflächenproteine erwies sich im Nachgang als nur teilweise erfolgreich. Andere Arbeiten setzen in der Neutrophilenanalyse teils abweichende Schwerpunkte [98, 100]. Weitere Untersuchungen sollten über die ganze Breite an Oberflächenproteinen die für die CRC geeignetsten herausfiltern.

In welchem Umfang die CRC in den Laboralltag integriert werden kann, muss überprüft werden. Durchflusszytometrische Messungen sind in der Routine der Notaufnahmen und Intensivstationen derzeit noch nicht etabliert.

Auch wenn durch die Bildung eines Verhältnisses eine gewisse Standardisierung erreicht werden kann, müssen Zuverlässigkeit sowie einheitliche Referenzbereiche der CRC in Multi-Center Untersuchungen mit Geräten unterschiedlicher Hersteller überprüft werden, da in dieser Arbeit nur ein Gerät genutzt wurde. Außerdem sollten verschiedene Typen von Antikörpern gegen unterschiedliche Epitop der Antigene eingesetzt werden [93]. In dieser Arbeit wurde zur Antikoagulation der Patientenblutproben ausschließlich Citrat eingesetzt. Die Eignung hierfür wurde nicht getestet und es müssen in Folgestudien andere Antikoagulantien wie EDTA in Betracht gezogen werden [23].

Wie bereits erwähnt, war das Patientenkollektiv sehr selektiert. Die Diagnose Sepsis stand zum Zeitpunkt der Blutentnahme bereits fest. Ein Vorteil der CRC kann somit nicht bewiesen werden, da die üblichen Methoden zu diesem Zeitpunkt zur

Diagnosestellung ausreichend waren. Um die Überlegenheit der CRC gegenüber den herkömmlichen Markern (z.B. IL-6, CRP, PCT) bei der Diagnostik von Sepsis weiter zu verifizieren [5], sollte daher in Folgestudien die Blutentnahme vor klinisch sichtbarem Beginn der Sepsis erfolgen. Zudem sollten Folgestudien ihr Kollektiv breiter fassen, die Ausschlusskriterien lockern und eine Verblindung in Betracht ziehen.

4.4. Schlussfolgerung

Um das Überleben von Patienten mit Sepsis sicherzustellen ist eine frühe Diagnose und die daraus resultierende Therapieeinleitung von grundlegender Bedeutung [3, 52]. Die derzeitigen Standard-Biomarker IL-6, CRP und PCT, die in der klinischen Praxis bei der Diagnose von Infektionen und Sepsis zur Hilfe genommen werden, erweisen sich bei genauerer Betrachtung als unzuverlässig [11, 80, 85]. Die CRC bietet daher eine Möglichkeit die bestehende Bandbreite an Biomarkern zu ergänzen. Allein sowie in Kombination mit diesen, hat die CRC das Potential das diagnostische Spektrum zur Ermittlung der Aktivität und Kapazität der Zellen des Immunsystems zu erweitern.

Die CRC könnte zukünftig in der Lage sein, die zeitliche Lücke, welche aktuell bei der Diagnosestellung der Sepsis besteht, zu verkürzen und damit eine einfachere und sicherere Diagnose ermöglichen und somit den Sepsisverlauf zu monitoren.

5. Zusammenfassung

Sepsis ist eine lebensbedrohliche Erkrankung, welche durch die gestörte Reaktion des Immunsystems auf eine Infektion gekennzeichnet ist. Eine verspätete Diagnosestellung und damit verzögerte Therapieeinleitung führt häufig zu Organdysfunktion, septischem Schock und Tod der Patienten. Humoralen Entzündungsmarkern wie C-reaktives Protein, Procalcitonin und Interleukin-6 fehlt es hier an nötiger Sensitivität und Spezifität. Ein präzises Immunmonitoring dieser Patienten fehlt bisher in der klinischen Praxis. Diese Arbeit stellt mit der Zellulären Reaktionskapazität (CRC) neutrophiler Granulozyten ein neuartiges Verfahren vor, um den Status der Immunzellen zu ermitteln. Aus den Hypothesen der Arbeit ergibt sich, dass die Zelluläre Reaktionskapazität neutrophiler Granulozyten ein sensitiverer Parameter zur Erfassung einer experimentellen Bakteriämie ist und sich zum Immunmonitoring bei Patienten mit klinisch diagnostizierter Sepsis eignet.

Die Arbeit umfasste Blutproben gesunder Freiwilliger für ein ex-vivo Vollblutmodell zur Simulation einer Bakteriämie sowie Blutproben von Patienten mit Sepsis. Die Bakteriämie wurde durch fünf verschiedene Konzentrationen lebender *Escherichia coli* Bakterien erzeugt. Patienten mit klinisch diagnostizierter Sepsis wurde zu vier definierten Zeitpunkten Blut abgenommen und mit dem gesunder Probanden verglichen. Ein Teil dieses Blutes wurde vor der Analyse durch ein Stimulantiengemisch nachstimuliert. Mittels Durchflusszytometrie wurden Oberflächenproteine neutrophiler Granulozyten (CD10, CD11b, CD15, CD16, CD62L) mit und ohne Stimulation erfasst. Aus stimulierter und unstimulierter Probe wurde ein Verhältnis gebildet, die CRC. Die statistische Auswertung erfolgte durch ungepaarte t-Tests, Berechnung mittlerer effektiver Wirkkonzentrationen und der Effektstärken.

Das Bakteriämiemodell zeigte einen sepsisähnlichen Phänotyp der neutrophilen Granulozyten. Es fand sich ein *Escherichia. coli* konzentrationsabhängiger Abfall der CRC für die neutrophilen Oberflächenproteine CD10 und CD11b. Diese Oberflächenmarker erwiesen sich signifikant sensitiver zur Detektion der Bakteriämie als die herkömmlichen Marker Interleukin-6 und Interleukin-8.
Bei Patienten mit Sepsis konnten diese signifikanten Erniedrigungen der CRC im Vergleich zu gesunden Probanden für CD10 und CD11b ebenfalls beobachtet werden.

Das humane Vollblutmodell erwies sich als zuverlässige Plattform zur Simulation einer Bakteriämie. Die Zelluläre Reaktionskapazität war im experimentellen Ansatz den etablierten Inflammationsmarkern klar überlegen. Bei klinischer Sepsis gelang durch die CRC eine sichere Differenzierung von Kranken und Gesunden. Die Verhältnisbildung aus stimulierten und unstimulierten Zellen ermöglicht einen hohen Grad der Standardisierung. Zukünftig sollte in weiteren Studien die CRC an einem breiteren Patientenkollektiv bereits vor klinisch sichtbarem Beginn der Sepsis verifiziert werden, um diese als Immunmonitoring im klinischen Alltag zu etablieren.

6. Literaturverzeichnis

1. Arts DGT, de Keizer NF, Vroom MB, de Jonge E (2005) Reliability and accuracy of Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) scoring. Crit Care Med 33:1988–1993. doi: 10.1097/01.ccm.0000178178.02574.ab

2. Bacconi A, Richmond GS, Baroldi MA, Laffler TG, Blyn LB, Carolan HE, Frinder MR, Toleno DM, Metzgar D, Gutierrez JR, Massire C, Rounds M, Kennel NJ, Rothman RE, Peterson S, Carroll KC, Wakefield T, Ecker DJ, Sampath R (2014) Improved sensitivity for molecular detection of bacterial and candida infections in blood. Journal of clinical microbiology 52:3164–3174. doi: 10.1128/JCM.00801-14

3. Beck V, Chateau D, Bryson GL, Pisipati A, Zanotti S, Parrillo JE, Kumar A, Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock (CATSS) Database Research Group (2014) Timing of vasopressor initiation and mortality in septic shock: a cohort study. Crit Care 18:R97. doi: 10.1186/cc13868

4. Bernhard S, Hug S, Stratmann AEP, Erber M, Vidoni L, Knapp CL, Thomaß BD, Fauler M, Nilsson B, Nilsson Ekdahl K, Föhr K, Braun CK, Wohlgemuth L, Huber-Lang M, Messerer DAC (2021) Interleukin 8 Elicits Rapid Physiological Changes in Neutrophils That Are Altered by Inflammatory Conditions. J Innate Immun 13:225–241. doi: 10.1159/000514885

5. Bolanaki M, Möckel M, Winning J, Bauer M, Reinhart K, Stacke A, Hajdu P, Slagman A (2021) Diagnostic Performance of Procalcitonin for the Early Identification of Sepsis in Patients with Elevated qSOFA Score at Emergency Admission. J Clin Med 10:3869. doi: 10.3390/jcm10173869

6. Bongers SH, Chen N, van Grinsven E, van Staveren S, Hassani M, Spijkerman R, Hesselink L, Lo Tam Loi AT, van Aalst C, Leijte GP, Kox M, Pickkers P, Hietbrink F, Leenen LPH, Koenderman L, Vrisekoop N (2021) Kinetics of Neutrophil Subsets in Acute, Subacute, and Chronic Inflammation. Front Immunol 12:674079. doi: 10.3389/fimmu.2021.674079

7. Bonten M, Johnson JR, van den Biggelaar AHJ, Georgalis L, Geurtsen J, de Palacios PI, Gravenstein S, Verstraeten T, Hermans P, Poolman JT (2021) Epidemiology of Escherichia coli Bacteremia: A Systematic Literature Review. Clin Infect Dis 72:1211–1219. doi: 10.1093/cid/ciaa210

8. Bracht H, Hafner S, Weiß M (2019) [Sepsis Update: Definition and Epidemiology]. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 54:10–20. doi: 10.1055/a-0625-5492

9. Briassoulis G, Papassotiriou I, Mavrikiou M, Lazaropoulou C, Margeli A (2007) Longitudinal course and clinical significance of TGF-beta1, sL- and sE-Selectins and sICAM-1 levels during severe acute stress in children. Clin Biochem 40:299–304. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2006.11.015

10. Brunkhorst FM, Weigand MA, Pletz M, Gastmeier P, Lemmen SW, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weyland A, Marx G, Bucher M, Gerlach H, Salzberger

B, Grabein B, Welte T, Werdan K, Kluge S, Bone HG, Putensen C, Rossaint R, Quintel M, Spies C, Weiß B, John S, Oppert M, Jörres A, Brenner T, Elke G, Gründling M, Mayer K, Weimann A, Felbinger TW, Axer H, Deutsche Sepsis Gesellschaft e. V. (2020) [S3 Guideline Sepsis-prevention, diagnosis, therapy, and aftercare : Long version]. Med Klin Intensivmed Notfmed 115:37–109. doi: 10.1007/s00063-020-00685-0

11. Carcò D, Castorina P, Guardo P, Iachelli V, Pace T, Scirè P, Stanco R, Markovic U, Milone GA, Galbo F, Moschetti G, Martorana E (2022) Combination of Interleukin-6, C-Reactive Protein and Procalcitonin Values as Predictive Index of Sepsis in Course of Fever Episode in Adult Haematological Patients: Observational and Statistical Study. J Clin Med 11:6800. doi: 10.3390/jcm11226800

12. Cavaillon J, Singer M, Skirecki T (2020) Sepsis therapies: learning from 30 years of failure of translational research to propose new leads. EMBO Mol Med 12:e10128. doi: 10.15252/emmm.201810128

13. Cavaillon J-M (2018) Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. Toxicon 149:45–53. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.10.016

14. Chen DS, Mellman I (2017) Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. Nature 541:321–330. doi: 10.1038/nature21349

15. Chousterman BG, Swirski FK, Weber GF (2017) Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. Semin Immunopathol 39:517–528. doi: 10.1007/s00281-017-0639-8

16. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A (1992) Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. Blood 80:2012–2020

17. Combes RD, Balls M (2014) The Three Rs--opportunities for improving animal welfare and the quality of scientific research. Altern Lab Anim 42:245–259. doi: 10.1177/026119291404200406

18. Czaikoski PG, Mota JMSC, Nascimento DC, Sônego F, Castanheira FV e S, Melo PH, Scortegagna GT, Silva RL, Barroso-Sousa R, Souto FO, Pazin-Filho A, Figueiredo F, Alves-Filho JC, Cunha FQ (2016) Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis. PLoS One 11:e0148142. doi: 10.1371/journal.pone.0148142

19. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, Lamy M (1992) Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. Ann Surg 215:356–362

20. Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA (1976) Neutrophil kinetics in man. J Clin Invest 58:705–715. doi: 10.1172/JCI108517

21. Dela Cruz PTH, Davison D, Yamane DP, Chu E, Seneff M (2023) Increased Endotoxin Activity in COVID-19 Patients Admitted to the Intensive Care Unit. J Intensive Care Med 38:27–31. doi: 10.1177/08850666221121734

22. Delano MJ, Ward PA (2016) The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. Immunol Rev 274:330–353. doi: 10.1111/imr.12499

23. Diks AM, Bonroy C, Teodosio C, Groenland RJ, de Mooij B, de Maertelaere E, Neirynck J, Philippé J, Orfao A, van Dongen JJM, Berkowska MA (2019) Impact of blood storage and sample handling on quality of high dimensional flow cytometric data in multicenter clinical research. J Immunol Methods 475:112616. doi: 10.1016/j.jim.2019.06.007

24. Döhrmann S, Cole JN, Nizet V (2016) Conquering Neutrophils. PLoS Pathog 12:e1005682. doi: 10.1371/journal.ppat.1005682

25. Faure E, Equils O, Sieling PA, Thomas L, Zhang FX, Kirschning CJ, Polentarutti N, Muzio M, Arditi M (2000) Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. J Biol Chem 275:11058–11063. doi: 10.1074/jbc.275.15.11058

26. Ferri LE, Chia S, Benay C, Giannias B, Christou NV (2009) L-selectin shedding in sepsis limits leukocyte mediated microvascular injury at remote sites. Surgery 145:384–391. doi: 10.1016/j.surg.2008.12.011

27. Fortunati E, Kazemier KM, Grutters JC, Koenderman L, Van den Bosch van JMM (2009) Human neutrophils switch to an activated phenotype after homing to the lung irrespective of inflammatory disease. Clin Exp Immunol 155:559–566. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03791.x

28. Frommer A, Freidlin PJ, Heller ED, Bock RR, Drabkin N, Samberg Y (1990) Adherence-associated characteristics and pathogenicity of Escherichia coli from avian colibacillosis. Avian Pathol 19:547–554. doi: 10.1080/03079459008418707

29. Gadhoum SZ, Sackstein R (2008) CD15 expression in human myeloid cell differentiation is regulated by sialidase activity. Nat Chem Biol 4:751–757. doi: 10.1038/nchembio.116

30. Gasparoto TH, Dalboni TM, Amôr NG, Abe AE, Perri G, Lara VS, Vieira NA, Gasparoto CT, Campanelli AP (2021) Fcγ receptors on aging neutrophils. J Appl Oral Sci 29:e20200770. doi: 10.1590/1678-7757-2020-0770

31. Gogos C, Kotsaki A, Pelekanou A, Giannikopoulos G, Vaki I, Maravitsa P, Adamis S, Alexiou Z, Andrianopoulos G, Antonopoulou A, Athanassia S, Baziaka F, Charalambous A, Christodoulou S, Dimopoulou I, Floros I, Giannitsioti E, Gkanas P, Ioakeimidou A, Kanellakopoulou K, Karabela N, Karagianni V, Katsarolis I, Kontopithari G, Kopterides P, Koutelidakis I, Koutoukas P, Kranidioti H, Lignos M, Louis K, Lymberopoulou K, Mainas E, Marioli A, Massouras C, Mavrou I, Mpalla M, Michalia M, Mylona H, Mytas V, Papanikolaou I, Papanikolaou K, Patrani M, Perdios I, Plachouras D, Pistiki A, Protopapas K, Rigaki K, Sakka V, Sartzi M, Skouras V, Souli M, Spyridaki A, Strouvalis I, Tsaganos T, Zografos G, Mandragos K, Klouva-Molyvdas P, Maggina N, Giamarellou H, Armaganidis A, Giamarellos-Bourboulis EJ (2010)

Early alterations of the innate and adaptive immune statuses in sepsis according to the type of underlying infection. Crit Care 14:R96. doi: 10.1186/cc9031

32. Gordon S (2016) Phagocytosis: An Immunobiologic Process. Immunity 44:463–475. doi: 10.1016/j.immuni.2016.02.026

33. Gosling P, Dickson GR (1992) Serum c-reactive protein in patients with serious trauma. Injury 23:483–486. doi: 10.1016/0020-1383(92)90070-9

34. Gotts JE, Matthay MA (2016) Sepsis: pathophysiology and clinical management. BMJ 353:i1585. doi: 10.1136/bmj.i1585

35. Guo R-F, Sun L, Gao H, Shi KX, Rittirsch D, Sarma VJ, Zetoune FS, Ward PA (2006) In vivo regulation of neutrophil apoptosis by C5a during sepsis. J Leukoc Biol 80:1575–1583. doi: 10.1189/jlb.0106065

36. Hanna MOF, Abdelhameed AM, Abou-Elalla AA, Hassan RM, Kostandi I (2019) Neutrophil and monocyte receptor expression in patients with sepsis: implications for diagnosis and prognosis of sepsis. Pathog Dis 77:ftz055. doi: 10.1093/femspd/ftz055

37. Hietbrink F, Koenderman L, Althuizen M, Pillay J, Kamp V, Leenen LPH (2013) Kinetics of the innate immune response after trauma: implications for the development of late onset sepsis. Shock 40:21–27. doi: 10.1097/SHK.0b013e318295a40a

38. Hind LE, Vincent WJB, Huttenlocher A (2016) Leading from the Back: The Role of the Uropod in Neutrophil Polarization and Migration. Dev Cell 38:161–169. doi: 10.1016/j.devcel.2016.06.031

39. Hoover DB, Ozment TR, Wondergem R, Li C, Williams DL (2015) Impaired heart rate regulation and depression of cardiac chronotropic and dromotropic function in polymicrobial sepsis. Shock 43:185–191. doi: 10.1097/SHK.0000000000000272

40. Hortová-Kohoutková M, Tidu F, De Zuani M, Šrámek V, Helán M, Frič J (2020) Phagocytosis-Inflammation Crosstalk in Sepsis: New Avenues for Therapeutic Intervention. Shock 54:606–614. doi: 10.1097/SHK.0000000000001541

41. Hoser GA, Skirecki T, Złotorowicz M, Zielińska-Borkowska U, Kawiak J (2012) Absolute counts of peripheral blood leukocyte subpopulations in intraabdominal sepsis and pneumonia-derived sepsis: a pilot study. Folia Histochem Cytobiol 50:420–426. doi: 10.5603/19751

42. Huber-Lang M, Lambris JD, Ward PA (2018) Innate immune responses to trauma. Nat Immunol 19:327–341. doi: 10.1038/s41590-018-0064-8

43. Hug S, Bernhard S, Stratmann AEP, Erber M, Wohlgemuth L, Knapp CL, Bauer JM, Vidoni L, Fauler M, Föhr KJ, Radermacher P, Hoffmann A, Huber-Lang M, Messerer DAC (2021) Activation of Neutrophil Granulocytes by Platelet-

Activating Factor Is Impaired During Experimental Sepsis. Front Immunol 12:642867. doi: 10.3389/fimmu.2021.642867

44. Ibekwe AM, Grieve CM (2003) Detection and quantification of Escherichia coli O157:H7 in environmental samples by real-time PCR. J Appl Microbiol 94:421–431. doi: 10.1046/j.1365-2672.2003.01848.x

45. Iskander KN, Craciun FL, Stepien DM, Duffy ER, Kim J, Moitra R, Vaickus LJ, Osuchowski MF, Remick DG (2013) CECAL LIGATION AND PUNCTURE INDUCED MURINE SEPSIS DOES NOT CAUSE LUNG INJURY. Crit Care Med 41:154–165. doi: 10.1097/CCM.0b013e3182676322

46. Ivetic A, Hoskins Green HL, Hart SJ (2019) L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. Front Immunol 10:1068. doi: 10.3389/fimmu.2019.01068

47. Janicova A, Relja B (2021) Neutrophil Phenotypes and Functions in Trauma and Trauma-Related Sepsis. Shock 56:16–29. doi: 10.1097/SHK.0000000000001695

48. Kalina T (2020) Reproducibility of Flow Cytometry Through Standardization: Opportunities and Challenges. Cytometry A 97:137–147. doi: 10.1002/cyto.a.23901

49. Kaneko T, Stearns-Kurosawa DJ, Taylor F, Twigg M, Osaki K, Kinasewitz GT, Peer G, Kurosawa S (2003) Reduced neutrophil CD10 expression in nonhuman primates and humans after in vivo challenge with E. coli or lipopolysaccharide. Shock 20:130–137. doi: 10.1097/01.shk.0000068326.68761.34

50. Kellum JA, Ronco C (2023) The role of endotoxin in septic shock. Crit Care 27:400. doi: 10.1186/s13054-023-04690-5

51. Kolaczkowska E, Kubes P (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat Rev Immunol 13:159–175. doi: 10.1038/nri3399

52. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M (2006) Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. Crit Care Med 34:1589–1596. doi: 10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9

53. Kwok AJ, Allcock A, Ferreira RC, Cano-Gamez E, Smee M, Burnham KL, Zurke Y-X, Emergency Medicine Research Oxford (EMROx), McKechnie S, Mentzer AJ, Monaco C, Udalova IA, Hinds CJ, Todd JA, Davenport EE, Knight JC (2023) Neutrophils and emergency granulopoiesis drive immune suppression and an extreme response endotype during sepsis. Nat Immunol 24:767–779. doi: 10.1038/s41590-023-01490-5

54. Lakschevitz FS, Hassanpour S, Rubin A, Fine N, Sun C, Glogauer M (2016) Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation

using high-throughput screening flow cytometry. Exp Cell Res 342:200–209. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.03.007

55. Lamers C, Plüss CJ, Ricklin D (2021) The Promiscuous Profile of Complement Receptor 3 in Ligand Binding, Immune Modulation, and Pathophysiology. Front Immunol 12:662164. doi: 10.3389/fimmu.2021.662164

56. Lewis AJ, Yuan D, Zhang X, Angus DC, Rosengart MR, Seymour CW (2016) Use of Biotelemetry to Define Physiology-Based Deterioration Thresholds in a Murine Cecal Ligation and Puncture Model of Sepsis. Crit Care Med 44:e420-431. doi: 10.1097/CCM.0000000000001615

57. Liang L, Moore B, Soni A (2006) National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2017. In: Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs. Agency for Healthcare Research and Quality (US), Rockville (MD)

58. Liew PX, Kubes P (2019) The Neutrophil's Role During Health and Disease. Physiol Rev 99:1223–1248. doi: 10.1152/physrev.00012.2018

59. Lippi G, von Meyer A, Cadamuro J, Simundic A-M (2019) Blood sample quality. Diagnosis (Berl) 6:25–31. doi: 10.1515/dx-2018-0018

60. Liu M, Wang G, Wang L, Wang Y, Bian Y, Shi H, Liu J (2022) Immunoregulatory functions of mature CD10+ and immature CD10- neutrophils in sepsis patients. Front Med (Lausanne) 9:1100756. doi: 10.3389/fmed.2022.1100756

61. Lu B, Gerard NP, Kolakowski LF, Bozza M, Zurakowski D, Finco O, Carroll MC, Gerard C (1995) Neutral endopeptidase modulation of septic shock. J Exp Med 181:2271–2275. doi: 10.1084/jem.181.6.2271

62. Martens A, Eppink GJ, Woittiez AJ, Eidhof H, de Leij LF (1999) Neutrophil function capacity to express CD10 is decreased in patients with septic shock. Crit Care Med 27:549–553. doi: 10.1097/00003246-199903000-00034

63. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003) The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 348:1546–1554. doi: 10.1056/NEJMoa022139

64. Mebazaa A, Geven C, Hollinger A, Wittebole X, Chousterman BG, Blet A, Gayat E, Hartmann O, Scigalla P, Struck J, Bergmann A, Antonelli M, Beishuizen A, Constantin J-M, Damoisel C, Deye N, Di Somma S, Dugernier T, François B, Gaudry S, Huberlant V, Lascarrou J-B, Marx G, Mercier E, Oueslati H, Pickkers P, Sonneville R, Legrand M, Laterre P-F, AdrenOSS-1 study investigators (2018) Circulating adrenomedullin estimates survival and reversibility of organ failure in sepsis: the prospective observational multinational Adrenomedullin and Outcome in Sepsis and Septic Shock-1 (AdrenOSS-1) study. Crit Care 22:354. doi: 10.1186/s13054-018-2243-2

65. Medzhitov R (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature 449:819–826. doi: 10.1038/nature06246

66. Meisner M (1999) Procalcitonin: Erfahrungen mit einer neuen Meßgröße für bakterielle Infektionen und systemische Inflammation. LaboratoriumsMedizin / Journal of Laboratory Medicine 23:263–272. doi: 10.1515/labm.1999.23.5.263

67. Messerer DAC, Vidoni L, Erber M, Stratmann AEP, Bauer JM, Braun CK, Hug S, Adler A, Nilsson Ekdahl K, Nilsson B, Barth E, Radermacher P, Huber-Lang M (2020) Animal-Free Human Whole Blood Sepsis Model to Study Changes in Innate Immunity. Front Immunol 11:571992. doi: 10.3389/fimmu.2020.571992

68. Mohajeri MH, Brummer RJM, Rastall RA, Weersma RK, Harmsen HJM, Faas M, Eggersdorfer M (2018) The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications. Eur J Nutr 57:1–14. doi: 10.1007/s00394-018-1703-4

69. Molano Franco D, Arevalo-Rodriguez I, Roqué i Figuls M, Montero Oleas NG, Nuvials X, Zamora J (2019) Plasma interleukin-6 concentration for the diagnosis of sepsis in critically ill adults. Cochrane Database Syst Rev 2019:CD011811. doi: 10.1002/14651858.CD011811.pub2

70. Mortaz E, Alipoor SD, Adcock IM, Mumby S, Koenderman L (2018) Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. Front Immunol 9:2171. doi: 10.3389/fimmu.2018.02171

71. Mulet M, Osuna-Gómez R, Zamora C, Artesero I, Arús M, Vera-Artazcoz P, Cordón A, Vilalta N, San-José P, Abril A, Moliné A, Morán I, López-Contreras J, Vidal S (2023) Dysregulated neutrophil extracellular traps formation in sepsis. Immunology 170:374–387. doi: 10.1111/imm.13676

72. Muller Kobold AC, Zijlstra JG, Koene HR, de Haas M, Kallenberg CG, Tervaert JW (1998) Levels of soluble Fc gammaRIII correlate with disease severity in sepsis. Clin Exp Immunol 114:220–227. doi: 10.1046/j.1365-2249.1998.00727.x

73. Müller-Alouf H, Alouf JE, Gerlach D, Ozegowski JH, Fitting C, Cavaillon JM (1994) Comparative study of cytokine release by human peripheral blood mononuclear cells stimulated with Streptococcus pyogenes superantigenic erythrogenic toxins, heat-killed streptococci, and lipopolysaccharide. Infect Immun 62:4915–4921. doi: 10.1128/iai.62.11.4915-4921.1994

74. Nalivaeva N, Zhuravin I, Turner A (2020) Neprilysin expression and functions in development, ageing and disease. Mech Ageing Dev 192:111363. doi: 10.1016/j.mad.2020.111363

75. Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE, Parejo NA, Pribble JP, Lemke JH (1999) Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock. J Infect Dis 180:1584–1589. doi: 10.1086/315093

76. Osuchowski MF, Ayala A, Bahrami S, Bauer M, Boros M, Cavaillon J-M, Chaudry IH, Coopersmith CM, Deutschman C, Drechsler S, Efron P, Frostell C, Fritsch G, Gozdzik W, Hellman J, Huber-Lang M, Inoue S, Knapp S, Kozlov AV, Libert C, Marshall JC, Moldawer LL, Radermacher P, Redl H, Remick DG,

Singer M, Thiemermann C, Wang P, Wiersinga WJ, Xiao X, Zingarelli B (2018) Minimum quality threshold in pre-clinical sepsis studies (MQTiPSS): an international expert consensus initiative for improvement of animal modeling in sepsis. Intensive Care Med Exp 6:26. doi: 10.1186/s40635-018-0189-y

77. Parlato M, Philippart F, Rouquette A, Moucadel V, Puchois V, Blein S, Bedos J-P, Diehl J-L, Hamzaoui O, Annane D, Journois D, Ben Boutieb M, Estève L, Fitting C, Treluyer J-M, Pachot A, Adib-Conquy M, Cavaillon J-M, Misset B, Captain Study Group (2018) Circulating biomarkers may be unable to detect infection at the early phase of sepsis in ICU patients: the CAPTAIN prospective multicenter cohort study. Intensive Care Med 44:1061–1070. doi: 10.1007/s00134-018-5228-3

78. Pensupa N, Treebupachatsakul T, Lochotinunt C, Pechprasarn S (2021) Detection Limit of Surface Plasmon Resonance Sensor for Quantitative Foodborne E.coli Detection Using Effective Refractive Index Theory : The theoretical limit of E.coli detection of surface plasmon resonance. In: 2021 13th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON). pp 1–5

79. Perianayagam MC, Balakrishnan VS, Pereira BJG, Jaber BL (2004) C5a delays apoptosis of human neutrophils via an extracellular signal-regulated kinase and Bad-mediated signalling pathway. Eur J Clin Invest 34:50–56. doi: 10.1111/j.1365-2362.2004.01273.x

80. Pierrakos C, Velissaris D, Bisdorff M, Marshall JC, Vincent J-L (2020) Biomarkers of sepsis: time for a reappraisal. Crit Care 24:287. doi: 10.1186/s13054-020-02993-5

81. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers J-W, Ulfman LH, Leenen LP, Pickkers P, Koenderman L (2012) A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. J Clin Invest 122:327–336. doi: 10.1172/JCI57990

82. Plenge RM, Scolnick EM, Altshuler D (2013) Validating therapeutic targets through human genetics. Nat Rev Drug Discov 12:581–594. doi: 10.1038/nrd4051

83. Póvoa P (2002) C-reactive protein: a valuable marker of sepsis. Intensive Care Med 28:235–243. doi: 10.1007/s00134-002-1209-6

84. Prinyakupt J, Pluempitiwiriyawej C (2015) Segmentation of white blood cells and comparison of cell morphology by linear and naïve Bayes classifiers. Biomed Eng Online 14:63. doi: 10.1186/s12938-015-0037-1

85. Prucha M, Bellingan G, Zazula R (2015) Sepsis biomarkers. Clin Chim Acta 440:97–103. doi: 10.1016/j.cca.2014.11.012

86. Rathinam VAK, Zhao Y, Shao F (2019) Innate immunity to intracellular LPS. Nat Immunol 20:527–533. doi: 10.1038/s41590-019-0368-3

87. Reyes M, Filbin MR, Bhattacharyya RP, Billman K, Eisenhaure T, Hung DT, Levy BD, Baron RM, Blainey PC, Goldberg MB, Hacohen N (2020) An immune-

cell signature of bacterial sepsis. Nat Med 26:333–340. doi: 10.1038/s41591-020-0752-4

88. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kissoon N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado FR, Reinhart KK, Rowan K, Seymour CW, Watson RS, West TE, Marinho F, Hay SI, Lozano R, Lopez AD, Angus DC, Murray CJL, Naghavi M (2020) Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. Lancet 395:200–211. doi: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7

89. Schmidt T, Zündorf J, Grüger T, Brandenburg K, Reiners A-L, Zinserling J, Schnitzler N (2012) CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive stimulus. J Leukoc Biol 91:791–802. doi: 10.1189/jlb.0911483

90. Schmitt A, Guichard J, Massé JM, Debili N, Cramer EM (2001) Of mice and men: comparison of the ultrastructure of megakaryocytes and platelets. Exp Hematol 29:1295–1302. doi: 10.1016/s0301-472x(01)00733-0

91. Schmitz F, Mages J, Heit A, Lang R, Wagner H (2004) Transcriptional activation induced in macrophages by Toll-like receptor (TLR) ligands: from expression profiling to a model of TLR signaling. European Journal of Immunology 34:2863–2873. doi: 10.1002/eji.200425228

92. Seidelin JB, Nielsen OH, Strøm J (2002) Soluble L-selectin levels predict survival in sepsis. Intensive Care Med 28:1613–1618. doi: 10.1007/s00134-002-1501-5

93. Selliah N, Nash V, Eck S, Green C, Oldaker T, Stewart J, Vitaliti A, Litwin V (2023) Flow Cytometry Method Validation Protocols. Curr Protoc 3:e868. doi: 10.1002/cpz1.868

94. Shankar-Hari M, Datta D, Wilson J, Assi V, Stephen J, Weir CJ, Rennie J, Antonelli J, Bateman A, Felton JM, Warner N, Judge K, Keenan J, Wang A, Burpee T, Brown AK, Lewis SM, Mare T, Roy AI, Wright J, Hulme G, Dimmick I, Gray A, Rossi AG, Simpson AJ, Conway Morris A, Walsh TS (2018) Early PREdiction of sepsis using leukocyte surface biomarkers: the ExPRES-sepsis cohort study. Intensive Care Med 44:1836–1848. doi: 10.1007/s00134-018-5389-0

95. Siddall E, Khatri M, Radhakrishnan J (2017) Capillary leak syndrome: etiologies, pathophysiology, and management. Kidney Int 92:37–46. doi: 10.1016/j.kint.2016.11.029

96. Sikora JP, Karawani J, Sobczak J (2023) Neutrophils and the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Int J Mol Sci 24:13469. doi: 10.3390/ijms241713469

97. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent

J-L, Angus DC (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 315:801–810. doi: 10.1001/jama.2016.0287

98. Spijkerman R, Bongers SH, Bindels BJJ, Tinnevelt GH, Giustarini G, Jorritsma NKN, Buitenwerf W, van Spengler DEJ, Delemarre EM, Nierkens S, van Goor HMR, Jansen JJ, Vrisekoop N, Hietbrink F, Leenen LPH, Kaasjager KAH, Koenderman L, COVPACH study group (2021) Flow cytometric evaluation of the neutrophil compartment in COVID-19 at hospital presentation: A normal response to an abnormal situation. J Leukoc Biol 109:99–114. doi: 10.1002/JLB.5COVA0820-520RRR

99. Sriskandan S, Moyes D, Cohen J (1996) Detection of circulating bacterial superantigen and lymphotoxin-alpha in patients with streptococcal toxic-shock syndrome. Lancet 348:1315–1316. doi: 10.1016/s0140-6736(05)65800-x

100. van Staveren S, Ten Haaf T, Klöpping M, Hilvering B, Tinnevelt GH, de Ruiter K, Piacentini MF, Roelands B, Meeusen R, de Koning JJ, Jansen JJ, Vrisekoop N, Koenderman L (2018) Multi-dimensional flow cytometry analysis reveals increasing changes in the systemic neutrophil compartment during seven consecutive days of endurance exercise. PLoS One 13:e0206175. doi: 10.1371/journal.pone.0206175

101. Stratmann AEP, Wohlgemuth L, Erber ME, Bernhard S, Hug S, Fauler M, Vidoni L, Mohamed AOK, Thomaß BD, Münnich F, Stukan L, Föhr KJ, Mannes M, Huber-Lang MS, Messerer DAC (2021) Simultaneous Measurement of Changes in Neutrophil Granulocyte Membrane Potential, Intracellular pH, and Cell Size by Multiparametric Flow Cytometry. Biomedicines 9:1504. doi: 10.3390/biomedicines9111504

102. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T (2014) IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. Cold Spring Harb Perspect Biol 6:a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295

103. TEUNIS PFM, OGDEN ID, STRACHAN NJC (2008) Hierarchical dose response of E. coli O157:H7 from human outbreaks incorporating heterogeneity in exposure. Epidemiol Infect 136:761–770. doi: 10.1017/S0950268807008771

104. Tremblay J-A, Peron F, Kreitmann L, Textoris J, Brengel-Pesce K, Lukaszewicz A-C, Quemeneur L, Vedrine C, Tan LK, Venet F, Rimmele T, Monneret G, REALISM study group (2022) A stratification strategy to predict secondary infection in critical illness-induced immune dysfunction: the REALIST score. Ann Intensive Care 12:76. doi: 10.1186/s13613-022-01051-3

105. Tsalik EL, Jaggers LB, Glickman SW, Langley RJ, van Velkinburgh JC, Park LP, Fowler VG, Cairns CB, Kingsmore SF, Woods CW (2012) Discriminative value of inflammatory biomarkers for suspected sepsis. J Emerg Med 43:97–106. doi: 10.1016/j.jemermed.2011.05.072

106. Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F (2004) Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different

susceptibilities to infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Immunity 21:215–226. doi: 10.1016/j.immuni.2004.07.006

107. Uhle F, Lichtenstern C, Brenner T, Weigand MA (2015) Sepsis und Multiorganversagen – Pathophysiologie der Sepsis. Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 50:114–122. doi: 10.1055/s-0041-100391

108. Universitätsklinikum Ulm ZEKC Leistungsverzeichnis Interleukin 6 FB-PÄ 6 IL6 OE https://www.uniklinik-ulm.de/fileadmin/default/09_Sonstige/Klinische-Chemie/Seiteninhalte/Seiteninhalte_I/Interleukin_6_FB-PAE_6_IL6_OE.pdf Abgerufen am 17.11.2023

109. Venturi GM, Tu L, Kadono T, Khan AI, Fujimoto Y, Oshel P, Bock CB, Miller AS, Albrecht RM, Kubes P, Steeber DA, Tedder TF (2003) Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. Immunity 19:713–724. doi: 10.1016/s1074-7613(03)00295-4

110. Videm V (1996) Heparin in clinical doses “primes” granulocytes to subsequent activation as measured by myeloperoxidase release. Scand J Immunol 43:385–390. doi: 10.1046/j.1365-3083.1996.d01-57.x

111. Vogel SJ, Tank M, Goodyear N (2014) Variation in detection limits between bacterial growth phases and precision of an ATP bioluminescence system. Lett Appl Microbiol 58:370–375. doi: 10.1111/lam.12199

112. van Wessem KJP, Heeres M, Leliefeld PHC, Koenderman L, Leenen LPH (2013) Lipopolysaccharide and hemorrhagic shock cause systemic inflammation by different mechanisms. J Trauma Acute Care Surg 74:37–43; discussion 43-44. doi: 10.1097/TA.0b013e3182789489

113. Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB (2016) Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. Annu Rev Biochem 85:765–792. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014442

114. Wohlgemuth L, Stratmann AEP, Münnich F, Bernhard S, Thomaß BD, Münnich F, Mohamed AOK, Mannes M, Schmidt CQ, Nilsson Ekdahl K, Nilsson B, Fauler M, Föhr KJ, Huber-Lang M, Messerer DAC (2022) Modulation of Neutrophil Activity by Soluble Complement Cleavage Products-An In-Depth Analysis. Cells 11:3297. doi: 10.3390/cells11203297

115. World Health Organization (2010) WHO guidelines on drawing blood: best practices in phlebotomy

116. Zhang H, Zhou Y, Qu M, Yu Y, Chen Z, Zhu S, Guo K, Chen W, Miao C (2021) Tissue Factor-Enriched Neutrophil Extracellular Traps Promote Immunothrombosis and Disease Progression in Sepsis-Induced Lung Injury. Front Cell Infect Microbiol 11:677902. doi: 10.3389/fcimb.2021.677902

117. Zolfaghari PS, Pinto BB, Dyson A, Singer M (2013) The metabolic phenotype of rodent sepsis: cause for concern? Intensive Care Med Exp 1:25. doi: 10.1186/2197-425X-1-6

7. Danksagung

Die Danksagung wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.

8. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus Gründen des Datenschutzes entfernt.