

Aus der Abteilung für Anästhesiologie der Universität Ulm
Ärztlicher Direktor Prof. M. Georgieff

Induzierbare Sauerstoffradikalbildung von neutrophilen
Granulozyten bei Patienten während und nach einem
septischen Schock – Assoziation mit der durch
Annexin V erfaßten Apoptose.

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

von Markus Kredel
aus Ulm

2001

Amtierender Dekan: Prof. Dr. R. Marre

1.Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Weiß

2.Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Siech

Tag der Promotion: 16.05.2002

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. Septischer Schock	1
1.2. Neutrophile Granulozyten im SIRS und in der Sepsis	1
1.3. Oxidativer Burst der neutrophilen Granulozyten	2
1.4. Apoptose der neutrophilen Granulozyten	3
1.5. Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche als Apoptosemarker	4
1.6. Fragestellungen	5
2. MATERIAL UND METHODEN	6
2.1. Patienten	6
2.2. Kontrollgruppe	10
2.3. Verwendete Materialien und Geräte	11
2.4. Nachweis von Phosphatidylserin auf Granulozyten mittels Annexin V	14
2.5. Bestimmung des oxidativen Burst von Granulozyten	15
2.6. Durchflußzytometrische Analysen	16
2.7. Definitionen für die weitere Auswertung	24
2.8. Statistische Auswertungen	25
3. ERGEBNISSE	26
3.1. Vorversuche	26
3.2. Oxidativer Burst der Granulozyten während und nach einem septischen Schock	29
3.3. Anteil schwach Sauerstoffradikale bildender Granulozyten und Assoziation zu dem Anteil Annexin V-positiver Granulozyten	45
3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	48
4. DISKUSSION	49
4.1. Methoden	49
4.2. Oxidativer Burst von Granulozyten während und nach einer Sepsis oder einem septischen Schock	55
4.3. Apoptose und oxidativer Burst von neutrophilen Granulozyten	62
4.4. Schlußfolgerungen	63

5. ZUSAMMENFASSUNG	64
6. ANHANG	65
6.1. Einstellungen am Durchflußzytometer	65
6.2. Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) Score	66

Abkürzungsverzeichnis

ARDS	„Adult respiratory distress syndrome“: Schocklunge
BSA	„Bovine serum albumin“: Rinderserumalbumin
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CARS	„Compensatory anti-inflammatory response syndrome“
CD	Cluster of differentiation
COPD	„Chronic obstructive pulmonary disease“: Chronisch-obstruktive Lungenerkrankung
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz (Bereich einer Lichtverstärkerröhre)
fMLP	<i>N</i> -formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
G-CSF	„Granulocyte-colony stimulating factor“: Granulozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor
GM-CSF	„Granulocyte-macrophage colony stimulating factor“: Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Faktor
<i>H. influenzae</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
HBSS	„Hanks' balanced salt solution“: Salzlösung
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure
IL	Interleukin
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
LPS	Lipopolysaccharide
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>

NADPH-Oxidase	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
P _a CO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
P _a O ₂	Sauerstoffpartialdruck
PBS	„Phosphate buffered saline“: physiologischer Phosphatpuffer
PS	Phosphatidylserin
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMN	„Polymorphonuclear neutrophil granulocytes“: polymorphkernige neutrophile Granulozyten
R 123	Rhodamin 123
SIRS	„Systemic inflammatory response syndrome“: systemische Entzündungsreaktion
SOFA-Score	„Sepsis-related organ failure assessment score“
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

1. Einleitung

1.1. Septischer Schock

Der septische Schock ist eine systemische Entzündungsreaktion, das „**Systemic inflammatory response syndrome (SIRS)**“, auf eine Infektion verbunden mit Organfunktionsstörungen und Schock [2]. Der septische Schock ist nach wie vor mit einer hohen Letalität verbunden. Sie wird für Patienten auf chirurgischen Intensivstationen zwischen 40 % und 72 % angegeben [59]. Der septische Schock wird vermittelt durch Lipopolysaccharide (LPS) enthaltende Endotoxine gramnegativer Bakterien oder über Exotoxine, Peptidoglykan und Lipoteichonsäure, die sich auch bei grampositiven Erregern finden [91]. Bakterientoxine regen Monozyten zur Produktion der Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1beta (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6) an [18, 48]. Bakterielle Toxine, TNF und IL-1 β lösen unter anderem in Gefäßendothelzellen eine vermehrte Synthese von Stickoxid aus, welches bei der Vasodilatation im septischen Schock eine wesentliche Rolle zu spielen scheint [13].

Um die zu Beginn vorherrschende überschießende Immunantwort zu begrenzen, werden im weiteren Verlauf der Erkrankung entzündungshemmende Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13, „Transforming growth factor- β “ und Rezeptorantagonisten entzündungsverstärkender Zytokine produziert. Die Produktion entzündungshemmender Stoffe kann sich selbst regulieren. Überwiegt aber diese kompensatorische entzündungshemmende Immunantwort spricht man vom „**Compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS)**“, das mit einer Anergie gegenüber vorhandenen Keimen und einer erhöhten Anfälligkeit für sekundäre Infektionen verbunden ist [8].

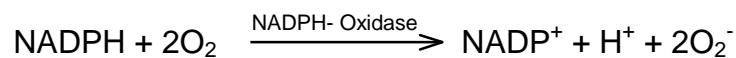
1.2. Neutrophile Granulozyten im SIRS und in der Sepsis

Bei der Abwehr gegen eine drohende oder bestehende Infektion sollen die neutrophilen Granulozyten, auch **polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)** genannt, eine ausreichende Fähigkeit besitzen Bakterien und Pilze zu bekämpfen. Bei Patienten mit einem SIRS oder einer **Sepsis** – ein SIRS als Antwort auf eine Infektion – kann bei neutrophilen Granulozyten die Chemotaxis [61], Adhärenz [67], Phagozytose und die

Bekämpfung der Keime mit **Sauerstoffradikalen** [88], der sogenannte **oxidative Burst**, reduziert sein. Andererseits soll die unkontrollierte Freisetzung von Sauerstoffradikalen außerhalb der Zelle vermieden werden, weil sie Proteaseinhibitoren inaktivieren und gewebsschädliche Proteasen wie Elastase und Kollagenase aktivieren [86]. Das SIRS und das sich im Verlauf entwickelnde Multiorganversagen zeichnen sich durch eine Ansammlung neutrophiler Granulozyten in ansonsten gesunden Organen aus, fern der eigentlichen Läsion [25]. Auch an der Pathogenese des „Adult respiratory distress syndrome (ARDS)“ sind Sauerstoffradikale der Granulozyten beteiligt [4, 86].

1.3. Oxidativer Burst der neutrophilen Granulozyten

Sauerstoffradikale werden von neutrophilen Granulozyten entweder nach äußerer Aktivierung über die Zellmembran oder nach Phagozytose von Keimen in das Phagosom freigesetzt. Durch die membrangebundene **Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidase** [15] werden zunächst **Hyperoxid-Anionen (O_2^-)** gebildet [4]:



Hyperoxid-Anionen reagieren in wässriger Lösung mit sich selbst und es entsteht spontan **Wasserstoffperoxid (H_2O_2)**. Aus beiden Stoffen entstehen in der Zelle dann weitere reaktive Sauerstoffmetaboliten. Eine hohe Mikrobizidie weisen vor allem die aus O_2^- und H_2O_2 entstehenden **Hydroxylradikale ($OH\cdot$)** und die Produkte der in den Azurgranula lokalisierten **Myeloperoxidase** auf. Diese oxidiert Halogene wie Chlor, aus dem **hypochlorige Säure (HOCl)** entsteht. Aus HOCl können **Chloramine (R-NHCl)** entstehen, von denen vor allem die lipophilen Verbindungen besonders toxisch für biologische Membranen sind [4].

Eine starke Stimulation der neutrophilen Granulozyten, wie Phagozytose von Bakterien [88], opsonisierten Partikeln sowie die experimentelle Aktivierung der Proteinkinase C durch Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) [60], führt bei einem Großteil der Granulozyten zu einem oxidativen Burst. Die Einwirkung von LPS gramnegativer Bakterien [23], „Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)“ oder „Granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)“ [34] steigert die Sauerstoffradikalbildung auf solche Stimulanzen. Dagegen führt der von Bakterien produzierte chemotaktische Faktor *N-*

formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) bei Granulozyten Gesunder nur zu einer schwachen Anregung der Sauerstoffradikalbildung [16]. Lipopolysaccharide [23] und entzündungsverstärkende Zytokine wie TNF- α [16, 66], GM-CSF, IL-8 [16] und „Platelet aggregating factor“ [74] können den oxidativen Burst auf fMLP verstärken. Auch Lipopolysaccharide selbst können die Produktion von Sauerstoffradikalen stimulieren, TNF verstärkt diese Reaktion [31]. Die Voraktivierung der Granulozyten, welche eine stärkere Reaktion auf eine weitere Stimulation hervorruft, wird „**Priming**“ genannt und fördert den oxidativen Burst insbesondere bei einer Zellsubpopulation [16]. Dabei exprimieren die Granulozyten auf ihrer Zelloberfläche vermehrt Rezeptoren für die Stimulanzen [16, 31, 66].

Neutrophile Granulozyten verweilen im peripheren Blut gesunder Menschen nur wenige Stunden. Die Regulation der Zahl dieser Zellen im Blut ist neben der Proliferation aus den Knochenmarkzellen abhängig vom natürlichen Zelltod, der **Apoptose** [44], wodurch die Funktionstüchtigkeit der Granulozyten beeinflusst werden könnte.

1.4. Apoptose der neutrophilen Granulozyten

Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose ein aktiver Prozeß der Zelle und vermittelt unter anderem die Zellmauserung in einigen gesunden Geweben. Ein von der Zelle selbst ausgehendes oder von außen einwirkendes Signal löst den Apoptoseprozeß und damit den aktiven Abbau der Zellstrukturen durch die Zelle selbst aus [93]. Im Vergleich zu den frisch aus dem Knochenmark freigesetzten Zellen zeigt ein größerer Anteil der in der Zirkulation gealterten neutrophilen Granulozyten Zeichen der Apoptose [44]. Der spontane Apoptoseprozeß der Granulozyten kann durch entzündungsverstärkende Mediatoren wie G-CSF [14, 95], GM-CSF, TNF, IL-1 β , IL-6, Interferon- γ [14], IL-2 [53] und durch bakterielle Produkte wie LPS [14, 95] verzögert werden. Hypoxie vermindert die Apoptoserate bei neutrophilen Granulozyten im Gegensatz zu anderen Zellen [27]. Bei Patienten mit ARDS wurde die Bedeutung von G-CSF und GM-CSF für den niedrigen Anteil apoptotischer Granulozyten in der bronchoalveoläre Lavage nachgewiesen [45].

Die Apoptose ist ein Mechanismus mit dem in einen Entzündungsort ausgewanderte neutrophile Granulozyten wieder entfernt werden. Dabei werden apoptotische neutrophile Granulozyten von Makrophagen phagozytiert, ohne daß es zu einer wesentlichen Freisetzung von gewebsschädlichen Bestandteilen der Granulozyten [58] oder von

Entzündungsmediatoren durch die Makrophagen selbst kommt [46]. Für die Vermeidung einer entzündlichen Antwort der Makrophagen scheint die Art der Erkennung der apoptotischen Zellen verantwortlich zu sein [46].

1.5. Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche als Apoptosemarker

In den frühen Stadien der Apoptose ändert sich die Phospholipidverteilung innerhalb der Zellmembran. **Phosphatidylserin (PS)** wird normalerweise asymmetrisch nur auf der inneren, zytoplasmatischen Seite der Membran gehalten, in der Apoptose erscheint es zusätzlich auf der Zellmembranaußenseite [42, 75]. Entzündliche Makrophagen von Mäusen erkannten apoptotische Leukozyten [20, 21], darunter menschliche Granulozyten [20], vor der Phagozytose spezifisch über PS auf der Zellmembran. Menschliche, aus Blutmonozyten gereifte Makrophagen erkannten im Experiment die apoptotischen Zellen dagegen nicht an PS, sondern über den Vitronektin-Rezeptor [20].

Der Vitronektin-Rezeptor, das „ $\alpha_v\beta_3$ Integrin“, bildet zusammen mit CD36 auf der Zellmembran der Makrophagen einen Rezeptorkomplex, der über das von den Makrophagen gebildete Thrombospondin als „molekulare Brücke“ an eine noch nicht bekannte Struktur auf apoptotischen neutrophilen Granulozyten bindet [57]. Kürzlich gelang es menschliche Makrophagen dazu zu stimulieren, PS für die Erkennung apoptotischer Granulozyten zu nutzen [22]. Der Phosphatidylserin-Rezeptor wurde noch nicht identifiziert, jedoch soll CD36 auf den Makrophagen auch an der Erkennung von PS beteiligt sein [22]. Das gerinnungshemmende Protein **Annexin V** bindet in Gegenwart von Calcium-Ionen an Phospholipid-Doppelmembranen, bevorzugt an solche mit hohem Phosphatidylserin-Anteil [3], und eignet sich somit als Test zur Erkennung apoptotischer neutrophiler Granulozyten [30].

1.6. Fragestellungen

Das menschliche Immunsystem kann auf eine Infektion mit Bakterien oder Pilzen zunächst mit der überwiegenden Produktion entzündungsverstärkender Mediatoren reagieren, worauf eine Phase mit einem Vorherrschen einer Entzündungshemmung folgen kann [8]. Da bei neutrophilen Granulozyten die Apoptose [14, 53, 95] und der oxidative Burst [16, 31, 34] durch Entzündungsmediatoren reguliert wird, könnten sich diese Funktionen im Verlauf eines septischen Schocks verändern.

In bisherigen Studien, die sich mit dem oxidativen Burst bei Patienten mit Sepsis und septischem Schock beschäftigt haben [69, 77], wurde die Bildung von Sauerstoffradikalen nur an wenigen, nicht genau bestimmten Zeitpunkten nach Beginn des septischen Schocks untersucht. Ausgespart blieb der zeitliche Verlauf im septischen Schock sowie die getrennte Betrachtung der Phase in welcher der septische Schock überwunden wurde und damit das Verhalten der Granulozytenfunktion in dieser Krankheitsphase.

Bei neutrophilen Granulozyten, die spontan nach Kultivierung eine apoptotische Morphologie aufwiesen, war die induzierbare Sauerstoffradikalbildung reduziert [90]. Es ist aber noch nicht geklärt, ob bei Granulozyten aus dem peripheren Blut die Fähigkeit zum oxidativen Burst bereits in frühen Apoptosestadien bei mit Annexin V auf der Zellmembran nachgewiesener Exposition von Phosphatidylserin eingeschränkt ist. Eine in der Sepsis durch Entzündungsmediatoren modulierte spontane Apoptose neutrophiler Granulozyten könnte daher den oxidativen Burst beeinflussen. Es sollten daher in der vorliegenden Arbeit bei Patienten auf der Intensivstation mit septischem Schock die Granulozyten täglich im peripheren Blut untersucht werden, um folgende Fragen zu klären:

- Wie ändert sich der mit dem chemotaktischen Peptid fMLP oder opsonierten *E. coli*-Bakterien induzierbare oxidative Burst der Granulozyten während und nach einem septischen Schock?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen einem erkennbaren Anteil von Granulozyten ohne oder mit reduziertem oxidativen Burst nach Phagozytose von opsonierten *E. coli*-Bakterien und dem Anteil Annexin V-positiver Granulozyten?

2. Material und Methoden

2.1. Patienten

2.1.1. Definitionen für die klinische Zuordnung der Patienten

Die klinischen Daten der Patienten auf der Intensivstation wurden mit einem computergestützten Erfassungssystem gesammelt. Anhand der in **Tabelle 1** dargestellten Kriterien wurden die Tage erfaßt, an denen bei den Patienten ein septischer Schock bestand. Die Bedingungen wurden abgeleitet von den in der Konsensuskonferenz des „American College of Chest Physicians“ gemeinsam mit der „Society of Critical Care“ [2] herausgegebenen Definitionen. Berücksichtigt wurden jeweils alle Werte im Zeitraum von 3.00 Uhr morgens bis zur selben Zeit des nächsten Tages. Der Ausgangswert umfaßte nur die Zeit einer eventuellen Operation oder einer Notfallbehandlung vor der Aufnahme und die erste Stunde auf der Intensivstation.

Quellen der klinischen Daten

Abteilung Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Instituts für Mikrobiologie und Immunologie der Universitätsklinik Ulm:

→ mikrobiologischer Nachweis von Infektionserregern

Abteilung Klinische Chemie der Universitätsklinik Ulm, Zentrallabor Safranberg:

→ Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Kreatinin,
Aspartataminotransferase (AST), Bilirubin

Blutgasanalysegerät „Nova“ auf der Intensivstation:

→ arteriell: Sauerstoffpartialdruck (P_aO_2), Kohlendioxidpartialdruck (P_aCO_2),
Blut-pH, Laktat

Alle anderen Daten stammten aus den routinemäßigen Messungen und validierten Aufzeichnungen der Pflegekräfte und Ärzte auf der Intensivstation.

Tabelle 1: Kriterien für SIRS, Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock

Mikrobiologisch nachgewiesene Infektion mit Bakterien, Pilzen oder Bakteriämie <u>oder</u> ein klinisch gesicherter Infektionsherd	
Nachweis einer systemischen Entzündungsreaktion (mindestens zwei der Punkte mußten erfüllt sein)	→ SIRS
Hyperthermie oder Hypothermie	maximale Körpertemperatur > 38 °C <u>oder</u> minimale Körpertemperatur < 36 °C
Tachykardie	maximale Herzfrequenz > 90/min
Tachypnoe	maximale Atemfrequenz > 20/min <u>oder</u> minimaler arterieller P _a CO ₂ < 32 mmHg <u>oder</u> künstliche Beatmung
Leukozytose oder Leukopenie	maximale Leukozytenzahl > 12 G/l <u>oder</u> minimale Leukozytenzahl < 4 G/l
Infektion + SIRS	→ Sepsis
+ Zeichen eines Organversagens: (mindestens ein Punkt mußte erfüllt sein)	→ schwere Sepsis
Laktatazidose	minimaler Blut-pH < 7,35 <u>und</u> maximales Laktat > 2 mmol/l
Nierenversagen	Urinausscheidung < 500 ml/24h <u>oder</u> maximales Kreatinin >= 171 µmol/l <u>oder</u> Hämodiafiltration bei Niereninsuffizienz
Lungenversagen	minimaler Quotient: arterieller Sauerstoffpartialdruck (P _a O ₂) / inspiratorische Sauerstofffraktion (FiO ₂) < 200 <u>oder</u> maximaler positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) > 10 cmH ₂ O
Leberversagen	maximales Bilirubin >= 33 µmol/l <u>oder</u> maximale Aspartataminotransferase (AST) >= 25 U/l
Thrombozytopenie	minimale Thrombozytenzahl < 50 G/l
+ Zeichen des Schocks	→ septischer Schock
Hypotension	systolischer Blutdruck anhaltend < 90 mmHg trotz adäquater Volumensubstitution <u>oder</u> kontinuierliche Gabe eines oder mehrerer vasoaktiver Medikamente (Spritzenpumpe), außer sie wurden im Rahmen einer anderen Indikation als Schock verabreicht (z.B. erhöhter intrakranieller Druck): - Dopamin >= 5 µg/kg•min - Adrenalin (jede Dosis) - Noradrenalin (jede Dosis)

2.1.2. Aufgenommene Patienten

Es wurden Patienten in die Studie eingeschlossen, die innerhalb des Zeitraums von einem halben Jahr auf die anästhesiologische Intensivstation des Universitätsklinikums Ulm – Klinik Safranberg aufgenommen wurden. Dabei wurden Patienten ausgewählt, bei denen aufgrund einer Operation, eines Traumas oder einer bestehenden Infektion ein hohe Wahrscheinlichkeit bestand, daß sich ein septischer Schock entwickeln könnte. Daneben wurden Patienten aufgenommen, die zu dieser Zeit bereits einen septischen Schock hatten. Die erwartete Verweildauer auf der Station sollte mindestens drei Tage betragen. Patienten, die bereits in andere Studien eingeschlossen waren beziehungsweise immunmodulatorische Zytokine oder zytostatische Medikamente erhielten, wurden ausgeschlossen. Bedingung für den Einschluß der Patienten in die Studie war ein Lebensalter von mindestens 18 Jahren und das Vorhandensein eines klinisch erforderlichen Arterienverweilkatheters zur blutigen Blutdruckmessung und Gewinnung von Proben für die Blutgasanalysen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Ulm genehmigt. Insgesamt wurden 31 Patienten, die diese Bedingungen erfüllten, in die Studie aufgenommen. Die Bedingung für die weitere Auswertung der Patienten war ein septischer Schock über mindestens drei aufeinanderfolgende Tage bei einer Infektion mit Bakterien oder Pilzen.

Es erfüllten 17 der 31 in die Studie aufgenommenen Patienten die geforderten Kriterien. Im Verlauf des Aufenthaltes verstarben 4 dieser Patienten auf der Intensivstation. In **Tabelle 2** sind die Patienten mit ihren klinischen Angaben dargestellt. Von den 17 Patienten waren 6 weiblich und 11 männlich. Sie hatten im Median ein Alter von 58 Jahren (28 – 78 Jahre). Zur Beschreibung der Schwere der Organfunktionsstörungen wurde eine modifizierte Form des „**Sepsis-related organ failure assessment (SOFA)**“-Score [78] verwendet (siehe **Tabelle 12** im Anhang). Der Unterschied zum originalen SOFA-Score bestand, aufgrund der Schwierigkeit bei sedierten Patienten auf den neurologischen Zustand zu schließen, im Verzicht auf die „Glasgow-Komaskala (GCS)“ als Parameter. In fünf Organsystemen konnten jeweils bis zu 4 Punkte vergeben werden und damit zusammen im ungünstigsten Fall maximal 20 Punkte erreicht werden. Der SOFA-Score betrug bei Aufnahme auf die Intensivstation im Median 10 Punkte (Bereich: 5 – 15). Der im Verlauf des Aufenthaltes an einem Tag maximal erreichte Wert lag bei 13 Punkten (11 – 16) und ist von jedem Patienten in **Tabelle 2** mit dargestellt.

Tabelle 2: Ausgewertete Patienten

Patient Nr. (Geschlecht)	Alter Jahre	Haupterkrankung	Nachgewiesene Keime	SOFA-Score	Liege- tage
1 (m)	68	Z.n. Resektion Bronchialkarzinom, Pleuraempyem, Pneumonie	MRSA, <i>Candida species</i>	16	51
2 (w)	66	infizierte nekrotisierende Pankreatitis	<i>E. faecium</i> , vergrünende Streptokokken	11	19
3 (m)	36	Polytrauma: Lungengerißung, stumpfes Abdominaltrauma, epidurales Hämatom; ARDS	<i>E. faecalis</i> , MRSA	14	37 †
4 (m)	61	Z.n. Resektion Kolonkarzinom; Leberzirrhose, Pneumonie	MRSA	14	7 †
5 (w)	47	arterielle Verschlusskrankheit, Wundinfekt nach femoropoplitealer Bypass-Operation; Erysipel	KNS, MRSA	11	17
6 (m)	71	Z.n. Resektion Bronchialkarzinom; Pneumonie	<i>C. albicans</i>	11	20
7 (m)	71	Polytrauma: Lungen-/Herzkontusion, instabile Rippenserienfraktur; Pneumonie	<i>Enterobacter species</i> , <i>C. albicans</i> , <i>A. baumannii</i>	15	38
8 (m)	44	Polytrauma: Lungenkontusion, Milz-/Leberruptur, Beckenfraktur; Pneumonie; ARDS	<i>H. influenzae</i> , <i>C. albicans</i>	12	20
9 (m)	28	pseudomembranöse Colitis; Pneumonie	<i>E. coli</i>	12	33
10 (m)	46	akute Cholezystitis, Peritonitis	<i>E. coli</i>	13	16
11 (w)	57	Z.n. Resektion Ösophaguskarzinom; Pneumonie	MRSA, <i>E. faecalis</i>	13	61
12 (w)	71	Z.n. Resektion Ösophaguskarzinom; Pneumonie	<i>E. coli</i> , <i>Enterobacter species</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>C. albicans</i>	13	35
13 (w)	78	perforierte Appendizitis	-	16	3 †
14 (w)	58	infizierte nekrotisierende Pankreatitis	<i>P. aeruginosa</i>	12	49
15 (m)	46	infizierte nekrotisierende Pankreatitis	vergrünende Streptokokken, <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	12	6
16 (m)	36	Tumorrevision: Z.n. Hodenkarzinom/ -seminom; Darmperforation	<i>E. faecium</i>	15	42
17 (w)	72	Adnexkarzinom mit Darmperforation	<i>Enterobacter species</i> , <i>Proteus species</i> , <i>P. aeruginosa</i>	13	10 †

Nur wesentliche Haupterkrankungen und nachgewiesene Keime sind angegeben. ARDS: „Adult respiratory distress syndrome“; KNS: Koagulase-negative Staphylokokken; MRSA: Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*; SOFA-Score: im Verlauf maximal erreichter Wert im „Sepsis-related organ failure assessment“-Score; Liegetage: Tage, die der Patient auf der anästhesiologischen Intensivstation verbracht hat; † : Patient ist verstorben.

Von den 17 Patienten waren 5 bereits in der Studie, bevor erstmals ein septischer Schock auftrat. Weitere 5 Patienten wurden an dem Tag in die Studie aufgenommen, an dem sich der septische Schock erstmalig zeigte. Alle 13 überlebenden Patienten hatten bei der Entlassung von der Intensivstation nach den Kriterien (Tabelle 1) zumindest noch eine Sepsis oder ein SIRS. Keiner der Patienten wurde am Ende dieses Aufenthalts in einem kritischen Zustand auf eine andere Intensivstation verlegt. Die Patienten erhielten zur Kreislaufstabilisierung während des septischen Schocks vor allem Dopamin, Noradrenalin, seltener Adrenalin oder Dobutamin. Zur Sedierung und Analgesie wurden am häufigsten Propofol oder Midazolam zusammen mit Fentanyl oder Piritramid verwendet.

Die Blutproben für die Messung des oxidativen Burst und der Apoptose von Granulozyten wurden jeden Morgen im Rahmen klinisch indizierter Blutentnahmen mittels Lithium-Heparin-S-Monovetten (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) aus dem arteriellen Kathetersystem gewonnen. Die Blutentnahmen erfolgten täglich bis der Patient die Intensivstation verließ, verstarb oder das arterielle Kathetersystem entfernt wurde.

2.2. Kontrollgruppe

Zehn gesunde Freiwillige im Alter von 22 – 50 Jahren (Median 24), von denen sechs weiblich und vier männlich waren, dienten zur Bestimmung von Normalwerten. Durch periphere Venenpunktion wurden Blutproben mit Lithium-Heparin-S-Monovetten (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) entnommen. Die Bestimmung des oxidativen Burst und der Apoptose von Granulozyten erfolgte bei den Normalspendern unter denselben Bedingungen wie für die Patienten. Um Einflüsse unterschiedlich langer Lagerungszeiten der Blutproben bis zum Beginn der Verarbeitung auf die Ergebnisse zu minimieren wurden die Tests in derselben Reihenfolge durchgeführt wie bei den Patienten.

2.3. Verwendete Materialien und Geräte

2.3.1. Geräte

- Durchflußzytometer** „EPICS XL“
(Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
- Wird betrieben mit den vorgeschriebenen Spül- und Reinigungsflüssigkeiten. Die verwendeten Einstellungen der Sensoren sind im Anhang angegeben (S.65, Kapitel 6.1: Einstellungen am Durchflußzytometer).
- Lyseautomat** „Multi-Q-Prep“
(Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland)
- Wird betrieben mit den vorgeschriebenen Reagenzien „ImmunoPrep“ A, B und C zur Lyse der Erythrozyten in hypotoner Lösung mit Formylsäure (1,2 ml/l), Stabilisierung der Leukozyten in Na_2CO_3 (6,0 g/l), NaCl (14,5 g/l), Na_2SO_4 (31,3 g/ml) und Fixierung der Zellmembranen mit Paraformaldehyd (1 %).
- Pipetten** „Reference“ (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
für Kunststoffpipettenspitzen, verstellbar
- Schüttelwasserbad** „GFL 1083“ (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland)
beheizt, thermostatreguliert
- Vortex-Mischer** „MS 1“ (IKA Works, Wilmington, NC, USA)
- Zentrifuge** „Megafuge 1.0 R“ (Heraeus, Hanau, Deutschland)
gekühlt, thermostatreguliert

2.3.2. Software

Die vom Durchflußzytometer gewonnenen Streulicht- und Fluoreszenzsignale wurden mit dem Programm „EXPO“, Version 1.0 (Applied Cytometry Systems, Sheffield, England) erfaßt und analysiert. Die ausgewerteten Daten wurden mit dem Datenbankprogramm „Access 97“ (Microsoft) gespeichert, verarbeitet und mit dem Tabellenkalkulationsprogramm „Excel 97“ (Microsoft) graphisch ausgewertet. Das

Programm „Statistika für Windows“, Version 5.1 (StatSoft GmbH, Hamburg, Deutschland) diente zur Erstellung von statistischen Analysen und Graphiken mit Boxplots oder Histogrammen.

2.3.3. Verbrauchsmaterialien

Kunststoff-Pipettenspitzen	„PLASTIBRAND“ (Brand GmbH, Wertheim, Deutschland)
Polypropylen-Reagenzröhrchen 4 ml	(Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)
Polystyrol-Reagenzröhrchen 4 ml	(Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)

2.3.4. Substanzen

Aqua dest.	(Delta Pharma/Boehringer Ingelheim, Deutschland)
PBS	(Life Technologies, Paisley, Schottland) „Phosphate buffered saline“: physiologischer Phosphatpuffer
HBSS	(Life Technologies, Paisley, Schottland) „Hanks' balanced salt solution“: Salzlösung
HEPES 1 M	(Life Technologies, Paisley, Schottland) N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
Annexin V-FITC	„Annexin V-FLUOS“ (Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) rekombinant hergestelltes Protein Annexin V, mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) konjugiert – Herstellung einer Annexin V-FITC-Markierungslösung mit 20 µl „Annexin V-FLUOS“ in 1 ml Lösung aus HBSS mit 1 % HEPES 1 M
Propidiumiodid	(Sigma, Steinheim, Deutschland)
BSA-Fraktion V	(Merck, Darmstadt, Deutschland) „Bovine serum albumin“ (Rinderserumalbumin).

Testkit „BURSTTEST“ (ORPEGEN Pharma, Heidelberg, Deutschl.):

Waschlösung

„WASHING SOLUTION“

„SALTS for WASHING SOLUTION“ aufgelöst in 1000 ml Aqua dest.

opsonisierte *E. coli*-Suspension

mit gemischtem humanem Serum opsonisierte und mit Formaldehyd stabilisierte *E. coli*-Bakterien (1×10^9 Bakterien pro ml)

N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP)

Herstellung einer **fMLP-Lösung** ($5 \mu\text{M}$) durch Verdünnen der fMLP-200 x Stammlösung (1 mM) auf 1:200 in **WASCHLÖSUNG**.

Dihydrorhodamin 123

Inkubation einer Substratscheibe („SUBSTRATE DISK“) in 1 ml **WASCHLÖSUNG** für 30 min bei Raumtemperatur zur Herstellung von 1 ml **Dihydrorhodamin (DHR) 123-Lösung** (*Die Konzentration der erhaltenen Lösung wird vom Hersteller nicht angegeben*).

Lysereagenz

„LYSING SOLUTION“

Herstellen einer 1:10 Lösung „LYSING SOLUTION“ mit „10 x LYSING SOLUTION“ (*Die Zusammensetzung wird vom Hersteller nicht angegeben*) mit Aqua dest. zur hypotonen Lyse der Erythrozyten.

2.3.5.Lagerung

Die opsonisierten *E. coli*-Bakterien und die vorbereiteten Reagenzien **WASCHLÖSUNG** und **LYSING SOLUTION** lagerten bis zur Verwendung in Glasgefäßen im Kühlschrank bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Die **fMLP-Lösung**, **DHR 123-Lösung** und die **Annexin V-FITC-Markierungslösung** wurden jeweils in Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aufgeteilt und bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren. Vor der Verwendung wurden die Lösungen bei Raumtemperatur aufgetaut.

2.4. Nachweis von Phosphatidylserin auf Granulozyten mittels Annexin V

2.4.1. Testprinzip

Zum Nachweis der Exposition von Phosphatidylserin auf der Zellmembran apoptotischer Zellen wurde mit dem fluoreszierenden Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gekoppeltes Annexin V in Verbindung mit dem Zelltodmarker Propidiumiodid (PI) verwendet [76]. Propidiumiodid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der durch die permeabel gewordene Zellmembran nekrotischer Zellen eindringen kann und mit der DNA im Zellkern interkaliert [96]. Dadurch können rein apoptotische Zellen (Annexin V-positiv / PI-negativ) von bereits nekrotischen Zellen (Annexin V-positiv / PI-positiv) unterschieden werden.

2.4.2. Durchführung

Nach Entnahme der Blutproben aller Patienten wurde ohne zwischenzeitliche Lagerung nach den erforderlichen Vorbereitungen zunächst mit dem Testansatz zum Nachweis von PS mit Annexin V begonnen.

- ⇒ Vom heparinisierten Vollblut jedes Patienten wurden je 50 µl in zwei Polystyrol-Reagenzröhrchen pipettiert und dann jeweils 50 µl PBS zugegeben. Nach dem Mischen im Vortex-Mischer wurden die Zellsuspensionen im **COULTER Multi-Q-Prep** behandelt und dabei die Erythrozyten lysiert.
- ⇒ Die Zellen wurden zweimal, jeweils durch Mischen mit einer Lösung aus 2 ml HBSS mit 0,1 % BSA, Zentrifugieren des Gemisches bei 200 • g für 4 Minuten bei 23 °C und anschließendem Dekantieren des Überstandes gewaschen.
- ⇒ In jeweils eines der beiden Röhrchen wurde hinzugefügt:
 - 50 µl HBSS mit 0,1 % BSA in den Kontrollansatz
 - 50 µl **Annexin V-FITC-Markierungslösung** in den PositivansatzAnschließend wurde durchmischt und für 10-15 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß inkubiert.
- ⇒ Direkt anschließend wurden jeweils 30 µl **PI-Lösung** (25 µg/ml) und 200 – 400 µl HBSS mit 0,1 % BSA zugegeben. Nach dem Mischen wurden die Messungen am Durchflußzytometer unverzüglich begonnen und dabei mindestens 50 000 Ereignisse pro Probe erfaßt.

2.5. Bestimmung des oxidativen Burst von Granulozyten

2.5.1. Testprinzip

Die während der Phagozytose oder nach äußerer Stimulation entstehenden Sauerstoffradikale oxidieren nicht fluoreszierendes Dihydrorhodamin 123 (DHR 123). Das entstehende fluoreszierende Rhodamin 123 (R 123) kann dann quantitativ mittels Durchflußzytometrie in den Zellen nachgewiesen werden. Damit ist es möglich die Höhe der mittleren Aktivität der Sauerstoffradikalbildung und den prozentualen Anteil der mit einem oxidativen Burst reagierenden Granulozyten zu bestimmen [17]. Außerdem ist das Verfahren geeignet, um Subpopulationen von Leukozyten mit unterschiedlich starker Produktion an Sauerstoffradikalen zu differenzieren [60]. Verwendet wurden zur Stimulation der Granulozyten opsonisierte *E. coli*-Bakterien zur Anregung einer starken Sauerstoffradikalbildung nach Phagozytose und das chemotaktische Peptid fMLP zum Nachweis einer Voraktivierung („Priming“) der Granulozyten durch entzündungsverstärkende Einflüsse *in vivo*.

2.5.2. Durchführung

Mit der Verarbeitung der Blutproben zur Bestimmung des oxidativen Burst wurde im Anschluß oder noch während des Tests zur Bestimmung von PS mittels Annexin V begonnen.

- ⇒ Falls in der Routinelaboruntersuchung vom selben Morgen die Leukozytenzahl des Patienten 10 000/ μ l überschritten hatte, wurde das heparinisierte Vollblut mit PBS verdünnt, um eine Leukozytenzahl von ca. 10 000/ μ l in der Zellsuspension zu erreichen.
- ⇒ Von der Zellsuspension wurden jeweils 50 μ l in drei Polypropylen-Reagenzröhrchen pipettiert. Die Reagenzröhrchen wurden für 10 Minuten in einem Eiswasserbad inkubiert, um vergleichbare Ausgangsbedingungen für die folgende Stimulation des oxidativen Burst zu erzielen.
- ⇒ In jeweils eines der Röhrchen wurden hineinpipettiert:
 - 10 μ l **WASCHLÖSUNG** (Kontrollansatz)
 - 10 μ l **fMLP-Lösung** (5 μ M)
 - 10 μ l **opsonisierte *E. coli* Suspension** (10^9 /ml)

Das entspricht einer Konzentration an fMLP von 0,833 μM und einem Verhältnis *E. coli* zu Leukozyten von mindestens 20:1 im Ansatz. Nach dem Mixen im Vortex-Mischer wurden die Röhren für 10 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad inkubiert.

- ⇒ Anschließend erfolgte die Zugabe von 10 μl **DHR 123-Lösung** in jedes Röhren. Nach dem Mischen wurde erneut für 10 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.
- ⇒ Danach wurden durch Zugabe von 2 ml der 4 °C kalten **LYSING SOLUTION** die Erythrozyten zerstört und die Reaktion gestoppt. Nach dem Durchmischen wurden die Proben bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert.
- ⇒ Nach der Inkubation wurden die Proben bei 250 • g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und anschließend der Überstand dekantiert. Die Zellen wurden durch Mischen mit 3 ml **WASCHLÖSUNG** und erneutem Zentrifugieren gewaschen.
- ⇒ Nach dem Dekantieren wurde das Leukozytenpellet in jedem Röhren durch Mischen mit 300 μl PBS wieder in Suspension gebracht. Die Analyse am Durchflußzytometer wurde innerhalb von 30 Minuten durchgeführt. Mindestens 10 000 Ereignisse pro Probe wurden erfaßt.

2.6. Durchflußzytometrische Analysen

2.6.1. Prinzip der Durchflußzytometrie

Mit einem Durchflußzytometer können große Mengen von freien Einzelzellen in kurzer Zeit auf ihre relative Zellgröße, innere Komplexität und auf die Lichtemission mit der Zelle verbundener fluoreszierender Farbstoffe untersucht werden. Die in einem Probenröhren enthaltene Zellsuspension wird durch Überdruck der Durchflußzelle zugeführt und tritt über eine Düse in einen Hüllstrom aus Spülflüssigkeit ein. Die Zellen werden durch die hohe Fließgeschwindigkeit des Hüllstroms in der Mitte des Flüssigkeitsstrahls hintereinander aufgereiht, dies wird als „hydrodynamische Fokussierung“ bezeichnet. In diesem Strahl passieren die aufgereihten Zellen im Zentrum der Durchflußzelle einzeln den Fokus eines monochromatischen Lasers.

Die Zellen streuen das Licht und fluoreszierende Farbstoffe, die entweder auf der Oberfläche oder im Inneren der Zelle lokalisiert sind, werden zum Leuchten angeregt. Das benutzte Gerät verwendet dafür einen Argon-Ionen-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm. Verschiedene Lichtverstärkerröhren erfassen die Lichtemission der angestrahnten

Zellen und verstärken die Signale entweder linear oder logarithmisch. Das durch die Durchflußzelle geleitete Vorwärtsstreulicht (Durchlicht) wird vom „Forward Scatter“ und das Seitwärtsstreulicht vom im 90°-Winkel angeordneten „Side Scatter“ erfaßt. Daneben gibt es bis zu vier Lichtsensoren (FL1-4), die über verschiedene Filter nur das Licht eines bestimmten Wellenlängenbereichs aufnehmen (**Abb. 1**).

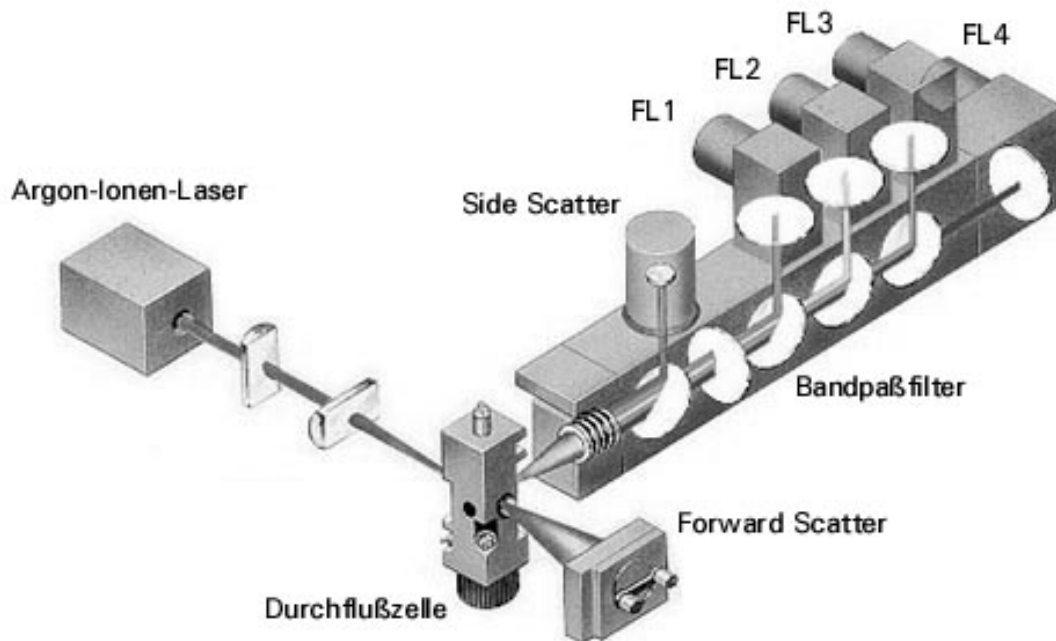


Abb. 1: Prinzipieller Aufbau des COULTER „EPICS XL“ Durchflußzytometers (Quelle: Beckman Coulter - modifiziert)

Die grobe morphologische Unterscheidung der durch das Laserlicht geführten Zellen erfolgt durch deren unterschiedliche Lichtstreuung. Das Seitwärtsstreulicht ermöglicht eine Aussage über die Innenstrukturen der Zelle. Intrazellulär stark granulierte Zellen, wie die neutrophilen Granulozyten, weisen eine verstärkte Streuung des Lichtes zur Seite auf. Das Vorwärtsstreulicht gibt ein Maß für die Größe der Zellen. Größere Zellen lassen mehr Licht nach vorne durch. Sollen Leukozyten differenziert werden, ist durch gemeinsame Auswertung des Vorwärts- und des Seitwärtsstreulichtes in einer Zwei-Parameter-Darstellung eine Unterscheidung in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten möglich (**Abb. 2**). Ereignisse mit sehr geringer Größe sind Zelltrümmer oder sonstige Artefakte und werden nicht erfaßt falls ihr Vorwärtsstreulicht im „Forward Scatter“ unter einem eingestellten Wert („Discriminator“) liegt. Durch die verschiedenen Fluoreszenzdetektoren (FL1-4) ist es möglich, die charakteristische Lichtemission verschiedener Farbstoffe auf oder in einer Zelle gleichzeitig und voneinander unabhängig

zu messen. Dazu müssen alle verwendeten Farbstoffe im selben monochromatischen Licht des Lasers fluoreszieren und dabei eine möglichst geringe Überschneidung ihrer Emissionsspektren aufweisen.

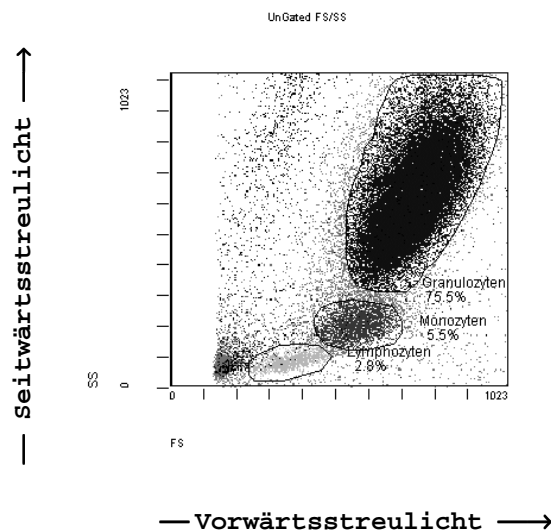


Abb. 2: Differenzierung der Leukozyten nach ihren Streulichteigenschaften in Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (Beispiel aus dem Test mit Annexin V). Es werden nur die Ereignisse verwertet, die einen bestimmten Wert im „Forward Scatter“ überschreiten („Discriminator“). Dargestellt: Alle erfaßten Ereignisse; lineare Signalverstärkung.

Der Auswertungscomputer speichert pro Messansatz die gemessene Fluoreszenz und Lichtstreuung jedes einzelnen Ereignisses, in der Regel einer Zelle, in einer Datei. Dadurch ist es möglich nach Beendigung der Messungen eine Auswertung der Daten ohne Informationsverlust durchzuführen. Das Analyseprogramm stellt die Ereignisse hinsichtlich eines Parameters entweder als Häufigkeitsverteilung in einem Histogramm oder die Verknüpfung zweier Variablen als Zwei-Parameter-Darstellung dar. Durch die Verwendung von „Gates“ können dann aus der Menge der dargestellten Zellen die auszuwertenden Zellpopulationen eingegrenzt und auf ihre Fluoreszenzeigenschaften hin untersucht werden. Zusätzlich können die Zellen im „Gate“ in einem neuen Histogramm mit anderen Parametern dargestellt und weiter analysiert werden.

Die Justierung der Streulicht- und der Fluoreszenzmessung des Durchflußzytometers wurde täglich vor der Verwendung mit „Flow-Check Fluorospheres“ (Coulter) überprüft. Bei Unregelmäßigkeiten wurde die Wartung veranlaßt.

2.6.2. Annexin V

Es wurde nur der Positivansatz weiter analysiert. Der Kontrollansatz ohne Annexin V-FLUOS enthielt nur die Eigenfluoreszenz der Zellen und diente zu Vergleichszwecken. Der in der Wellenlänge 505 nm bis 545 nm (grün) empfindliche Sensor (FL1) des Durchflußzytometers reagierte auf die Lichtemission von fluoreszierendem FITC, das bei 525 nm maximal emittiert. Das Licht von fluoreszierendem PI bei 590 nm bis 700 nm erfaßte der Signalaufnehmer (FL4), der im Bereich zwischen 660 nm und 700 nm (rot) empfindlich ist.

Die Leukozyten wurden wie in Abb. 2 (S. 18) nach ihrem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht unterschieden. Die stark mit PI markierten **Toten Zellen** wurden von den lebenden Zellen nach Auftragen des Seitwärtsstreulichtes gegenüber der PI-Markierung in FL4 unterschieden (**Abb. 3**). Die in den *Toten Zellen* enthaltenen nekrotischen Granulozyten wurden in der weiteren Auswertung nicht mehr berücksichtigt. Sie wurden über eine logische Verknüpfung aus der Menge der Granulozyten ausgeschlossen, um die Menge der *Granulozyten ohne tote Zellen* zu definieren. Die Färbung mit Annexin V-FITC auf den Granulozyten ohne PI-positive *Tote Zellen* wurde dann in einem eigenen Histogramm logarithmisch gegenüber der Häufigkeit aufgetragen (**Abb. 4**). Die Grenze zwischen den Annexin V-positiven und negativen Zellen wurde im Histogramm der *Granulozyten ohne tote Zellen* in das „Tal“ zwischen den beiden abgrenzbaren Populationen gelegt (Abb. 4). Der **prozentuale Anteil** der Annexin V-positiven Granulozyten wurde zur weiteren Auswertung verwendet. Falls eine zweite Population nicht zu differenzieren war, wurde die Grenze im Histogramm rechts neben die einzige Population gesetzt.

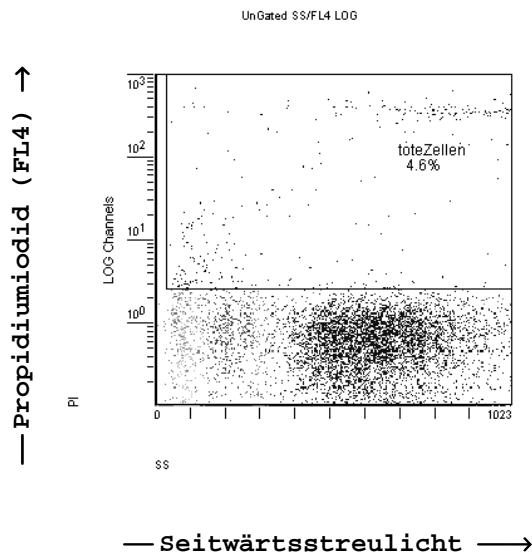


Abb. 3: Ausschließen der mit Propidiumiodid markierten *Toten Zellen* für die Bestimmung des Anteils Annexin V-positiver Zellen. Dargestellt: Alle erfaßten Ereignisse; Abszisse: Seitwärtsstreulicht (linear), Ordinate: Fluoreszenzfärbung mit PI (logarithmisch).

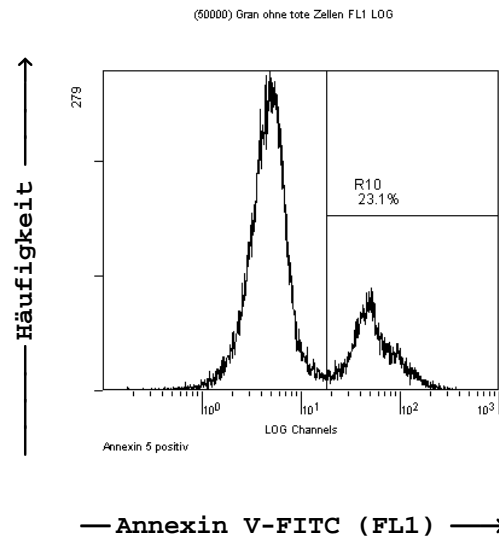


Abb. 4: Bestimmung des Anteils Annexin V-positiver Granulozyten (R10) aus der Menge der Granulozyten ohne die PI-positiven *Toten Zellen*. Dargestellt: *Granulozyten ohne tote Zellen*; Abszisse: Fluoreszenzfärbung mit Annexin V-FITC (logarithmisch), Ordinate: Häufigkeit der Ereignisse (Zellzahl).

2.6.3. Oxidativer Burst

Die Lichtemission des bei 500 nm bis 530 nm fluoreszierenden Rhodamin 123 wurde in dem im Wellenlängenbereich zwischen 505 nm und 545 nm (grün) empfindlichen Sensor des Durchflußzytometers (FL1) gemessen. Die Unterscheidung der Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten erfolgte nach ihrem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht wie in Abb. 2 (S. 18). Nach Stimulation der Meßansätze können sich die Streulichteigenschaften der Granulozyten gegenüber dem Kontrollansatz verändern. Um dennoch alle Zellen zu erfassen, wurde das „Gate“ der Granulozyten entsprechend angepaßt. Nicht eingeschlossen wurden jedoch separate Populationen von Ereignissen in der Streulichtdarstellung, die ein erheblich gesteigertes Vorwärts- und/oder Seitwärtsstreulicht aufwiesen. Diese Ereignisse wurden als Aggregate mehrerer aktivierter Granulozyten angesehen. Als einzelne Ereignisse erfaßte Zellaggregate könnten – im Vergleich zu Einzelzellen – durch die größere Menge an Fluoreszenzfarbstoff zur Messung zu hoher Fluoreszenzsignale führen. Von den Populationen der Leukozyten wurde die

logarithmisch verstärkte Fluoreszenz von Rhodamin 123 jeweils in Histogrammen dargestellt. Monozyten und Lymphozyten wurden zur Kontrolle mituntersucht.

Stimulation mit fMLP:

Zur Untersuchung des oxidativen Burst auf Stimulation mit dem chemotaktischen Peptid fMLP wurde im Histogramm des Kontrollansatzes mit unstimulierten Granulozyten „Gates“ gesetzt. Das eine „Gate“ beinhaltete die Ereignisse in der Kontrollpopulation, das andere die übrigen, stärker mit Rhodamin 123 markierten Zellen („R6“ und „R7“ in **Abb. 5 A**). Bei der Auswertung des entsprechenden mit fMLP stimulierten Ansatzes, wurde die Stellung dieser „Gates“ nicht verändert. Zellen, die innerhalb des „Gates“ der stärker mit Rhodamin 123 markierten Granulozyten fielen, wurden als Sauerstoffradikale bildende Granulozyten auf Stimulation mit fMLP angesehen („R7“ in **Abb. 5 B**). Der **prozentuale Anteil** von Granulozyten mit einem oxidativen Burst auf fMLP wurde in der Auswertung benutzt.

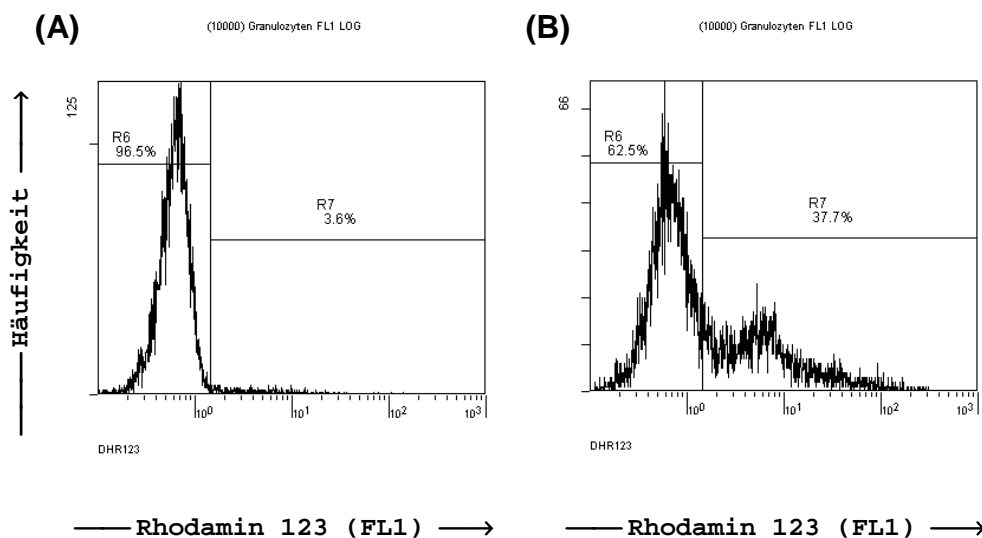


Abb. 5: Bestimmung des Anteils Sauerstoffradikale bildender Granulozyten auf Stimulation mit fMLP: **A)** Kontrollansatz: Setzen der „Gates“ „R6“ und „R7“; **B)** Mit fMLP stimulierter Ansatz: Sauerstoffradikale bildende Zellen fallen ins „Gate“ „R7“. **A) und B)** Dargestellt: Granulozyten; Abszisse: Fluoreszenzfärbung (logarithmisch), Ordinate: Häufigkeit der Ereignisse (Zellzahl).

Stimulation mit *E. coli*:

Die mit *E. coli* stimulierten Ansätze wurden unabhängig vom Kontrollansatz ausgewertet. Es wurde nach der gemessenen Fluoreszenz von Rhodamin 123 zwischen einer eingeschränkt oder nicht funktionsfähigen **schwach-aktiven** Granulozytenpopulation und

einer funktionsfähigen Hauptpopulation, der *aktiven* Granulozytenpopulation, unterschieden. Waren diese beiden Populationen zu differenzieren, wurde die mit Rhodamin 123 stark markierte Granulozytenpopulation einschließlich sämtlicher Granulozyten mit stärkerer Markierung bis zum rechten Rand des Histogramms als *aktive* Granulozytenpopulation eingegrenzt („2Pop“ in **Abb. 6**). Als *schwach-aktive* Granulozyten wurden alle übrigen Zellen mit schwächerer Markierung bis zum linken Rand des Histogramms angesehen („1Pop“ in **Abb. 6**). Innerhalb beider Bereiche, die sich nicht überschneiden sollten, wurden sämtliche Ereignisse im Histogramm erfasst. Ausgewertet wurde jeweils bei beiden differenzierten Granulozytensubpopulationen der **prozentuale Anteil** und die Burstaktivität als **dimensionslose mittlere Intensität [X-Mean]**. Zusätzlich wurde die mittlere Aktivität aller Granulozyten erfasst.

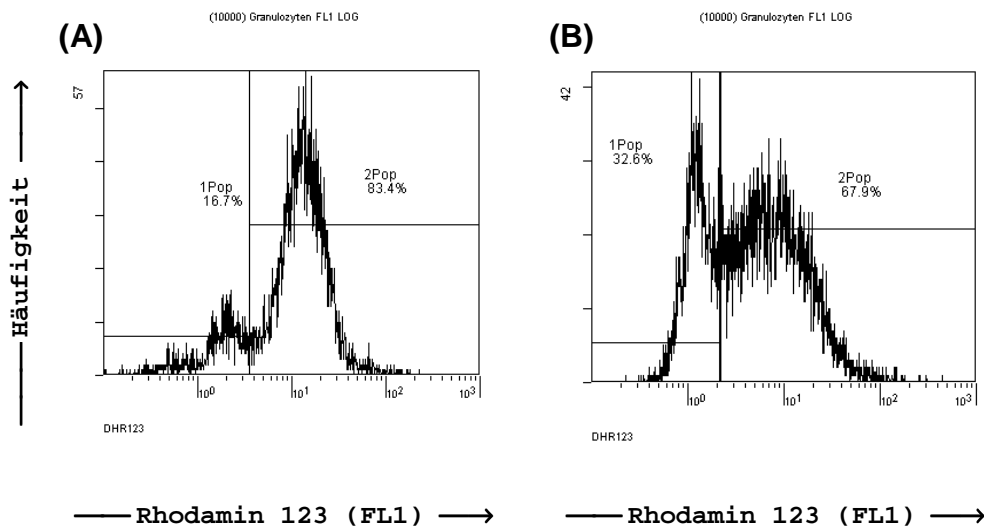


Abb. 6: Differenzierung der *aktiv* („2Pop“) und der *schwach-aktiv* („1Pop“) Sauerstoffradikale bildenden Granulozyten nach Stimulation mit *E. coli*, Beispiele **A**) und **B**) Dargestellt: Granulozyten; Abszisse: Fluoreszenzfärbung (logarithmisch), Ordinate: Häufigkeit der Ereignisse (Zellzahl).

War nur eine Population deutlich abzugrenzen, wurde diese als die *aktive* Granulozytenpopulation angenommen. Die Trennung zwischen *schwach-aktiver* und *aktiver* Population wurde dann im Histogramm zwischen dem linken Ende der einzigen Population und den restlichen, schwächer gefärbten Zellen vorgenommen (**Abb. 7**). Gelegentlich konnte eine dritte, stärker aktive Granulozytenpopulation auftreten, wie sie für Patienten mit Bakteriämie [5] oder ARDS [12] berichtet wurde. Diese Zellen besaßen eine höhere Intensität der Markierung mit R 123 als die angenommene Hauptpopulation und wurden noch der *aktiven* Granulozytenpopulation zugerechnet (**Abb. 8**).

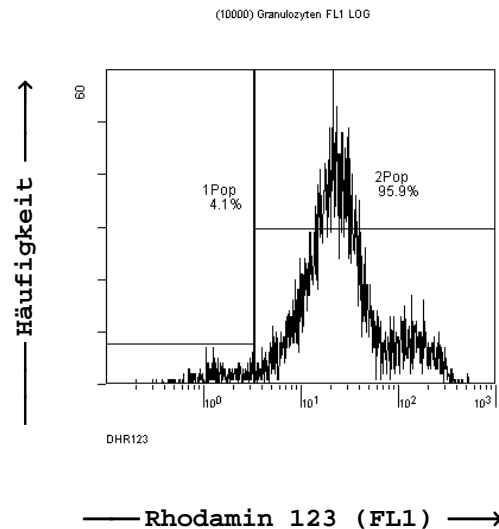
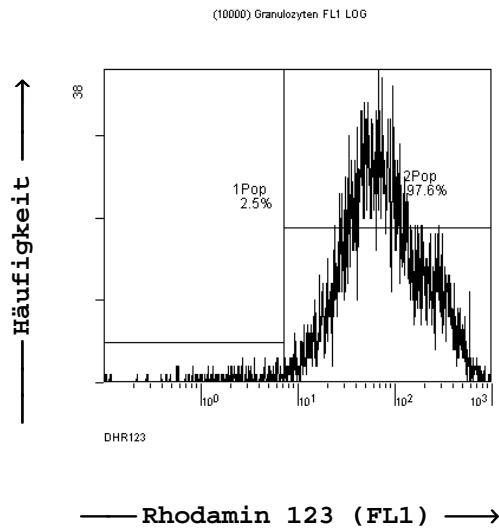


Abb. 7: Keine abgrenzbare *schwach-aktive* Granulozytenpopulation mit Bildung von Sauerstoffradikalen nach Stimulation mit *E. coli*.

Abb. 8: Auftreten einer dritten Sauerstoffradikale bildenden Granulozytenpopulation nach Stimulation mit *E. coli*.

Abb. 7 und Abb. 8: Dargestellt: Granulozyten; Abszisse: Fluoreszenzfärbung (logarithmisch), Ordinate: Häufigkeit der Ereignisse.

2.6.4. Errechnen der Granulozytenzahl

Aus der Streulichtdarstellung des Ansatzes mit Annexin V-FITC (Abb. 2, S.18) konnte der Anteil der Granulozyten an allen erfaßten Leukozyten bestimmt werden. Der Anteil wurde mit der Leukozytenzahl aus den Berichten des Routinelabors multipliziert, dadurch erhielt man die **Granulozytenzahl**:

$$\text{Granulozytenzahl [G/l]} = \frac{\text{Granulozyten im Gate [n]} * \text{Leukozytenzahl [G/l]}}{\text{Granulozyten im Gate [n]} + \text{Monozyten im Gate [n]} + \text{Lymphozyten im Gate [n]}}$$

Die Konzentration der **aktiven Granulozyten** nach Stimulation mit *E. coli* wurde als Anteil dieser Granulozytenzahl ermittelt:

$$\text{aktive Granulozyten [G/l]} = \frac{\text{Granulozytenzahl [G/l]} * \text{Anteil aktiver Granulozyten an allen Granulozyten [\%]}}{100}$$

2.7. Definitionen für die weitere Auswertung

Die Meßwerte für den oxidativen Burst und die Apoptose eines jeweiligen Tages wurden den klinischen Werten von 03.00 Uhr des vorherigen bis 03.00 Uhr desselben Tages zugeordnet. Innerhalb dieser Zeit wurden die Kriterien für den septischen Schock überprüft. Um das Verhalten der Werte in Bezug zum Verlauf eines septischen Schocks beurteilen zu können, wurden nur Zeitabschnitte, in denen an mindestens drei aufeinanderfolgenden Tagen ein septischer Schock bestand, als *Phase mit septischem Schock* ausgewertet. Die Patienten konnten während ihres Aufenthaltes auf der Intensivstation mehrmals eine *Phase mit septischem Schock* erleiden. Um unabhängig von vorausgehenden Phasen den Verlauf während des septischen Schocks beurteilen zu können, wurde als der *Erste Tag mit septischem Schock* der Tag bezeichnet, an dem die erste *Phase mit septischem Schock* begann. Entsprechend ist dabei der *Letzte Tag mit septischem Schock* der letzte Tag der letzten Phase, um bei Betrachtung der Zeit nach dem septischen Schock unabhängig von folgenden Phasen zu sein. Bei Patienten mit nur einer *Phase mit septischem Schock* bezogen sich beide Begriffe auf diese Phase.

Um bei der mittleren Burstaktivität aktiver Granulozyten und bei dem Anteil burstaktiver Granulozyten die Individualität der einzelnen Patienten im Verlauf mehrerer Tage zu berücksichtigen, wurden Kriterien für ansteigende und abfallende Verläufe definiert. Ein *Anstieg* ist gekennzeichnet durch mehr als eine Verdoppelung des Ausgangswertes innerhalb von maximal vier Tagen. Mehr als eine Halbierung des Ausgangswertes innerhalb von vier Tagen wird als *Abfall* bezeichnet. Kommt es zu einem *Abfall* und einem *Anstieg* innerhalb der vier Tage gilt die Bezeichnung welche zuerst erfüllt wurde.

2.8. Statistische Auswertungen

Wurden bei den Darstellungen Boxplots verwendet, steht der Querstrich innerhalb des Kastens für den Median. Der Kasten umschließt den Bereich zwischen der 25. und 75. Perzentile, die Whisker zeigen die erreichten Minimal- und Maximalwerte an. Um Unterschiede von Meßwerten zwischen zwei Zeitpunkten entweder innerhalb der Gruppe der Patienten oder der Normalspender zu überprüfen, wurde der Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Bei Vergleichen zwischen der Gruppe der Patienten und den Kontrollen wurde der Mann-Whitney U-Test angewendet. Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman's R) diente zur Prüfung des Zusammenhangs zweier Parameter. Alle Tests waren zweiseitig ausgelegt und wurden bei einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Vorversuche

3.1.1. Oxidativer Burst bei Granulozyten von Normal Spendern

Stimulation mit fMLP:

Wurde die Bildung der Sauerstoffradikale mit dem chemotaktischen Peptid fMLP angeregt, reagierten gegenüber dem Kontrollansatz im Median 9,1 % der Granulozyten; alle Anteile lagen im Bereich zwischen 1,8 % und 17,3 %.

Stimulation mit *E. coli*:

Nach Stimulation mit *E. coli* lag die Größe der über ihre Bildung von Sauerstoffradikalen als *aktive* Population angesehenen Granulozyten im Median bei 92,3 % (84,5 – 93,2 %). Der Anteil *schwach-aktiver* Granulozyten auf Anregung mit *E. coli* betrug im Median 7,8 % (6,8 % – 15,7 %). *Aktive* Granulozyten hatten als Maß für die Burstaktivität im Median eine dimensionslose mittlere Fluoreszenz des Rhodamin 123 von 9,4 [X-Mean]. Alle Werte lagen im Bereich von 5,7 bis 18,2 [X-Mean]. Die mittlere Burstaktivität des kleineren Anteils der *schwach-aktiven* Granulozyten lag im Median bei 1,15 [X-Mean] (0,7 – 1,6 [X-Mean]). Die höchste bei den Normal Spendern gemessene mittlere Fluoreszenz der *schwach-aktiven* Granulozyten erreichte nicht den niedrigsten bestimmten Wert für die *aktive* Population. Die Werte für den unstimulierten Kontrollansatz betragen im Median 0,4 [X-Mean] (0,3 – 0,7 [X-Mean]), hier bei Berücksichtigung aller Granulozyten im gesamten Bereich der Fluoreszenz (**Abb. 9**).

Zur Untersuchung der Spezifität des Nachweises der Burstaktivität wurde nach Stimulation mit *E. coli* der Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz von Rhodamin 123 auch in den nicht zum oxidativen Burst fähigen Lymphozyten ausgewertet. Im Vergleich zum Kontrollansatz stieg die Fluoreszenz in den Lymphozyten dabei im Median um den Faktor 1,75 (1 – 2) an. Dagegen führte die Stimulation mit den Bakterien in den selben Ansätzen bei Auswertung der gesamten Granulozyten zu einer Verstärkung der intrazellulären Fluoreszenz von Rhodamin um den Faktor 21,5 (12,7 – 48,0).

Mit der Durchführung des Tests zur Bestimmung des oxidativen Burst wurde bei den Normalspendern ungefähr nach drei Stunden Lagerung der Lithium-Heparin-S-Monovetten nach Blutentnahme bei Raumtemperatur begonnen, da auch bei den Patienten am häufigsten nach diesem Zeitraum die Verarbeitung angefangen wurde (Median: 182 min; 90 % der Proben zwischen 46 und 270 min).

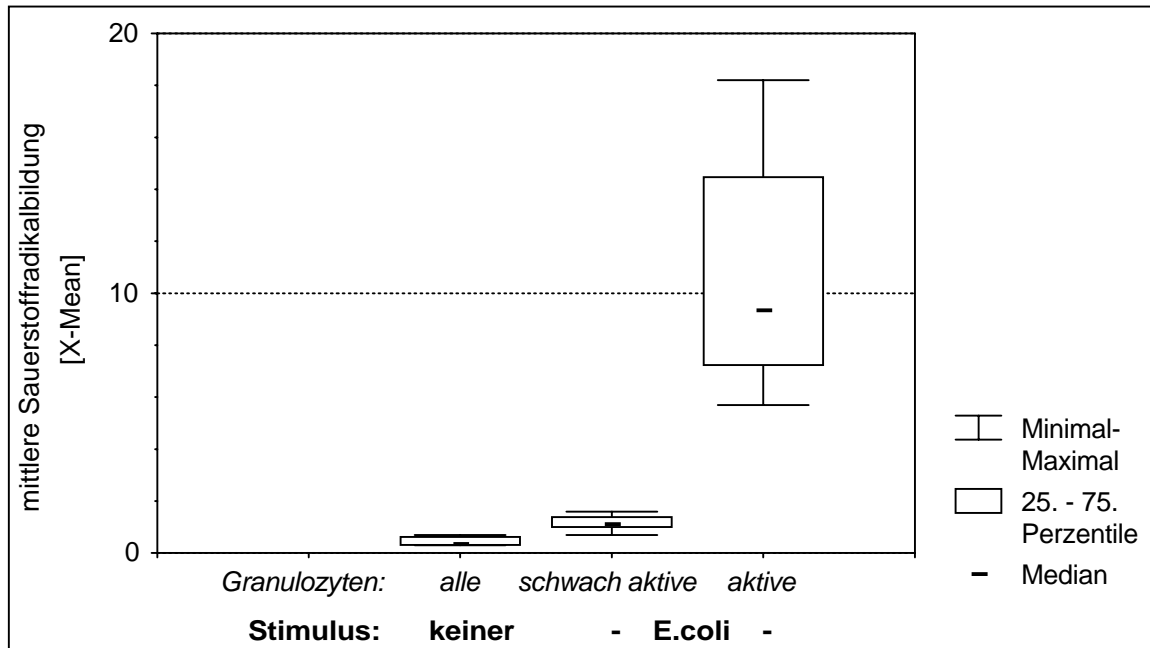


Abb. 9: Mittlere Fluoreszenz von Rhodamin 123 bei Granulozyten als Maß für die Burstaktivität bei zehn Normalspendern. Dargestellt ist die Fluoreszenzfärbung im unstimulierten Kontrollansatz sowie nach Stimulation mit *E. coli* bei Auswertung der *schwach-aktiven* und *aktiven* Population der Granulozyten.

3.1.2. Mit Annexin V nachgewiesene Apoptoserate der Granulozyten bei Normalspendern

Um den Einfluß der Lagerungszeit der Blutproben auf die mit Annexin V nachweisbare Apoptoserate zu bestimmen, wurden Messungen nach unterschiedlich langer Lagerung in den Lithium-Heparin-S-Monovetten bei Raumtemperatur durchgeführt. Dafür wurde unverzüglich, 90 Minuten und 180 min nach Blutabnahme mit dem ersten Schritt der Verarbeitung begonnen. Es kam zu einem fortwährenden Anstieg des Anteils Annexin V-positiver Granulozyten von im Median 20 % (Bereich: 11,9 – 41,7 %) auf 33,7 % (18,5 – 49,6 %) nach 90 min und 39,1 % (27,9 – 64,5 %) nach 180 min (**Abb. 10**). Für die weitere Auswertung wurde der Zeitpunkt von 90 Minuten für den Vergleich mit den bei Patienten erhobenen Werten gewählt, da nach dieser Zeit am häufigsten mit der Verarbeitung des bei

den Patienten entnommenen Blutes begonnen wurde (Median: 87 min; 90 % der Proben zwischen 18 und 114 min).

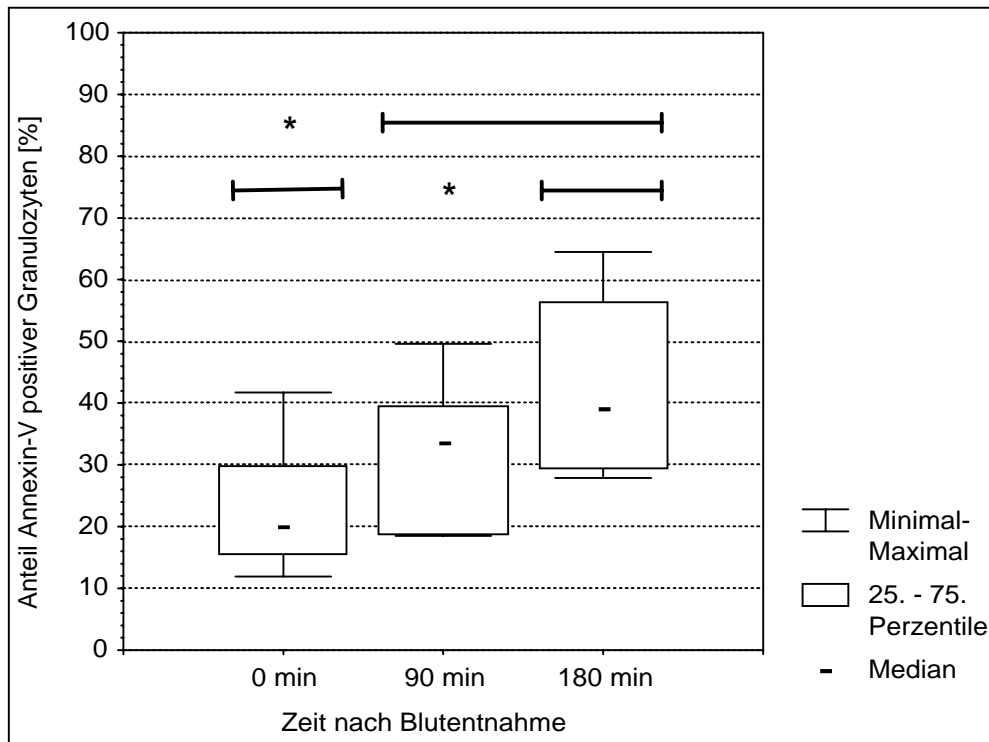


Abb. 10: Anteil Annexin V-positiver Granulozyten bei zehn Normalspendern nach sofortiger Verarbeitung, 90 Minuten oder 180 Minuten Lagerungszeit des Vollblutes bei Raumtemperatur anschließend an die Entnahme. Statistisch signifikanter Unterschied der Werte an den Zeitpunkten mit Stern (*) gegenüber den Zeitpunkten unterhalb des Balkens (|—|) auf gleicher Höhe ($p < 0,05$).

3.2. Oxidativer Burst der Granulozyten während und nach einem septischen Schock

3.2.1. Charakteristische Einzelverläufe

Die **Abb. 11 (A)** stellt die mittlere Burstaktivität der auf Stimulation mit *E. coli aktiv* Sauerstoffradikale bildenden Granulozyten eines Patienten vor. Der Patient war bereits bei der Aufnahme auf die Intensivstation im septischen Schock. Der oxidative Burst stieg nach dem septischen Schock auf Werte oberhalb des Normalspenderbereichs an. In **Abb. 11 (B)** ist ein anderer Patient dargestellt, welcher auf der Intensivstation in eine Phase mit septischem Schock kam und nach vier Tagen verstarb. Bei diesem Patienten blieb die Burstaktivität im mittleren bis unteren Bereich der gesunden Normalspender.

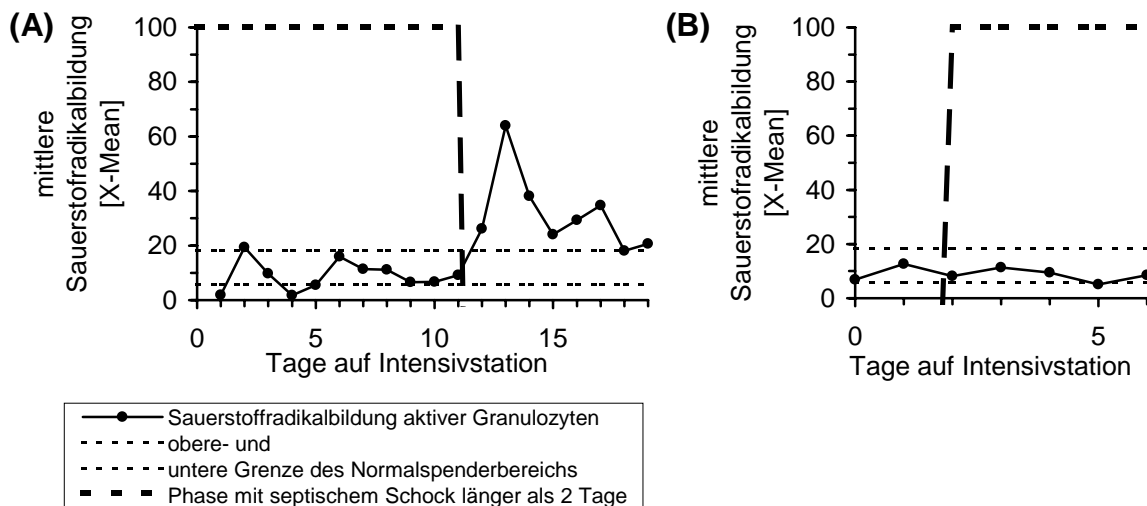


Abb. 11: Beispiele für die Burstaktivität der *aktiven* Granulozyten auf Stimulation mit *E. coli*: **A)** Ein Patient (Nr. 8), der auf der Intensivstation eine Phase mit septischem Schock überlebte; **B)** Ein Patient (Nr. 4), der in einen septischen Schock kam und darin verstarb.

Ein Patient, der mehrere Phasen mit septischem Schock überlebte, ist in **Abb. 12** dargestellt. Er hatte an Tag 5 den *Ersten Tag mit septischem Schock* und am Tag 43 seinen *Letzten Tag mit septischem Schock*. Zwischen der ersten und der zweiten Phase oder nach dem *Letzten Tag mit septischem Schock* war genug Zeit, daß sich eine Änderung im oxidativen Burst zeigen konnte. Dagegen waren die Intervalle zwischen den letzten drei Phasen vergleichsweise kurz.

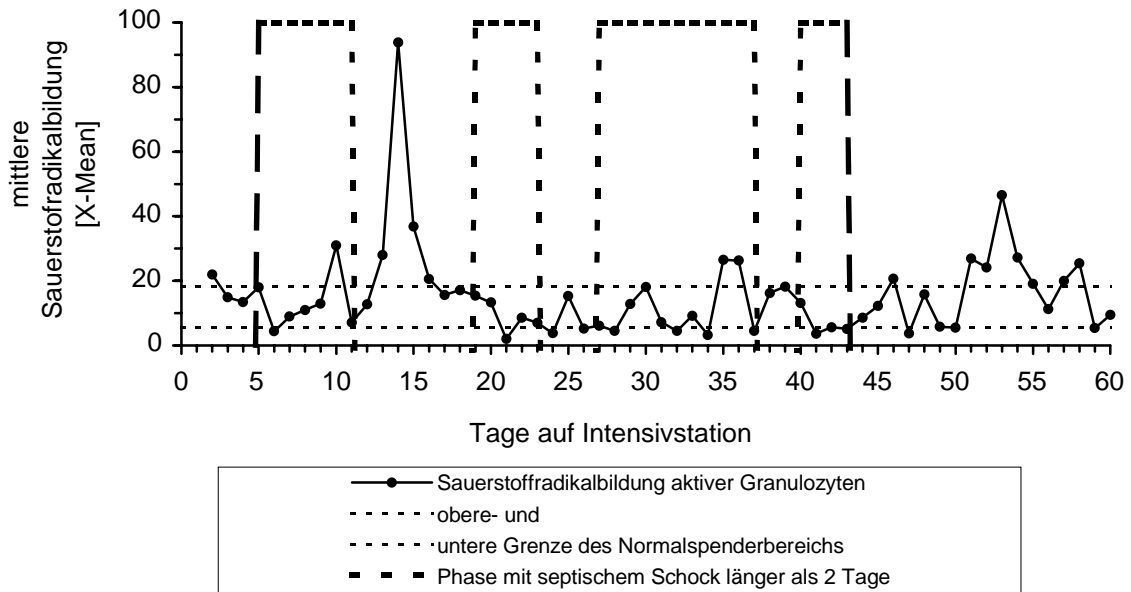


Abb. 12: Beispiel für die mit *E. coli* angeregte Burstaktivität der *aktiven* Granulozyten bei einem Patienten (Nr. 11), der im Verlauf des Aufenthaltes auf der Intensivstation vier Phasen mit septischem Schock hatte und überlebte.

3.2.2. Vergleich zum Normalspenderbereich

Zur Übersicht wurde dargestellt in welchem Bereich der Anteil auf fMLP reagierender Granulozyten (**Tabelle 3**) und die mittlere Burstaktivität auf Stimulation mit *E. coli* (**Tabelle 4**) bei den Patienten in Bezug zu den zehn Normalspendern lag. Als Maß für die Zuordnung wurde der Median der Patientenwerte über den ganzen erfaßten Zeitraum, während der *Phasen mit septischem Schock* und nach dem *Letzten Tag mit septischem Schock* aus den Einzelwerten bestimmt. Bewege sich der Median in diesen Zeitabschnitten unterhalb des Normalspenderbereichs ergab sich daraus, daß die Werte an den meisten Tagen unterhalb dem niedrigsten Wert der Normalspender lagen. Lag der Median oberhalb des Bereichs der Normalspender, waren über die Hälfte der Zeit die Werte höher als der von Gesunden maximal erreichte Wert.

Nur bei einem der verstorbenen Patienten reagierte ein über die meiste Zeit größerer Anteil der Granulozyten gegenüber den Gesunden auf Stimulation mit dem chemotaktischen Peptid fMLP. Jeweils während und nach dem septischen Schock hatte ein überlebender Patient mit dem Median der Werte den Normalbereich überschritten. Es gab Normalspender deren Granulozyten praktisch nicht auf Stimulation mit fMLP reagierten (minimal 1,8 % der Granulozyten). Keiner der Patienten lag unter dem Normalspenderbereich. Ein überlebender Patient war nach dem septischen Schock nicht

mehr in der Studie, daher konnte bei ihm für diesen Zeitraum kein Wert bestimmt werden (Tabelle 3). Bei allen verstorbenen Patienten sowie bei der Mehrzahl der überlebenden Patienten lag der Median der Werte für die Burstaktivität bei *aktiven* Granulozyten auf *E. coli* innerhalb des Bereichs der gesunden Normalspender (Tabelle 4).

Tabelle 3: Anteil Sauerstoffradikale bildender Granulozyten nach Stimulation mit fMLP bei Patienten im Vergleich zum Bereich der zehn gesunden Normalspender

Zeitraum	Patienten	Verteilung der Patienten mit Lage des Medians der Anteile von Granulozyten im Vergleich zum Normalspenderbereich (1,8 – 17,3 %)			
		darunter	im Bereich	darüber	keine Werte
Während der gesamten erfaßten Zeit auf Intensivstation	Überlebende	–	13/13	0/13	–
	Verstorbene	–	3/4	1/4	–
Innerhalb der <i>Phasen mit septischem Schock</i>	Überlebende	–	12/13	1/13	–
	Verstorbene	–	3/4	1/4	–
Nach dem <i>Letzten Tag mit septischem Schock</i>	Überlebende	–	11/12	1/12	1

keine Werte: Patienten, für die im angegebenen Zeitraum keine Daten zur Verfügung stehen.

Tabelle 4: Mittlere Burstaktivität der *aktiven* Granulozytenpopulation nach Stimulation mit *E. coli* bei Patienten im Vergleich zum Bereich der zehn gesunden Normalspender

Zeitraum	Patienten	Verteilung der Patienten mit Lage des Medians der mittleren Burstaktivität im Vergleich zum Normalspenderbereich (5,7 – 18,2 [X-Mean])			
		darunter	im Bereich	darüber	keine Werte
Während der gesamten erfaßten Zeit auf Intensivstation	Überlebende	1/13	9/13	3/13	–
	Verstorbene	0/4	4/4	0/4	–
Innerhalb der <i>Phasen mit septischem Schock</i>	Überlebende	0/13	10/13	3/13	–
	Verstorbene	0/4	4/4	0/4	–
Nach dem <i>Letzten Tag mit septischem Schock</i>	Überlebende	1/12	7/12	4/12	1

keine Werte: Patienten, für die im angegebenen Zeitraum keine Daten zur Verfügung stehen.

3.2.3. Oxidativer Burst nach Beginn des septischen Schocks

Hier wurden die 10 Patienten untersucht, welche schon am *Ersten Tag mit septischem Schock* in der Studie waren. Darunter auch 3 Patienten, die im Verlauf der Studie verstorben sind.

Stimulation mit *E. coli*:

Abb. 13 (A) zeigt fortlaufend die Meßwerte für die Burstaktivität der *aktiv* Sauerstoffradikale bildenden Granulozyten auf *E. coli* ab dem ersten Tag der ersten *Phase mit septischem Schock*. Nach Beginn des septischen Schocks änderte sich die mittlere Sauerstoffradikalbildung der dargestellten Patienten nicht in einer allgemeingültigen Weise. Im Vergleich zu den Normalspendern wurden zum Teil um ein Vielfaches höhere Werte und zugleich niedrigere Werte in der Burstaktivität gefunden. Insgesamt wurden aber keine bedeutenden Unterschiede zwischen beiden Gruppen gefunden. Es kam bei den Patienten zu keiner charakteristischen Änderung der Anzahl *aktiv* Sauerstoffradikale bildender Granulozyten (**Abb. 13 B**).

Die gemeinsame Darstellung der Patienten in Boxplots ergab also keine charakteristischen Veränderungen des oxidativen Burst nach Beginn des septischen Schocks. Um jedoch das individuelle Verhalten der einzelnen Patienten zu berücksichtigen, wurden sie nach ihrem Verhalten in den ersten vier Tagen nach dem Beginn des septischen Schocks in Gruppen eingeteilt. Nach dem *Ersten Tag mit septischem Schock* sollte im Verlauf unterschieden werden, wie viele der Patienten einen *Anstieg* – mehr als eine Verdoppelung des Ausgangswertes innerhalb von maximal vier Tagen – oder einen *Abfall* – mehr als eine Halbierung innerhalb von vier Tagen – bei der Burstaktivität zeigten oder ob es zu keiner deutlichen Änderung kam (**Abb. 14**) (Definitionen: Kapitel 2.7, S. 24). Von den 10 Patienten zeigten dabei 6 Patienten abfallende (**Abb. 14 A**) und 2 Patienten ansteigende Kurvenverläufe (**Abb. 14 B**). Weitere 2 Patienten konnten innerhalb der vier Tage keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden (**Abb. 14 C**). Von den 10 Patienten verstarben 3 im Verlauf der Studie. Bei zwei der Verstorbenen wurde ein abnehmender Verlauf beobachtet und bei einem kam es weder zu einem *Anstieg* noch zu einem *Abfall* der Sauerstoffradikalbildung.

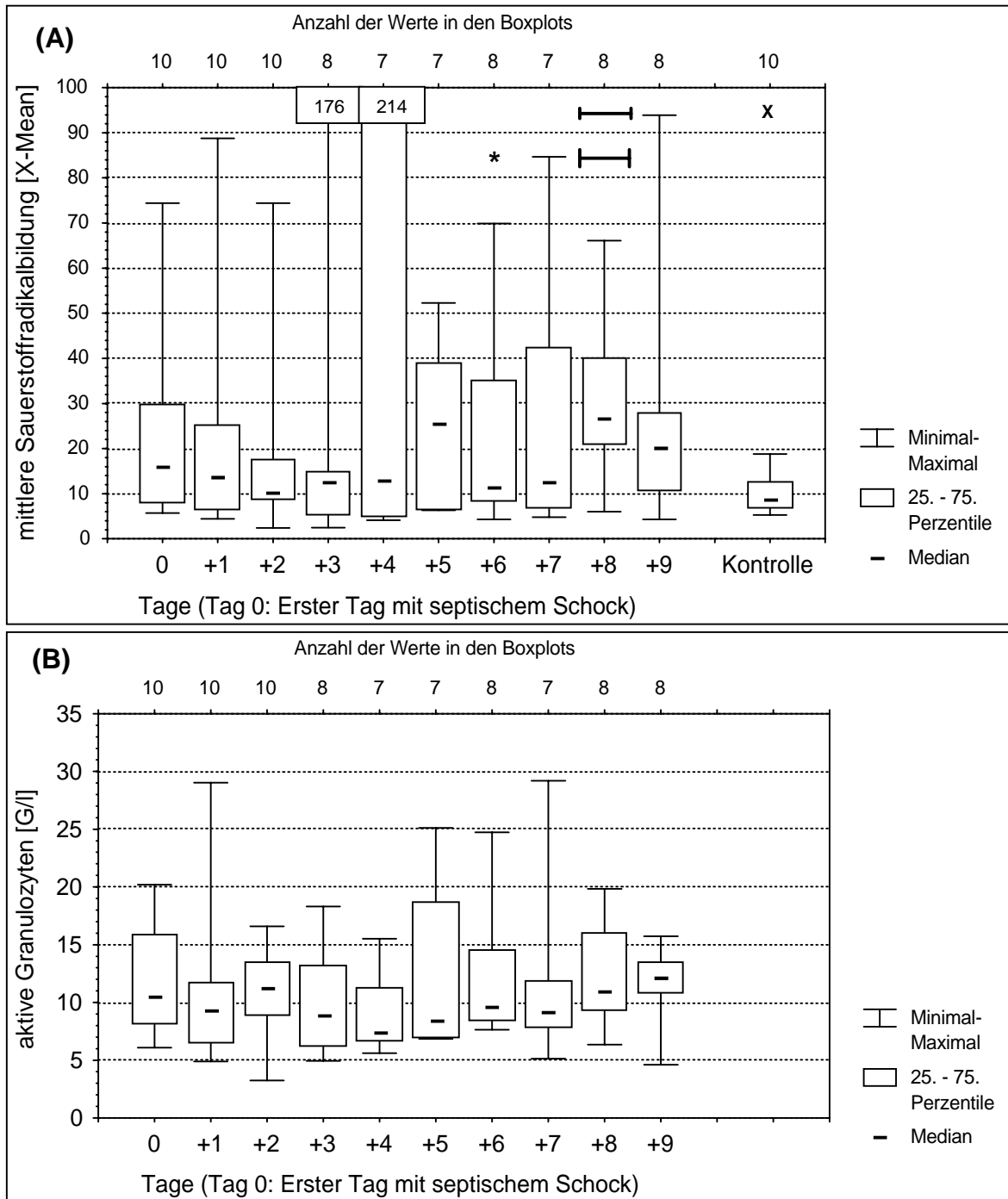


Abb. 13: Nach Stimulation mit *E. coli* aktiv Sauerstoffradikale bildende Granulozyten in den Tagen nach Beginn des septischen Schocks. Dargestellt sind die 10 Patienten, welche am *Ersten Tag mit septischem Schock* bereits in der Studie waren: **A)** Mittlere Burstaktivität der Granulozyten, Stern (*): Statistisch signifikanter Unterschied zu dem Wert unterhalb des Balkens (|—|) ($p < 0,05$); im Vergleich die Normalspenderwerte; Kreuz (X): statistisch signifikanter Unterschied des oxidativen Burst der Normalspender zu den Werten unterhalb des Balkens (|—|) ($p < 0,05$). **B)** Anzahl der *aktiven* Granulozyten im peripheren Blut. **A) und B)** Dargestellt sind jeweils auf der unteren Abszisse die Tage ab dem ersten Tag der ersten *Phase mit septischem Schock* (Tag 0) und die dann folgenden Tagen auf der Intensivstation.

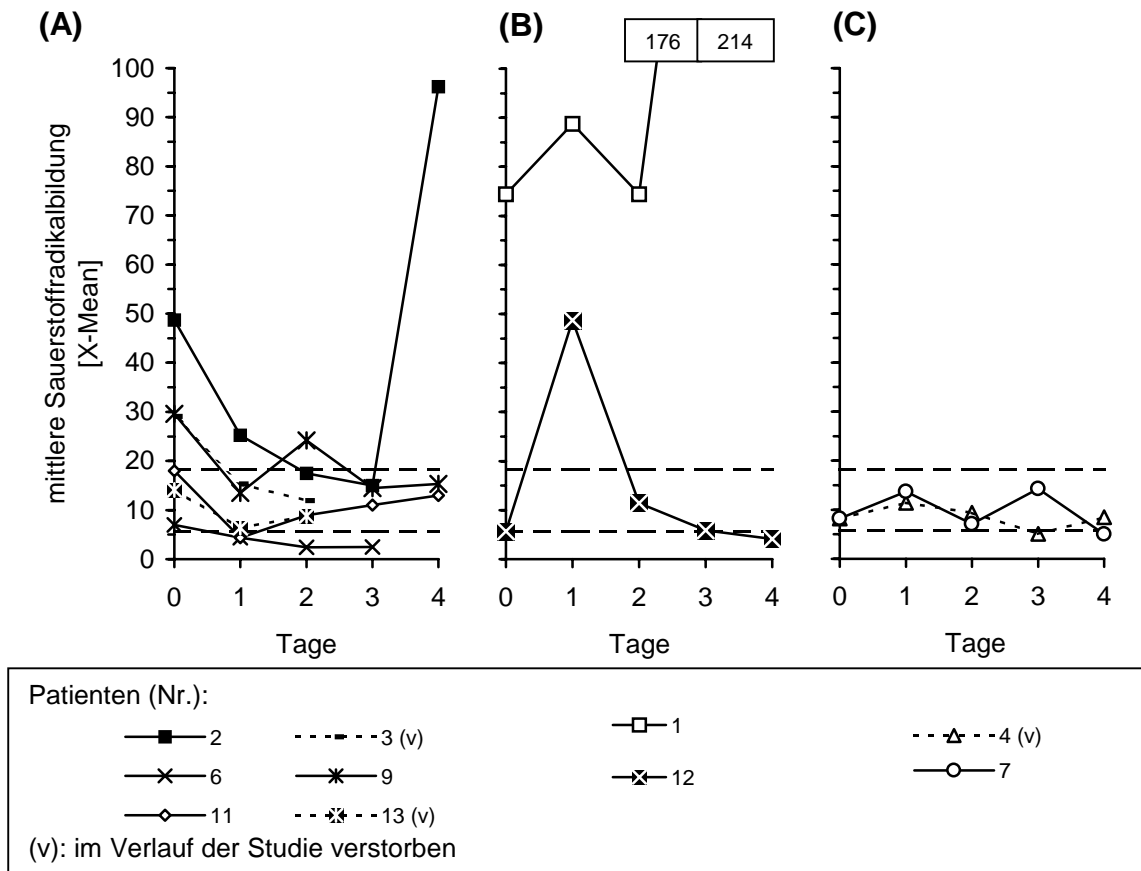


Abb. 14: Mittlere Burstaktivität nach Stimulation mit *E. coli* bei *aktiven* Granulozyten in den Tagen nach Beginn des septischen Schocks. Dargestellt sind die Einzelverläufe der Patienten, welche bereits am *Ersten Tag mit septischem Schock* (Tag 0) in der Studie waren. Änderungen innerhalb von maximal vier Tagen im Bezug zum Ausgangswert (Tag 0): **A)** *Abfall* auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes; **B)** *Anstieg* auf mehr als das Doppelte des Ausgangswertes; **C)** kein *Abfall* oder *Anstieg* der Werte innerhalb von vier Tagen. Waagrechte, gestrichelte Linien: Normalspenderbereich.

Stimulation mit fMLP:

Im Verlauf nach dem *Ersten Tag mit septischem Schock* zeigten sich im allgemeinen keine bedeutenden Änderungen im Anteil der auf fMLP mit einem oxidativen Burst reagierenden Granulozyten. Der Anteil der Sauerstoffradikale bildenden Granulozyten wich in der Gruppe der Patienten gegenüber der Gruppe der Normalspender nicht deutlich ab, zum Teil reagierten aber bis zur Hälfte der Granulozyten der Patienten auf fMLP (**Abb. 15**).

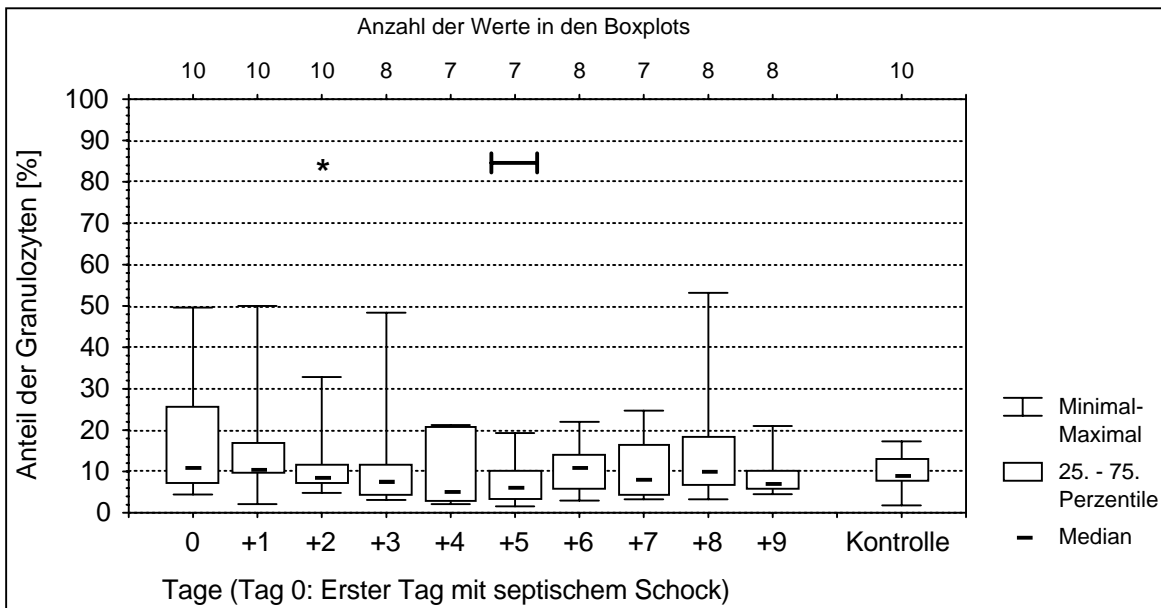


Abb. 15: Anteil Sauerstoffradikale bildender Granulozyten nach Stimulation mit fMLP in den Tagen nach Beginn des septischen Schocks. Dargestellt sind die 10 Patienten, welche am *Ersten Tag mit septischem Schock* bereits in der Studie waren; Stern (*): Statistisch signifikanter Unterschied zu dem Wert unterhalb des Balkens (|—|) ($p < 0,05$); im Vergleich die Normalspenderwerte. Dargestellt sind auf der unteren Abszisse die Tage ab dem ersten Tag der ersten *Phase mit septischem Schock* (Tag 0) und den dann folgenden Tagen auf der Intensivstation.

Die einzelnen Patienten wurden gemäß den Definitionen in Kapitel 2.7 (S. 24) danach gruppiert, ob bei ihnen nach Beginn des septischen Schocks ein *Anstieg* oder *Abfall* im Anteil Sauerstoffradikale bildender Granulozyten nach Anregung mit fMLP zu beobachten war (**Abb. 16**). Nachdem sie erstmals in den septischen Schock gekommen waren zeigten, wie beim oxidativen Burst auf *E. coli*, 6 der 10 Patienten abfallende Verläufe (**Abb. 16 A**). Hier waren 4 Patienten identisch mit denen, bei welchen im selben Zeitraum die Burstaktivität auf *E. coli* absank. Von den 10 Patienten stiegen 2 Patienten wieder mit ihren Werten an (**Abb. 16 B**), wie es bei einem von diesen beiden Patienten auch die Burstaktivität auf *E. coli* tat. Weitere 2 Patienten konnten innerhalb der vier Tage keiner

der beiden Gruppen zugeordnet werden (**Abb. 16 C**). Wie in der Burstaktivität auf *E. coli* zeigten wieder 2 von den 3 im Verlauf der Studie verstorbenen Patienten ein abfallendes Verhalten im Anteil der auf fMLP reagierenden Granulozyten. Bei einem Verstorbenen kam es zu keinen ausreichenden Änderungen, um ihn einer der beiden Gruppen zuzuordnen.

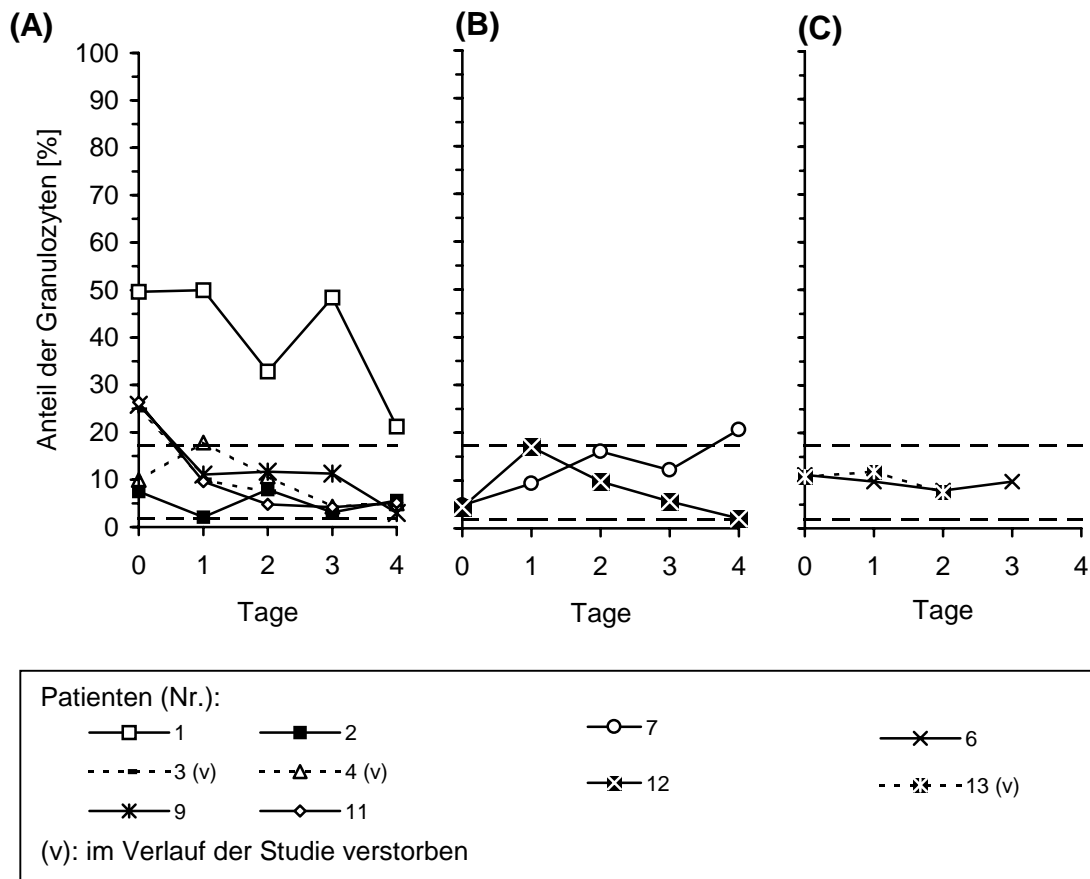


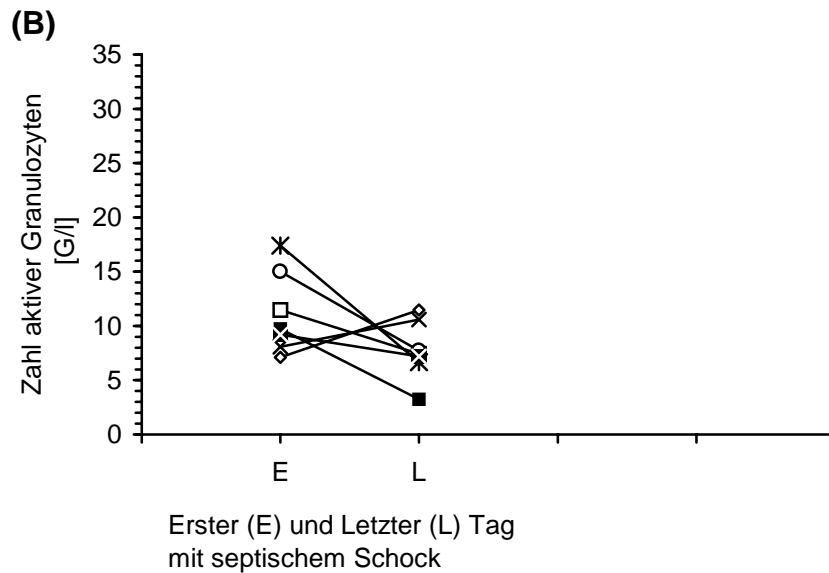
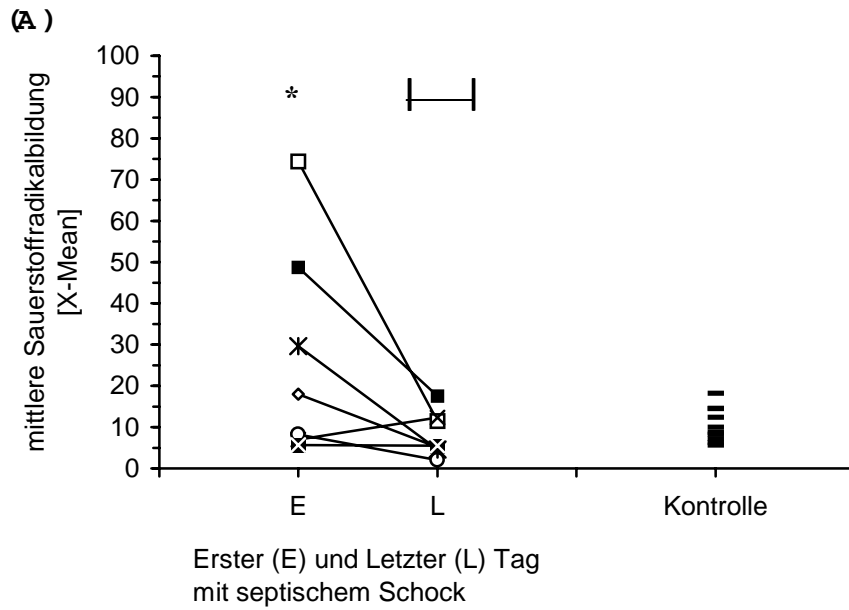
Abb. 16: Anteil Sauerstoffradikale bildender Granulozyten nach Stimulation mit fMLP in den Tagen nach Beginn des septischen Schocks. Dargestellt sind die Einzelverläufe der Patienten, welche am *Ersten Tag mit septischem Schock* (Tag 0) bereits in der Studie waren. Änderungen innerhalb von maximal vier Tagen im Bezug zum Ausgangswert (Tag 0): **A)** *Abfall* auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes; **B)** *Anstieg* auf mehr als das Doppelte des Ausgangswertes; **C)** kein *Abfall* oder *Anstieg* der Werte innerhalb von vier Tagen. Waagrechte, gestrichelte Linien: Normalspenderbereich.

3.2.4. Beginn und Ende des septischen Schocks

Bei den 7 überlebenden Patienten, welche bereits am *Ersten Tag mit septischem Schock* in der Studie waren, wurde die Burstaktivität des Ersten Tages mit der des *Letzten Tages mit septischem Schock* verglichen.

Stimulation mit *E. coli*:

Der oxidative Burst bei *aktiven* Granulozyten fiel bei den untersuchten Patienten vom *Ersten* auf den *Letzten Tag mit septischen Schock* deutlich, d.h. im Median um 69 % ab ($p = 0,043$). Bei 5 der 7 Patienten sank die Burstaktivität auf weniger als die Hälfte. Bei einem Patienten stieg sie auf weniger als das Doppelte an. Im Vergleich zum Bereich der zehn Normalspender gab es keine nachweisbaren Unterschiede (**Abb. 17 A**). Die absolute Anzahl der *aktiv* Sauerstoffradikale bildenden Granulozyten änderte sich bei den Patienten im gleichen Zeitraum nicht deutlich (**Abb. 17 B**).



Patienten (Nr.):	□ 1	■ 2	× 6
	○ 7	✱ 9	◇ 11
	⊠ 12		

Abb. 17: Nach Stimulation mit *E. coli* aktiv Sauerstoffradikale bildende Granulozyten bei überlebenden Patienten am *Ersten* (E) und am *Letzten* (L) Tag mit septischem Schock: **A)** Mittlere Burstaktivität der Granulozyten; Stern (*): Statistisch signifikanter Unterschied zu dem Wert unterhalb des Balkens (|—|) ($p < 0,05$); im Vergleich die Normalspenderwerte; **B)** Anzahl der aktiven Granulozyten.

Stimulation mit fMLP:

Der Anteil Sauerstoffradikale bildender Granulozyten nach Anregung mit fMLP änderte sich bei Vergleich des *Ersten* gegenüber dem *Letzten Tag mit septischem Schock* nicht bedeutend. Bei 3 der 7 Patienten kam es zu mehr als einer Halbierung der Ausgangswerte und bei einem hat sich der reagierende Anteil der Zellen mehr als verdoppelt. Gegenüber den Normalspendern gab es keine wesentlichen Unterschiede (**Abb. 18**).

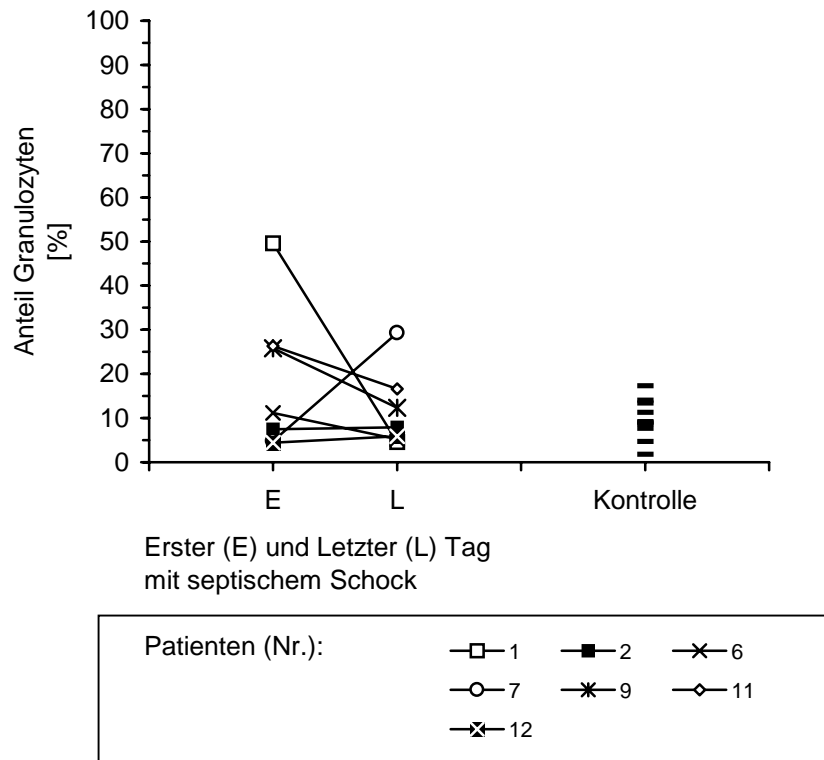


Abb. 18: Anteil Sauerstoffradikale bildender Granulozyten nach Stimulation mit fMLP bei überlebenden Patienten am *Ersten (E)* und am *Letzten (L) Tag mit septischem Schock*; im Vergleich die Normalspenderwerte.

3.2.5. Verlassen des septischen Schocks

Von den 13 überlebenden Patienten waren 12 noch nach der letzten *Phase mit septischem Schock* in der Studie. Bei diesen Patienten wurde ihr Verhalten bei Verlassen des septischen Schocks untersucht.

Stimulation mit *E. coli*:

Abb. 19 (A) stellt die Burstaktivität und **Abb. 19 (B)** die Granulozytenzahl im Blut bei den Patienten gemeinsam im Zeitraum vor und nach dem *Letzten Tag mit septischem Schock* dar. Der mittlere oxidative Burst der *aktiven* Granulozyten fiel in den Tagen vor Ende des septischen Schocks ab, gleichzeitig sank die Anzahl dieser Zellen im Blut. Nach dem *Letzten Tag mit septischem Schock* stieg die Burstaktivität wieder an. Am dritten Tag nach dem Schock (+3) hatte sich der Median der mittleren Sauerstoffradikalbildung der Granulozyten im Vergleich zum *Letzten Tag mit septischem Schock* verdoppelt, d.h. er erhöhte sich um 103 % ($p = 0,028$). Am 6., 8. und 9. Tag nach dem Ende des Schocks war die Burstaktivität gegenüber den Normalspendern erheblich, d.h. um 119 %, 119 % und 146 % erhöht (p : 0,029; 0,037; 0,017). Die Anzahl der *aktiven* Granulozyten im Blut änderte sich dagegen nach dem *Letzten Tag mit septischem Schock* nicht mehr. Die Burstaktivität der 4 verstorbenen Patienten bewegte sich am letzten erfaßten Tag zwischen 8,5 und 15,1 [X-Mean] und lag damit sowohl innerhalb des von den überlebenden Patienten am *Letzten Tag mit septischem Schock* erreichten Bereichs als auch innerhalb des Bereichs der Normalspender (*nicht dargestellt*).

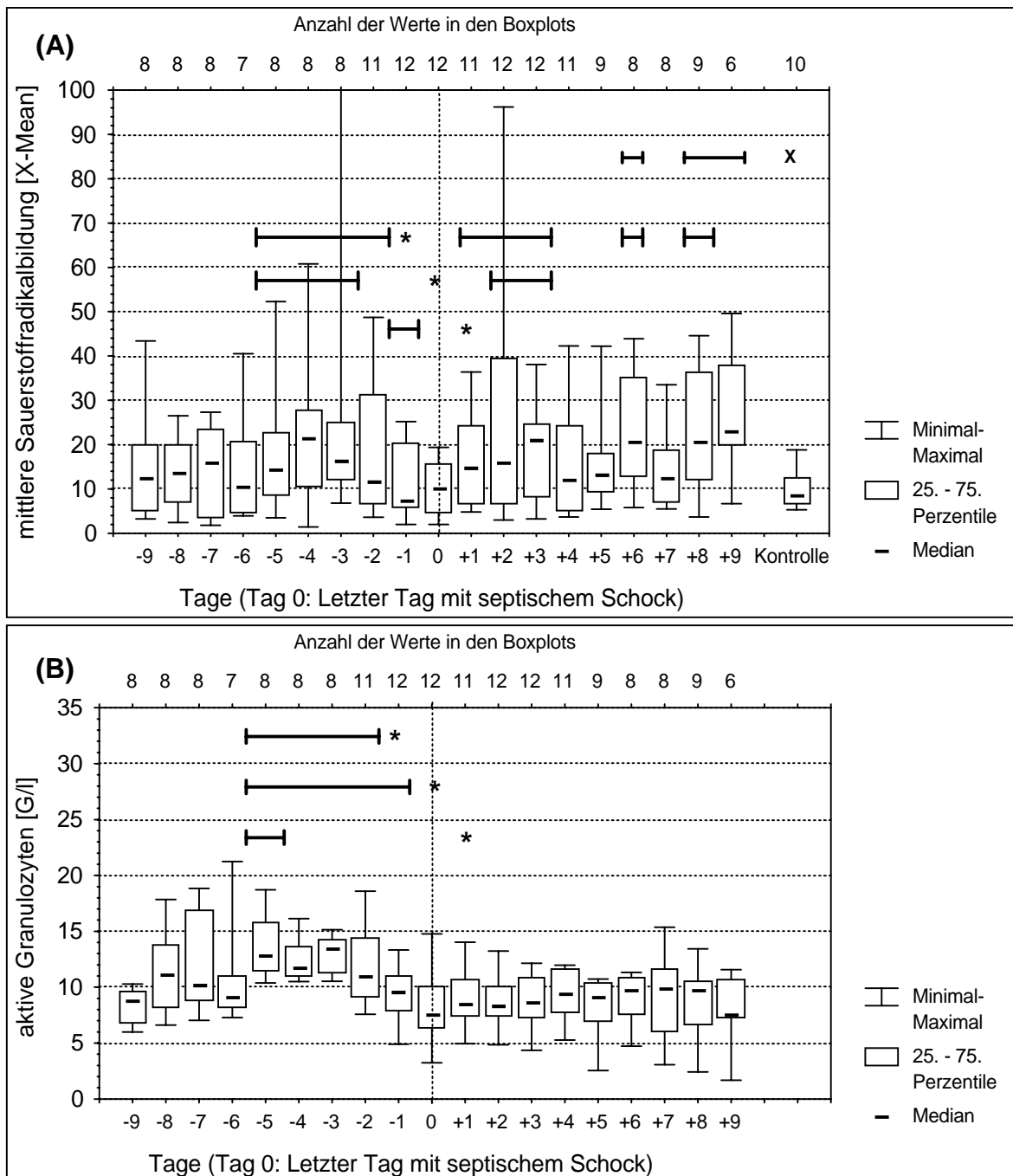


Abb. 19: Nach Stimulation mit *E. coli* aktiv Sauerstoffradikale bildende Granulozyten in den Tagen vor und nach Ende des septischen Schocks. Dargestellt sind die 12 überlebenden Patienten, welche nach dem letzten Tag mit septischem Schock noch in der Studie waren: **A)** Mittlere Burstaktivität der Granulozyten; im Vergleich die Normalspenderwerte, Kreuz (X): statistisch signifikanter Unterschied der Normalspenderwerte zu Werten unterhalb des Balkens (|—|) ($p < 0,05$); **B)** Anzahl der *aktiven* Granulozyten im peripheren Blut. **A) und B)** Dargestellt sind jeweils auf der unteren Abszisse mit negativen Werten die Tage vor dem *Letzten Tag mit septischem Schock* (Tag 0) und mit positiven Werten die folgenden Tage nach dem septischen Schock; Stern (*): Statistisch signifikanter Unterschied zu Werten unterhalb des Balkens (|—|) ($p < 0,05$); dargestellt sind nur Unterschiede zu Tag -1, 0, +1.

Die Patienten wurden gemäß den Definitionen in Kapitel 2.7 (S. 24) auf ansteigende und abfallende Verläufe des oxidativen Burst der *aktiven* Granulozyten auf *E. coli* nach dem septischen Schock untersucht und Gruppen zugeordnet (**Abb. 20**). Bei 2 der 12 Patienten war nach der Definition ein *Abfall* zu beobachten; ein *Anstieg* war bei 10 Patienten zu registrieren.

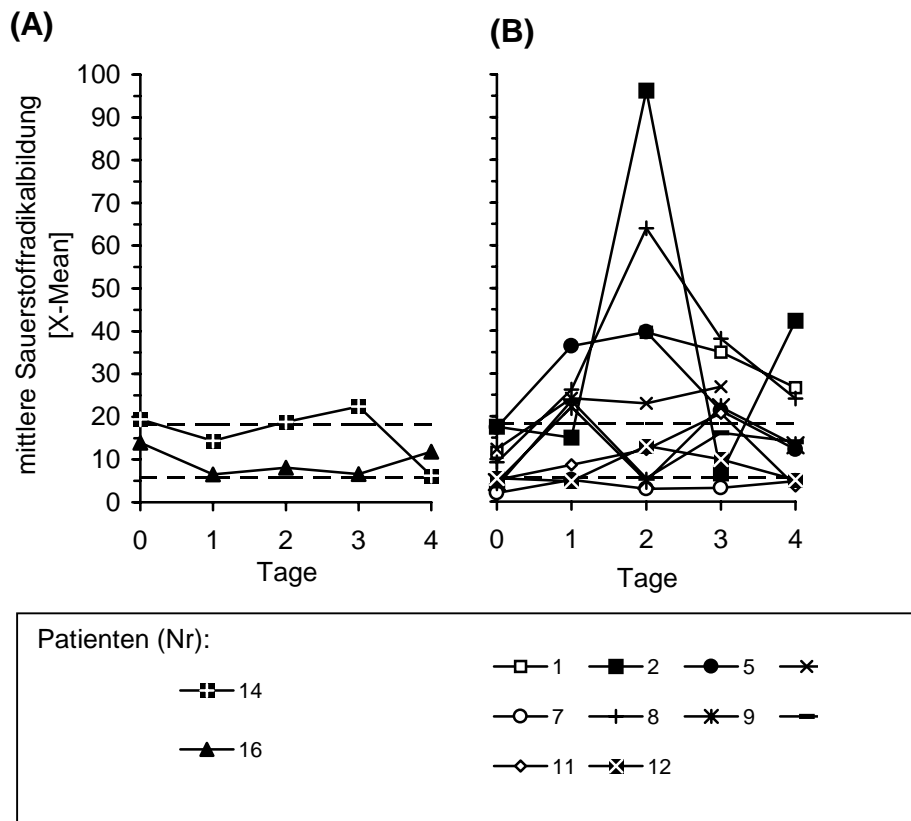


Abb. 20: Mittlere Burstaktivität nach Stimulation mit *E. coli* bei *aktiven* Granulozyten in den Tagen nach dem Ende des septischen Schocks. Dargestellt sind die Einzelverläufe der überlebenden Patienten, welche nach dem *Letzten Tag mit septischem Schock* (Tag 0) noch in der Studie waren. Änderungen innerhalb von maximal vier Tagen im Bezug zum Ausgangswert (Tag 0): **A)** *Abfall* auf weniger als die Hälfte des Ausgangswertes; **B)** *Anstieg* auf mehr als das Doppelte des Ausgangswertes. Waagrechte, gestrichelte Linien: Normalspenderbereich.

Stimulation mit fMLP:

Wurde dagegen mit fMLP stimuliert, änderte sich der Anteil der mit Bildung von Sauerstoffradikalen reagierenden Granulozyten nach Ende der Schockphasen nicht (**Abb. 21**). Unterschiede zur Gruppe der Normalspender waren nicht nachweisbar. Bei den verstorbenen Patienten lag der Anteil der auf fMLP reagierenden Zellen am *Letzten Tag mit septischem Schock* zwischen 4,6 und 20 % (*nicht dargestellt*).

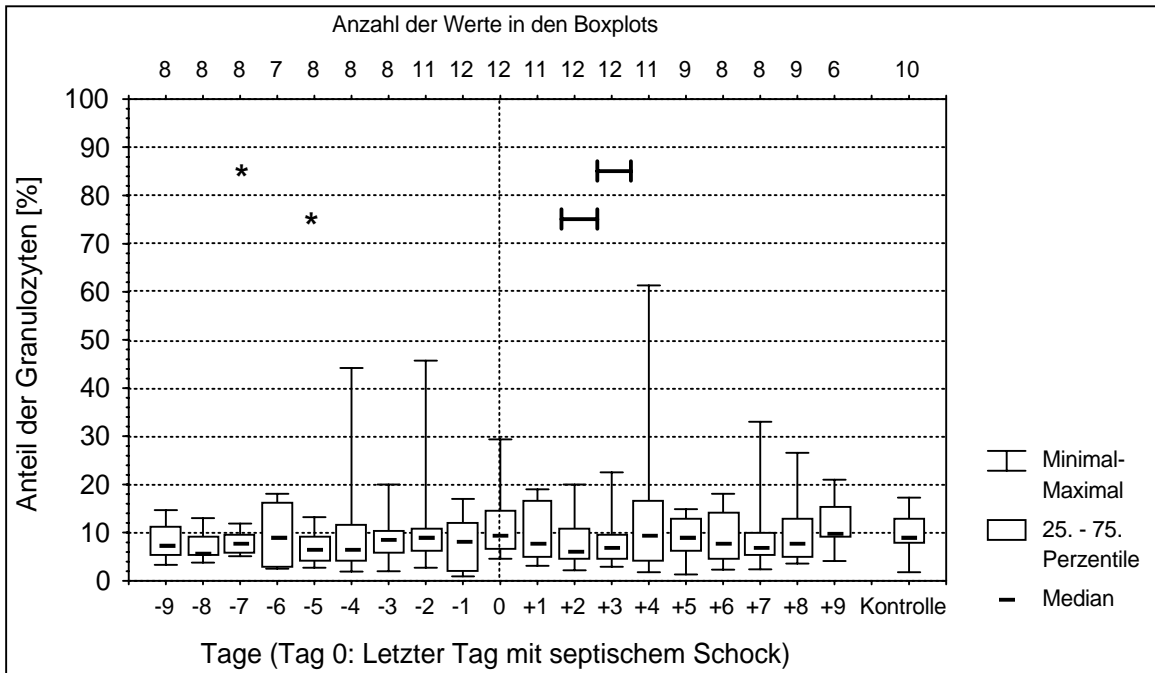


Abb. 21: Anteil Sauerstoffradikale bildender Granulozyten nach Stimulation mit fMLP in den Tagen vor und nach Ende des septischen Schocks; dargestellt sind die 12 überlebenden Patienten, welche nach dem *Letzten Tag mit septischem Schock* noch in der Studie waren; Vergleich mit dem Normalspenderbereich. Dargestellt sind auf der unteren Abszisse mit negativen Werten die Tage vor dem *Letzten Tag mit septischem Schock* (Tag 0) und mit positiven Werten die folgenden Tage nach dem septischen Schock. Stern (*): Statistisch signifikanter Unterschied zu Werten unterhalb des Balkens (|—|) ($p < 0,05$).

Die Patienten wurden danach gruppiert, wie viele gemäß den Definitionen in Kapitel 2.7 (S. 24) jeweils ansteigende oder abfallende Verläufe im Anteil Sauerstoffradikale bildender Granulozyten auf fMLP hatten, wenn der septischen Schock beendet war (**Abb. 22**). Bei 7 von 12 Patienten gab es abfallende Verläufe – im Gegensatz zu den 2 Patienten bei denen der oxidative Burst auf *E. coli* abfiel. Ein Patient reagierte bei beiden Tests mit absinkendem Verhalten in der Burstaktivität nach Stimulation mit *E. coli* bzw. dem Anteil der auf fMLP Sauerstoffradikale bildenden Granulozyten. Ansteigendes

Verhalten im Anteil der Granulozyten wiesen 2 Patienten auf – im Vergleich zu den 10 Patienten, welche mit einer ansteigenden Burstaktivität auf *E. coli* reagierten. Beide Patienten waren auch bei dem Test mit *E. coli* in der Gruppe mit einem Anstieg. Weitere 3 Patienten konnten innerhalb der vier Tage keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden.

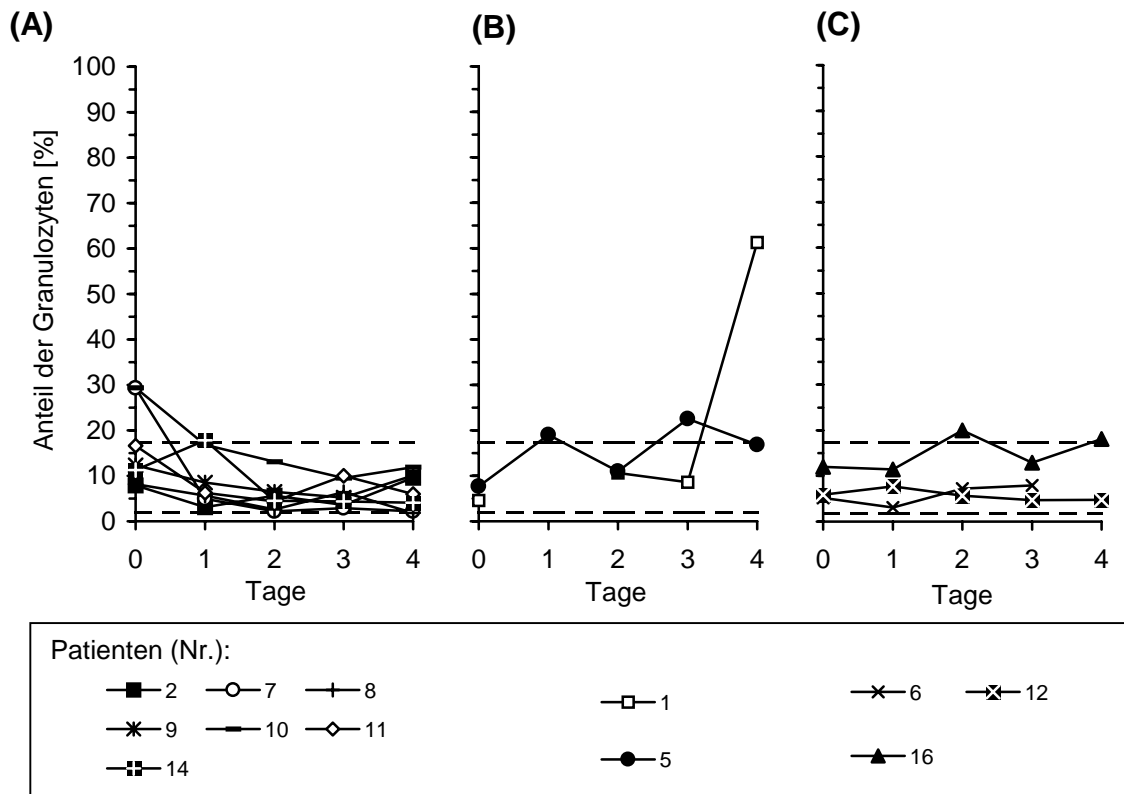


Abb. 22: Anteil Sauerstoffradikale bildender Granulozyten nach Stimulation mit fMLP nach dem Ende des septischen Schocks. Dargestellt sind die Einzelverläufe der überlebenden Patienten, welche nach dem *Letzten Tag mit septischem Schock* (Tag 0) noch in der Studie waren; Änderungen innerhalb von maximal vier Tagen im Bezug zum Ausgangswert (Tag 0): **A)** Abfall auf weniger als die Hälfte; **B)** Anstieg auf mehr als das Doppelte; **C)** kein Abfall oder Anstieg der Werte innerhalb von vier Tagen. Waagrechte, gestrichelte Linien: Normalspenderbereich.

3.3. Anteil schwach Sauerstoffradikale bildender Granulozyten und Assoziation zu dem Anteil Annexin V-positiver Granulozyten

3.3.1. Vergleich zum Normalspenderbereich

Sowohl während der gesamten Zeit auf der Intensivstation als auch nur in den *Phasen mit septischem Schock*, waren bei 4 der 13 Patienten vorwiegend weniger *schwach-aktive* Zellen zu bestimmen als bei Normalspendern (**Tabelle 5**). Bei einem der Patienten konnte ein überwiegend höherer Anteil der schwächeren Population als bei Gesunden festgestellt werden. In der Zeit nach dem septischen Schock konnten bei einem Patienten keine Werte bestimmt werden und noch 3 überlebende Patienten hatten weniger *schwach-aktive* Zellen als die Gesunden. Der Median des Anteils der schwach Sauerstoffradikale bildenden Granulozyten lag bei 3 der 4 Verstorbenen im Bereich der Normalspender und bei einem darüber.

Tabelle 5: Anteil schwach Sauerstoffradikale bildender Granulozyten nach Stimulation mit *E. coli*: Lage des Medians der Einzelwerte der Patienten im Vergleich zu dem Bereich der zehn gesunden Normalspender

Zeitraum	Patienten	Verteilung der Patienten mit Lage des Medians der Anteile von Granulozyten im Vergleich zum Normalspenderbereich (6,8 – 15,7 %)			
		darunter	im Bereich	darüber	keine Werte
Während der gesamten erfaßten Zeit auf Intensivstation	Überlebende	4/13	8/13	1/13	–
	Verstorbene	0/4	3/4	1/4	–
Während der <i>Phasen mit septischem Schock</i>	Überlebende	4/13	8/13	1/13	–
	Verstorbene	0/4	3/4	1/4	–
Nach dem <i>Letzten Tag mit septischem Schock</i>	Überlebende	3/12	8/12	1/12	1

keine Werte: Patienten, für die im angegebenen Zeitraum keine Daten zur Verfügung stehen.

Bei der Bestimmung der Bindung von Annexin V auf Granulozyten waren die Daten bei einigen Patienten unvollständig, da die während eines zusammenhängenden Zeitraums von einem Monat erhobenen Meßwerte aufgrund methodischer Probleme von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden mußten.

Der Anteil Annexin V-positiver Granulozyten war im Median bei den meisten der 12 überlebenden Patienten während des Zeitraums, in dem die Meßwerte verwertet werden konnten, geringer als bei den Normalspendern. Ein überwiegend größerer Anteil der Annexin V-positiven Zellen als bei den Gesunden wurde bei keinem der Untersuchten beobachtet. Bei 2 verstorbenen Patienten lag der Median des Anteils der Annexin V-positiven Granulozyten bei Betrachtung des gesamten Beobachtungszeitraumes unterhalb des niedrigsten Wertes der Normalspender. Während der Schockphasen bewegte sich der Anteil Annexin V-positiver Zellen dann bei allen Verstorbenen unterhalb der Vergleichsgruppe (**Tabelle 6**).

Tabelle 6: Anteil Annexin V-positiver Granulozyten: Lage des Medians der Einzelwerte bei Patienten im Vergleich zum Bereich der zehn gesunden Normalspender

Zeitraum	Patienten	Verteilung der Patienten mit Lage des Medians der Anteile von Granulozyten im Vergleich zum Normalspenderbereich (18,5 – 49,6 %)			
		darunter	im Bereich	darüber	keine Werte
Während der gesamten erfaßten Zeit auf Intensivstation	Überlebende	10/12	2/12	–	1
	Verstorbene	2/3	1/3	–	1
Während der <i>Phasen mit septischem Schock</i>	Überlebende	11/12	1/12	–	1
	Verstorbene	3/3	0/3	–	1
Nach dem <i>Letzten Tag mit septischem Schock</i>	Überlebende	8/9	1/9	–	4

keine Werte: Patienten, für die im angegebenen Zeitraum keine Daten zur Verfügung stehen.

3.3.2. Direkter Vergleich des im Burst *schwach-aktiven* Anteils mit dem Annexin V-positiven Anteil der Granulozyten

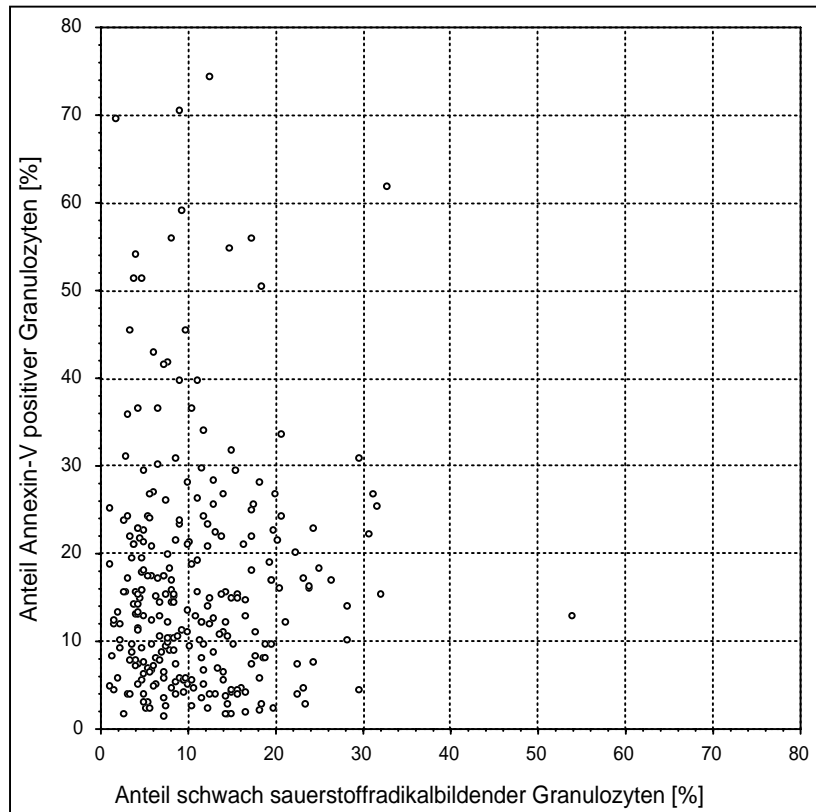


Abb. 23: Zusammenhang zwischen dem bei der Bildung von Sauerstoffradikalen *schwach-aktiven* Anteil und dem Anteil Annexin V-positiver Granulozyten. Dargestellt sind die Wertepaare aller Patienten an allen Tagen an denen beide Parameter bestimmt wurden (n=268).

Es wurden Proben mit größeren Anteilen von Annexin V-positiven Granulozyten gefunden, während zugleich nur wenige schwach Sauerstoffradikale bildende Zellen vorhanden waren (**Abb. 23**). Es war kein Zusammenhang zwischen beiden Parametern nachzuweisen. Der Korrelationskoeffizient betrug $R = -0,02$ und war nicht signifikant.

3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Am ersten Tag der ersten *Phase mit septischem Schock* von mindestens drei Tagen war eine Gruppe von 10 Patienten in der Studie, davon sind 3 im weiteren Verlauf verstorben. Im Verlauf nach dem *Ersten Tag mit septischem Schock* zeigte sich sowohl keine bedeutende Änderung der mit *E. coli* angeregten mittleren Burstaktivität der *aktiven* Granulozytenpopulation (Abb. 13 A) als auch des Anteils Sauerstoffradikale bildender Granulozyten auf Stimulation mit fMLP (Abb. 15). Bei Betrachtung beider Stimulanzen waren jeweils bei 6 Patienten abfallende und bei zwei ansteigende Verläufe der Sauerstoffradikalbildung (Abb. 14) bzw. des Anteils Sauerstoffradikale bildender Zellen (Abb. 16) in den ersten vier Tagen nach Beginn des septischen Schocks zu beobachten.

Am letzten Tag der letzten *Phase mit septischem Schock* von mindestens drei Tagen war bei 7 überlebenden Patienten die Burstaktivität auf *E. coli* im Median um 69 % geringer als am *Ersten Tag mit septischem Schock* ($p = 0,043$) (Abb. 17 A). Bei Verwendung von fMLP zur Anregung der Burstaktivität kam es zu keiner wesentlichen Änderung (Abb. 18).

Der Verlauf nach der letzten *Phase mit septischem Schock* konnte bei 12 überlebenden Patienten untersucht werden. Die mittlere Burstaktivität der *aktiven* Granulozyten auf *E. coli* stieg an und verdoppelte sich im Median vom *Letzten Tag mit septischem Schock* aus innerhalb von drei Tagen ($p = 0,028$) (Abb. 19 A). Bei Betrachtung der Einzelverläufe stieg bei 10 der 12 Patienten die mittlere Burstaktivität innerhalb von vier Tagen an, bei 2 Patienten fiel sie ab (Abb. 20). Ab dem 6. Tag nach dem septischem Schock war bei den Patienten eine gegenüber den zehn gesunden Normalspendern zeitweilig deutlich vermehrte Sauerstoffradikalbildung nachweisbar (Abb. 19 A). Der Anteil von Granulozyten, der auf fMLP mit einem oxidativen Burst reagierte, veränderte sich nach dem septischen Schock nicht bedeutend (Abb. 21), abgesehen von dem Überwiegen der Patienten mit abfallendem Anteil (Abb. 22).

Im Vergleich zu den Normalspendern wies der Großteil der Patienten im septischen Schock weniger Annexin V positive Granulozyten auf (Tabelle 6). Es wurde kein direkter Zusammenhang zwischen dem mit Annexin V bestimmten apoptotischen Anteil der Granulozyten und dem Anteil *schwach-aktiver* Granulozyten bei der Bildung von Sauerstoffradikalen auf Stimulation mit *E. coli* nachgewiesen (Abb. 23).

4. Diskussion

4.1. Methoden

4.1.1. Patienten

Ursprünglich wurden 31 Patienten der anästhesiologischen Intensivstation in die Studie aufgenommen. Mit der Beschränkung auf Verläufe mit septischem Schock an mindestens drei aufeinanderfolgenden Tagen bei einer Infektion mit Bakterien oder Pilzen sollte ermöglicht werden, das Verhalten der Granulozytenfunktion im Verlauf zu beobachten und eine Vergleichbarkeit in der Länge der Phasen mit septischem Schock zu erreichen. Diese Einschränkungen führten zur letztendlichen Auswertung von 17 Patienten.

Unterschiedliche Keime könnten abweichende Reaktionen des Immunsystems ausgelöst und damit die oxidative Burstaktivität oder die Apoptoserate der Granulozyten auf verschiedene Weise beeinflusst haben. Alle Patienten hatten im Verlauf eine oder mehrere nachgewiesene Infektionsquellen mit Pilzen, gramnegativen oder -positiven Bakterien. Bei einer Patientin mit perforierter Appendizitis lag kein mikrobiologischer Befund vor. Bei Untersuchungen von Patienten unterschied sich die Immunantwort auf eine Infektion mit gramnegativen im Vergleich zu einer mit grampositiven Keimen in den höheren Konzentrationen an TNF- α , während IL-6 und IL-8 nicht nachweislich verschieden waren [36]. Durch die 20fache Konzentration an abgetötetem *Staphylococcus epidermidis* im Vergleich zu *E. coli* konnte bei Hasen eine vergleichbare Änderung der Hämodynamik, Zytokinproduktion, Komplementaktivierung, Aggregation von Granulozyten, Leukopenie und Thrombopenie ausgelöst werden [80].

Bei einem bedeutenden Anteil der Patienten mit klinisch diagnostizierter schweren Sepsis gelingt, unter anderem aufgrund der frühzeitigen antibiotischen Therapie, kein Erregernachweis. Dennoch besteht kein wesentlicher Unterschied hinsichtlich klinischer Merkmale, Risikofaktoren oder Prognose gegenüber den Patienten mit Keimnachweis [10]. Auch die Translokation von Bakterien oder Endotoxin aus dem Darmlumen in das Blut oder in das lokale Immunsystem des Darms soll bei Patienten mit einer nach Trauma, Operation oder wegen einer bestehenden Sepsis gestörten Darmbarriere das Multiorganversagen fördern können, ohne daß ein identifizierbarer infektiöser Fokus vorhanden ist [65]. Die kleine Fallzahl in der vorliegenden Arbeit, bei der gleichzeitigen

Schwierigkeit in der klinischen Realität einen, beziehungsweise den für das Krankheitsbild entscheidenden Erreger nachzuweisen, läßt daher keine Unterscheidung erregerspezifischer Effekte zu. Die bewußte Auswahl der Patienten läßt keine Verallgemeinerungen der Ergebnisse auf alle an einem septischen Schock erkrankenden Patienten der Intensivstation zu. Ein Einschluß aller Patienten bei Aufnahme auf die Station wäre ideal, jedoch aufgrund der aufwendigen Untersuchungen nicht durchführbar gewesen. Die Art der Auswahl der Patienten sowie die geringe Fallzahl verbietet anhand der erhobenen Daten Rückschlüsse auf die Überlebenschancen der Patienten zu ziehen.

Bei den in die Studie aufgenommenen Patienten wurde die induzierbare Sauerstoffradikalbildung und die spontane Apoptose der Granulozyten untersucht. Die eingesetzten Methoden sollen eine Untersuchung beider Parameter möglichst ohne artifizielle Beeinflussung der Granulozytenfunktion ermöglichen und die Erkennung von Assoziationen erlauben.

4.1.2. Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie erlaubt Untersuchungen auf der Ebene einzelner Zellen. Die Leukozyten werden nach ihrem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht differenziert. Es ist möglich, ohne tatsächliche Trennung der interessierenden Population, eine größere Anzahl von Leukozyten zu untersuchen. Eosinophile Granulozyten sind zu einem oxidativen Burst fähig, können aber nach ihrem Streulicht nicht von den neutrophilen Granulozyten differenziert werden [73]. Sie gingen daher in die Untersuchung des oxidativen Burst und der Apoptose zu gleichen Teilen mit ein und stellten damit die wesentlichste Verunreinigung dar.

Gebräuchliche Methoden zur Trennung von Leukozytensubpopulationen nutzen die unterschiedliche Schwebedichte der verschiedenen Zelltypen bei der Dichtegradient-Zentrifugation. Die Schwebedichte ist während des Apoptoseprozesses erhöht [41, 94]. Mit Endotoxin oder fMLP *in vitro* aktivierte Granulozyten dagegen können eine geringere Schwebedichte aufweisen [52]. Die Gefahr dieser Vorgehensweise besteht daher im selektiven Verlust dieser Zellen. Verschiedene Isolationsmethoden führen zur Änderung der Expression verschiedener Antigene auf der Zelloberfläche [39]. Die in einigen zur Zelltrennung benötigten Substanzen in Spuren enthaltenen bakteriellen Endotoxine aktivieren die Granulozyten im Sinne eines „Priming“ und führen dadurch zu veränderten

Ergebnissen bei der Untersuchung verschiedener Zellfunktionen, wie ein verstärkter oxidativer Burst nach Induktion mit fMLP [28]. Diese Einflüsse durch Isolationsverfahren sollten in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung von Vollblut in den Meßansätzen vermieden werden. Daher sollte die Durchflußzytometrie die differenzierte Unterscheidung von Zellsubpopulationen gewährleisten.

4.1.3. Messung der Burstaktivität

Der oxidative Burst wurde über die intrazelluläre Reduktion von DHR 123 in das fluoreszierende R 123 in Vollblut nachgewiesen. Der das DHR 123 vermutlich umsetzende Sauerstoffmetabolit ist Wasserstoffperoxid [29]. Im Durchflußzytometer wurden dann methodisch bedingt ausschließlich das in den Zellen vorhandene R 123 erfaßt. Beim Vergleich der Ergebnisse anderer Autoren sind die Unterschiede in den verwendeten Methoden zum Nachweis des oxidativen Burst zu berücksichtigen.

Eine häufig benutzte Technik ist die photometrische Messung der durch die Hyperoxiddismutase hemmbaren Reduktion des nicht membrandurchgängigen **Cytochrom c**. Sie eignet sich zum stöchiometrisch genauen Nachweis von extrazellulär gebildeten Hyperoxid-Anionen. Daneben werden Verfahren verwendet, welche die mit Lichtverstärkerröhren gemessene „Chemilumineszenz“, eine Energiefreisetzung in Form von Licht bei chemischer Umwandlung, nutzen. Das nicht membrandurchgängige **Lucigenin** wird durch extrazelluläre Hyperoxid-Anionen zur Chemilumineszenz angeregt. **Luminol** kann für den Nachweis verschiedener intrazellulär gebildeter Sauerstoffmetaboliten verwendet werden. Nachteil von Luminol ist die vermutete Abhängigkeit der Reaktion mit Sauerstoffradikalen von der intrazellulären Verfügbarkeit des Enzyms Myeloperoxidase [15]. Die intrazelluläre Reduktion von **Nitroblautetrazolium** in das blaue Formazan durch Hyperoxid-Anionen ist eine klinisch verwendete Methode zum Screening auf Granulzytendefekte [79]. Neben der Auszählung unter dem Mikroskop ist ein quantitativer photometrischer Nachweis des Formazan möglich [54].

Für die geforderte Unterscheidung von Subpopulationen mit unterschiedlicher Burstaktivität ist in Verbindung mit der Durchflußzytometrie neben dem DHR 123 noch die Verwendung von **Dichlorfluorescindiacetat** etabliert, welches in der Zelle in das fluoreszierende **Dichlorfluorescein** umgewandelt wird [60]. Mit DHR 123 wird im

Vergleich zu Dichlorfluorescindiacetat eine erheblich höhere Sensitivität erreicht [56, 60, 79].

Die verschiedenen Nachweismethoden für den oxidativen Burst von Granulozyten liefern nicht in jedem Fall die gleichen Ergebnisse wie die Fluoreszenz nach Oxidation von DHR 123. Nach Anregung der Burstaktivität mit opsonisiertem Zymosan oder PMA wurde kein signifikanter Zusammenhang zwischen der maximalen Antwort in der mit Luminol verstärkten Chemilumineszenz und der mittleren Fluoreszenz von R 123 gefunden. Eine positive Korrelation des Tests bestand dagegen mit der Reduktion von Cytochrom c sowie der mittleren Fluoreszenz von oxidiertem Dichlorfluorescindiacetat nach Stimulation mit opsonisiertem Zymosan. Die Fluoreszenzwerte von Dichlorfluorescein und R 123 korrelierten nach Anregung mit PMA nur schwach miteinander [60]. Mit PMA wurde eine gute Korrelation der Fluoreszenz von R 123 und der im quantitativen Nitroblau-Tetrazolium-Test nachgewiesenen intrazellulären Burstaktivität gefunden [54].

Die eigenen Untersuchungen stützen sich auf den durchflußzytometrischen Nachweis des oxidativen Burst mit DHR 123, weil diese Methode eine hohe Sensitivität besitzt und Isolationsschritte erspart. Zudem ist es möglich die intrazelluläre Bildung von Sauerstoffradikalen einzelnen Zellsubpopulationen zuzuordnen. Das beim oxidativen Burst entstehende Wasserstoffperoxid kann über die intakte Zellmembran in benachbarte Zellen ohne eigene Sauerstoffradikalbildung diffundieren und DHR 123 oxidieren [29, 74]. Bereits extrazellulär aus DHR 123 entstandenes Rhodamin 123 dringt allerdings nicht mehr in den Intrazellulärraum von Granulozyten ein [29]. Der Anstieg der intrazellulären Fluoreszenz von DHR 123 nach Anregung der Burstaktivität in der Leukozytensuspension durch *E. coli* war in den nicht selbst zum oxidativen Burst fähigen Lymphozyten deutlich nachweisbar (Faktor 1,75), aber im Vergleich zu dem vielfachen Anstieg der Fluoreszenz bei den Granulozyten (Faktor 21,5) zu vernachlässigen. Der Test ist geeignet zur Erkennung heterozygoter Träger der chronischen Granulomatose mit defekter NADPH-Oxidase [17] sowie sehr kleiner Mengen von funktionsfähigen Granulozyten bei Patienten mit einer homozygoten Ausprägung dieser Erkrankung [79]. Vermutlich ist die eigene effektive Bildung an Wasserstoffperoxid der *schwach-aktiven* Population geringer als es die gemessene Oxidation von DHR 123 vortäuscht. Weniger deutliche Unterschiede in der Burstaktivität grenzen sich so möglicherweise nicht scharf ab.

Der Marker DHR 123 in Verbindung mit der Durchflußzytometrie scheint somit in geeigneter Weise den Nachweis der Bildung von Sauerstoffradikalen in Granulozytensubpopulationen zu ermöglichen. Jedoch sollten mit anderen Methoden gewonnene Ergebnisse ähnlicher Studien, vor allem welche die Chemilumineszenz nutzen, oder bei Verwendung abweichender Stimulanzen mit Vorsicht verglichen werden.

Neben der induzierbaren Sauerstoffradikalbildung wurde die Apoptoserate der Granulozyten ebenfalls mit Hilfe der Durchflußzytometrie untersucht. Damit sollte die grundsätzliche Vergleichbarkeit der Methoden erreicht werden, um das Auffinden von Assoziationen zwischen beiden Parametern zu erleichtern.

4.1.4. Bestimmung der Apoptoserate

In der vorliegenden Studie wurde die mit FITC markiertem Annexin V erkannte Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche als Apoptosemarker verwendet. Dabei wurden bereits nekrotische Zellen mit einer für Propidiumiodid durchlässigen Zellmembran nicht berücksichtigt. Die Messung wurde ohne weitere Kultivierung oder Trennung der Leukozyten direkt im Vollblut nach Lyse der Erythrozyten im Durchflußzytometer durchgeführt. Weil unterschiedliche Methoden zur Identifizierung apoptotischer Zellen jeweils andere Veränderungen der Zelle auf unterschiedlichen Stufen des Apoptoseprozesses nachweisen, ist die Berücksichtigung der zeitlichen Abfolge dieser Veränderungen bedeutend für quantitative Unterschiede im gefundenen Anteil apoptotischer Zellen.

Die klassische Methode zum Nachweis der Apoptose ist die morphologische Untersuchung unter dem Mikroskop. Zu den typischen Zeichen der Apoptose gehört die zunächst randständige, dann generalisierte Verdichtung des Chromatins, Schrumpfung des Zytoplasmavolumens, Zusammenballung der Zellorganellen und dann Fragmentierung des Zellkerns. Daneben kommt es zu Vorwölbungen der Zellmembran, die sich zu Bläschen abschnüren und als Apoptosekörper freigesetzt werden [93]. Während der Veränderungen in der Chromatinstruktur kommt es zur internukleosomalen Spaltung der DNA in Fragmente, die sich in der Elektrophorese darstellen lassen [92]. Die Elektrophorese eignet sich zum qualitativen, jedoch nicht zum quantitativen Nachweis der Apoptose und erfordert die Trennung der zu untersuchenden Zellen mit dem Problem des möglichen selektiven Verlustes apoptotischer Zellen [41, 94]. Neben der qualitativen Untersuchung

der Zellen unter dem Mikroskop ermöglicht die Durchflußzytometrie einen quantitativen Nachweis von apoptotischen Zellen. Bei apoptotischen neutrophilen Granulozyten ist der Gehalt an intakter DNA als Zeichen des Chromatinabbaus reduziert. Nach künstlicher Störung der Zellmembranstabilität kann die Zelle mittels an DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoffen, wie Propidiumiodid, gefärbt werden. Eine reduzierte Markierung des Zellkerns korreliert dann mit den charakteristischen morphologischen Veränderungen in der Apoptose [81]. Strangbrüche in der DNA können über den durch **die Terminale Desoxynukleotidyltransferase** oder **DNA-Polymerase** vermittelten Einbau von mit Fluoreszenzfarbstoffen verbundenen Nukleotiden nachgewiesen werden [24].

Da in der eigenen Studie die spontane Apoptose von Granulozyten direkt aus dem peripheren Blut untersucht wurde, mußte ein Test der bereits frühe Stadien der Apoptose erfaßt verwendet werden. Annexin V eignet sich als Apoptosemarker bei neutrophilen Granulozyten [30] und bei einer Vielzahl von anderen Zelltypen, unabhängig von der Art der Induktion der Apoptose [35, 42, 76]. Die Exposition von PS auf die Zellmembran gilt als ein frühes Ereignis in der Apoptose, das noch vor den mit fluoreszierenden Nukleotiden nachgewiesenen Strangbrüchen in der DNA beobachtet werden kann [50]. Zellen, die eine Kondensation des Chromatins zeigen, sind bereits Annexin V positiv [35]. Im Rahmen der Apoptose schnüren sich Vorwölbungen der Zellmembran als Bläschen ab [93]. Während die Zelle noch keine weiteren Zeichen der Apoptose wie Kondensation des Chromatins zeigt, kann auf diesen Bläschen die Exposition von PS mit Annexin V nachweisbar sein, bevor die asymmetrische Phospholipidverteilung in der gesamten Zellmembran aufgehoben wird. Diese Bläschen sind möglicherweise die Ursache für einen leichten Anstieg der mit der Durchflußzytometrie nachgewiesenen Bindung von Annexin V an Zellen, die sich noch nicht als getrennte Population darstellen [64]. In der vorliegenden Studie wurden die Granulozyten als Annexin V-positiv angesehen, welche zumindest durch ein „Tal“ in der Fluoreszenzfärbung mit Annexin V-FITC von den übrigen, Annexin V-negativen Zellen, getrennt waren. Vermutlich wurden daher bereits frühe Stadien der Apoptose mit erfaßt, in denen die Zellen noch nicht auf der ganzen Zellmembran PS exponieren.

Zur Auswertung des oxidativen Burst wurden im klinischen Verlauf der Patienten *Phasen mit septischem Schock* von mindestens drei Tagen Dauer gefordert, um protrahierte Krankheitsverläufe mit abgrenzbarem Beginn und Ende zu untersuchen. Diese strengen Beschränkungen wurden nicht bei allen anderen vergleichbaren Studien

getroffen, zum Teil waren deren Einschränkung anderer Art. Daher sollen verschiedene relevante Untersuchungen zum Vergleich dargestellt werden, welche die induzierbare Sauerstoffradikalbildung bei Granulozyten in einer mikrobiologisch bedingten Sepsis oder septischem Schock getestet haben.

4.2. Oxidativer Burst von Granulozyten während und nach einer Sepsis oder einem septischen Schock

Um den oxidativen Burst der Granulozyten zu untersuchen, wurde die Sauerstoffradikalbildung mit *E. coli*, als Modell für einen phagozytierbaren Keim, sowie mit dem chemotaktischen Faktor fMLP induziert.

Stimulation mit *E. coli*:

Bei Stimulation mit *E. coli* reagierte der größte Anteil der Granulozyten. Die mittlere Burstaktivität dieser Zellen zeigte nachdem es zum septischen Schock kam zunächst einen abfallenden Verlauf und stieg dann mit dem letzten Tag des Schocks auf ein höheres Niveau an (Abb. 19 A). Die Zeit vor dem Eintritt in den septischen Schock wurde nur bei 5 Patienten erfaßt und daher kann eine höhere Burstaktivität vor Beginn des septischen Schocks nur vermutet werden. Es konnte nicht nachgewiesen werden, ob es sich um einen im septischen Schock erniedrigten oder nach dem septischen Schock gesteigerten oxidativen Burst handelte, auch wenn ab dem sechsten Tag nach der letzten Schockphase bei den dann noch in der Studie verbliebenen Patienten gegenüber den Normalspendern mehr als doppelt so hohe Werte nachgewiesen wurden. Die Gruppe der zehn gesunden Kontrollprobanden war möglicherweise zu klein, um vorhandene geringe Abweichungen zur Gruppe der Patienten nachzuweisen. Die ansteigende Burstaktivität beim Verlassen des septischen Schocks spricht für eine im septischen Schock verminderte Burstaktivität.

Den Ergebnissen bei Induktion des oxidativen Burst mit *E. coli* sollen vergleichbare Untersuchungen bei Patienten auf Intensivstationen mit schweren Infektionen gegenübergestellt werden, in denen Stimulanzen verwendet wurden, welche wie *E. coli* bei einem Großteil der PMN zu einer Burstaktivität führen.

Solomkin *et al.* [61] untersuchten 22 Patienten innerhalb von drei Tagen nach Diagnose einer intraabdominellen Infektion und fanden eine mit Kontrollen vergleichbare Produktion von Hyperoxid-Anionen auf opsonisiertes Zymosan. Pascual *et al.* [51] prüften die Chemilumineszenz von Lucigenin bei plasmalfreien Granulozyten auf Stimulation mit PMA bei 23 Patienten mit neu diagnostizierter Sepsis oder septischem Schock und stellten keinen Unterschied gegenüber gesunden Kontrollprobanden fest. Gegenüber Gesunden erheblich erniedrigt war in der Studie von Wenisch *et al.* [88] die mit DHR 123 bestimmte mittlere Burstaktivität auf Stimulation mit nicht opsonierten *E. coli* bei 14 Patienten bis zum dritten Tag nach Beginn der Therapie bei einer gramnegativen Sepsis mit Organfunktionsstörungen. Die Burstaktivität war ab dem siebten Tag, dem nächsten bestimmten Zeitpunkt, wieder im Normalbereich. Die Studie von Tschakowsky *et al.* [69], bei welcher der Verlauf der Produktion von Hyperoxid-Anionen auf Anregung mit PMA an drei Zeitpunkten erfaßt wurde, zeigte bei den 14 Patienten über den ganzen Zeitraum von bis zu zehn Tagen nach der Diagnose einer Sepsis mit Hypotension verringerte Werte.

Pascual [51] und Solomkin [61] *et al.* haben den oxidativen Burst nur an einem einzelnen Zeitpunkt zu Beginn der Erkrankung nach Aufnahme untersucht und fanden eine mit den Kontrollen vergleichbare Bildung von Sauerstoffradikalen. In den Studien von Tschakowsky [69] und Wenisch [88] *et al.* konnte zumindest für einige Tage ein reduzierter Burst beobachtet werden. In der eigenen Studie konnte zwar gegenüber der Kontrollgruppe keine reduzierte Burstaktivität festgestellt werden, jedoch wurde ein Abfall der Burstaktivität im Verlauf beobachtet. Der Verlauf nach Ende des septischen Schocks wurde bei keiner der Studien separat untersucht. Keiner der Autoren hatte zudem eine Gruppe ausschließlich mit Patienten im septischen Schock.

Bei den eigenen Untersuchungen konnte mit dem Bakterium *E. coli* bei dem größten Teil der Granulozyten ein oxidativer Burst induziert werden, während sich die mittlere Intensität der Reaktion im Krankheitsverlauf änderte. Daneben sollte untersucht werden, wie sich der oxidative Burst auf den schwachen Stimulus fMLP verhielt.

Stimulation mit fMLP:

Wird die Sauerstoffradikalbildung mit fMLP stimuliert, reagiert gewöhnlich nur ein geringer Anteil der Granulozyten. Entzündungsverstärkende Stoffe können zu einem „Priming“ der Granulozyten führen, worauf die Stimulation mit fMLP einen größeren

Anteil der Zellen zu einem verbesserten oxidativen Burst anregt [16]. Ein deutliches „Priming“ der neutrophilen Granulozyten *in vivo* war nur bei wenigen Patienten für begrenzte Zeit vorhanden. Es konnten keine bedeutende Änderung des Anteils burstaktiver Granulozyten auf fMLP bei den Patienten im Verlauf der Erkrankung oder gegenüber den Normalspendern nachgewiesen werden. Lediglich die Patienten mit abfallendem Anteil von Granulozyten mit fMLP-induzierbarer Burstaktivität waren zahlreicher. Ob ein gesteigertes „Priming“ noch zu Beginn der Sepsis vor dem Entstehen des septischen Schocks bestand, konnte hier nicht erfaßt werden.

Zur Diskussion der Ergebnisse werden im Folgenden vergleichbare Studien dargestellt, in welchen ebenfalls fMLP zur Anregung der Sauerstoffradikalbildung von Granulozyten verwendet wurde.

Bei den von Solomkin *et al.* [61] innerhalb von drei Tagen nach Diagnose einer intraabdominellen Infektion untersuchten Patienten, war die über die Reduktion von Cytochrom c nachgewiesene Produktion von Hyperoxid-Anionen im Vergleich zu den Kontrollen auf weniger als ein Drittel verringert. Vespasiano *et al.* [77] konnten in einer longitudinalen Untersuchung mit drei klinisch definierten Zeitpunkten eine Einschränkung des oxidativen Burst bei 8 Patienten mit septischem Schock gegenüber lebensgefährlich erkrankten Patienten ohne Infektion an einer reduzierten Geschwindigkeit der Bildung von Hyperoxid-Anionen nachweisen. Die Bildung von Hyperoxid-Anionen stieg während der Verbesserung des Krankheitsbildes an, blieb allerdings geringer als in der Kontrollgruppe. Mehr als doppelt so hoch dagegen war die Burstaktivität mit derselben Nachweismethode bis vier Tage nach der Aufnahme von Patienten in einer Sepsis mit Hypotension bei der Studie von Tschaikowsky *et al.* [69]. Die Produktion von Hyperoxid-Anionen korrelierte dabei sehr gut mit der Anzahl der fMLP-Rezeptoren auf den PMN, deren Expression gesteigert war. Pascual *et al.* [51] haben eine vergleichbare Chemilumineszenz vom Plasma isolierter Granulozyten bei Patienten mit Sepsis oder septischem Schock gegenüber Gesunden gefunden. Bei allen Studien wurden Methoden verwendet, welche keine Unterscheidung von Subpopulationen erlauben und nur eine Aussage über die mittlere Burstaktivität aller Granulozyten zulassen.

Die Senkung des oxidativen Burst in der Studie von Vespasiano [77] und Solomkin [61] *et al.* deckt sich nicht mit den eigenen Beobachtungen, bei denen unter den Normalspendern mit fMLP kaum eine Aktivierung der Granulozyten beobachtet wurde. In beiden Studien

wurden per Dichtegradient-Zentrifugation mit *Ficoll* isolierte Granulozyten untersucht. Hier kann vermutet werden, daß Spuren von Endotoxin in dem Trennmedium zu einem „Priming“ der Granulozyten geführt haben [28]. Dennoch bestätigen diese Studien zumindest einen nicht gesteigerten oxidativen Burst mit fMLP in der Sepsis. Von Tschaikowsky *et al.* [69] wurde die Diagnose einer Sepsis mit Hypotension innerhalb der ersten 24 Stunden auf der Intensivstation als Untersuchungsbeginn gewählt. In der eigenen Studie war der Beginn eines andauernden septischen Schocks der Anfangszeitpunkt, daher war die Phase mit einer verstärkten Reaktion auf fMLP unter Umständen schon vergangen.

Zusammen betrachtet war die Burstaktivität zu Beginn des septischen Schocks noch bei einigen Patienten vermehrt mit fMLP und *E. coli* stimulierbar, was mit den Ergebnissen anderer Autoren vereinbar wäre. Am auffälligsten in der eigenen Studie und neu gegenüber den Untersuchungen anderer Autoren war der Anstieg der mittleren Burstaktivität auf opsonisierte *E. coli* nach dem Ende des septischen Schocks. Dieser Anstieg wurde nicht von einem gesteigerten Anteil burstaktiver Zellen auf fMLP begleitet, was gegen ein erneutes „Priming“ durch entzündungsverstärkende Enzyme spricht. Es ist von Interesse warum sich der oxidative Burst in der beobachteten Weise verhalten hat.

4.2.1. Mögliche Ursachen für Veränderungen im oxidativen Burst

Als Ursache für den erniedrigten Burst in der Sepsis werden eher Plasmabestandteile septischer Patienten, weniger die Granulozyten selbst, verantwortlich gemacht [51, 87]. In der Sepsis ist die Fähigkeit von Monozyten reduziert, auf Stimulation mit LPS *in vitro* entzündungsverstärkende Zytokine, wie TNF, IL-1 und IL-6, zu produzieren [18, 48]. Im weiteren Verlauf eines septischen Schocks wird verstärkt das entzündungshemmende IL-10 produziert [7]. Im Mausmodell konnte die wesentliche Rolle von IL-10 für eine erhöhte Sterblichkeit infolge sekundärer Pneumonien im Verlauf einer abdominalen Sepsis belegt werden [63]. IL-10 ist unter anderem in der Lage, den oxidativen Burst zu hemmen [40].

Die bei einer Sepsis oder nach schweren Verletzungen im Rahmen der hormonalen Streßreaktion andauernd erhöhten Serumspiegel von Noradrenalin und insbesondere Adrenalin fallen bei Überlebenden ab, während aber die Konzentration an Adrenalin bei Versterbenden weiter ansteigt [6]. Die Gabe von Endotoxin beim Menschen führt neben einem Anstieg von Cortisol und TNF im Plasma zu einer Ausschüttung von Adrenalin

[55]. Zudem werden während des septischen Schocks Katecholamine gegeben, um den Kreislauf zu stabilisieren. Zur Zeit wird dazu Dopamin in hoher Dosierung oder das hauptsächlich vasokonstriktorisch wirkende Noradrenalin verwendet. Katecholamine können die Reaktion auf bakterielles Endotoxin verändern. Durch Infusion von Adrenalin in niedriger therapeutischer Dosierung wird nach Stimulation mit Endotoxin weniger entzündungsverstärkend wirkendes TNF [71, 72] sowie IL-1 β [72] und mehr entzündungshemmendes IL-10 [71, 72] gebildet. *In vitro* hemmte Noradrenalin die durch LPS vermittelte Produktion an TNF, IL-6 [7, 70] und IL-1 β [7] sowie steigerte es die Erzeugung von IL-10 [7]. Die beobachteten Effekte schienen im wesentlichen über β -adrenerge Rezeptoren vermittelt zu werden [70, 71, 72]. Bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock war allerdings gegenüber Gesunden die entzündungshemmende Wirkung von Adrenalin auf die ohnehin schon reduzierte Ausschüttung von TNF- α , IL-1 β und IL-6 eingeschränkt; die gesteigerte Produktion an entzündungshemmendem IL-10 wurde nicht noch weiter gefördert [7].

Neben möglichen indirekten Effekten über die Zytokinproduktion haben Katecholamine einen direkten Einfluß auf den oxidativen Burst. Die induzierbare Sauerstoffradikalbildung von PMN wird durch Adrenalin, Noradrenalin und anderen Katecholaminen in hohen therapeutischen Dosen *in vitro* reduziert [84, 89]. Dabei scheint die Reaktion auf den schwachen Stimulus fMLP deutlicher beeinträchtigt zu sein als auf opsonisierte Partikel [84]. Neben Katecholaminen könnten auch Sedativa und Analgetika das Immunsystem beeinflußt haben. Bei den untersuchten Patienten wurden vor allem das Narkotikum Propofol, das Sedativum Midazolam sowie die Opioidanalgetika Fentanyl und Piritramid eingesetzt. Propofol hemmt *in vitro* den oxidativen Burst [47, 83] sowie die Chemotaxis und die Phagozytosefähigkeit [47] von Granulozyten. Die Hemmung der induzierten Sauerstoffradikalbildung durch Propofol wird zum großen Teil mit der Eigenschaft des Medikaments als Radikalfänger erklärt, auch unabhängig von Einflüssen des fetthaltigen Lösungsmittels [83]. Für Midazolam gibt es widersprüchliche Aussagen. Während Midazolam erst über den therapeutischen Wirkspiegeln einen Einfluß auf die durch fMLP oder Zymosan angeregte Chemilumineszenz zeigte [82], wurde über eine dosisabhängige Hemmung der mit opsonisiertem Zymosan induzierten über verschiedene Methoden nachgewiesenen Sauerstoffradikalbildung *in vitro* berichtet [49]. Midazolam zeigte keine radikalfangenden Eigenschaften [49, 82]. Midazolam schränkte zudem bereits bei niedrigen Konzentrationen die Phagozytose und Abtötung lebender Bakterien ein [38].

Opioidanalgetika wie Fentanyl scheinen dagegen keinen bedeutenden Einfluß auf die Funktion der Granulozyten zu haben [37, 38].

Es kann vermutet werden, daß die eingesetzten Medikamente während des septischen Schocks die Fähigkeit der Granulozyten zum oxidativen Burst nach Phagozytose von *E. coli* eingeschränkt haben und daß es nach dem Absetzen der Medikamente wieder zum Anstieg der Sauerstoffradikalbildung kam. Besonders das häufig zur Kreislaufstabilisierung benutzte Noradrenalin könnte den auf den Tag genauen Anstieg der Burstaktivität mit Ende des septischen Schocks erklären, da die gebräuchlichen Kriterien zur Definition des septischen Schocks auch an die Verwendung der Katecholamine geknüpft sind.

Neben den direkten Einflüssen auf Granulozyten könnten endogene oder exogen zugeführte Hormone und Zytokine eine Umverteilung unterschiedlich funktionsfähiger Populationen dieser Zellen im Körper auslösen und auf diese Weise eine Veränderung des gemessenen oxidativen Burst bewirken. Die Infusion von Endotoxin beim Menschen führte nach einem vorübergehenden Abfall der Granulozytenzahl im peripheren Blut zu einer Neutrophilie mit einer Mobilisierung von unreifen Granulozyten [9]. Der vorübergehende Abfall der Granulozytenzahl bei Infusion von Endotoxin war bei Hasen mit der Umverteilung der Granulozyten in Lungen- und Lebergewebe verbunden [68]. Die dann vermehrt zirkulierenden unreifen Granulozyten könnten schwächer Sauerstoffradikale bildende Populationen stellen. Die Gabe von Adrenalin [11, 62] oder Hydrocortison [62] führte bei Menschen zwar zu einer vermehrten Freisetzung randständiger Granulozyten aus dem Gefäßsystem bzw. Vorstufen von Granulozyten aus dem Knochenmark, dennoch war dabei die Sauerstoffradikalbildung nicht verringert. Bei der vorliegenden Studie wurden die Vorstufen der Granulozyten nicht bestimmt. Gegen eine vermehrte Beteiligung einer solchen, möglicherweise schwächer Sauerstoffradikale bildenden Population, spricht der Anteil der *schwach-aktiven* Zellen auf Stimulation mit *E. coli*, welcher nur bei einem Patienten vorwiegend über denjenigen der gesunden Probanden lag. Bei den Überlebenden wurde vor Ende des septischen Schocks ein Abfallen der Granulozytenzahl und eine anschließend gleichbleibende Zahl der Zellen ab dem *Letzten Tag mit septischem Schock* beobachtet (Abb. 19 B). Der Abfall der Zellzahl spricht für den mit Ende der Schockphase nachlassenden Einfluß von Hormonen und Zytokinen, welche Granulozyten mobilisieren. Der zeitgleiche Anstieg der oxidativen Burstaktivität (Abb. 19 A) könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Reduktion der

Sauerstoffradikalbildung im septischen Schock und die Mobilisierung von Granulozyten in die Blutzirkulation durch die gleichen Faktoren beeinflusst wurden.

Von Bedeutung ist neben der Sauerstoffradikalbildung der Granulozyten im Blut, die Wirkung dieser Zellen an einem Entzündungsort. Ebenso wie gesunde Freiwillige zeigten Patienten mit einer Sepsis und gesichertem Infektionsnachweis einen gesteigerten oxidativen Burst bei den in ein künstlich angelegtes Hautfenster ausgewanderten neutrophilen Granulozyten gegenüber den im peripheren Blut vorhandenen Zellen. Die Sauerstoffradikalbildung wurde hier mit fMLP und PMA induziert [1]. Für die Infektionsabwehr ist zudem entscheidend, ob die Granulozyten den Entzündungsort in ausreichender Anzahl erreichen. In der genannten Studie war die Anzahl der in das Hautfenster ausgewanderten Granulozyten bei den Patienten mit Sepsis gegenüber Gesunden um mehr als 70 % vermindert. Dabei konnte das Leukozyten-Adhäsionsmolekül L-Selektin statt auf der Zelloberfläche vermehrt frei im Plasma nachgewiesen werden [1]. Die in der Sepsis verminderte Adhärenz [67] und Exsudation der neutrophilen Granulozyten in das Gewebe [1] könnte vorteilhaft sein, um den Gewebsschaden durch diese Zellen zu begrenzen. Dem steht möglicherweise gegenüber, daß die Abwehr von eindringenden Keimen trotz der in der Sepsis häufig vorliegenden Leukozytose durch eine ungenügende Auswanderung von Granulozyten in die Entzündungsorte eingeschränkt ist.

Im Gegensatz zu den mit dem Hautfenster beobachteten Ergebnissen, als Modell für einen sekundären Entzündungsort in der Sepsis, wurde bei Patienten mit ARDS aus der bronchoalveolären Lavage gewonnenen Granulozyten ein eingeschränkter oxidativer Burst nach Anregung mit PMA gefunden. Daneben hatten diese Granulozyten eine verminderte Fähigkeit zur Abtötung von lebenden Bakterien und eine reduzierte Chemotaxis [43]. Eine Ursache könnte eine vermehrte Apoptose sein; der niedrige Anteil von apoptotischen PMN in der Bronchiallavageflüssigkeit bei Patienten mit ARDS spricht gegen eine so verursachte Funktionseinschränkung [45]. Es wurde aber noch nicht ausgeschlossen, ob die Apoptose von Granulozyten im Blut von Patienten mit Sepsis und septischem Schock zu einem eingeschränkten oxidativen Burst führt.

4.3. Apoptose und oxidativer Burst von neutrophilen Granulozyten

Zwischen der mit Annexin V nachgewiesenen Exposition von PS und einer abgeschwächten Burstaktivität auf Stimulation mit opsonisierten *E. coli* bei neutrophilen Granulozyten im Blut der Patienten konnte kein Zusammenhang gefunden werden. Die Mehrzahl der Patienten wies bei den Granulozyten eine geringere Apoptoserate als die gesunden Normalspender auf.

Eine Studie beschrieb eine verminderte Burstaktivität von in Kultur spontan apoptotisch gewordenen Granulozyten auf den rezeptorabhängigen Stimulus fMLP, während die Aktivität erhalten blieb, wenn der Burst mit PMA induziert wurde [90]. Die Reaktionsfähigkeit bei Verwendung des unspezifischen Proteinkinase C-Aktivators PMA in dieser Studie, läßt eine in der Apoptose für eine gewisse Zeit erhaltene Fähigkeit der Zellen zur Sauerstoffradikalbildung vermuten, während aber die Signalweiterleitung schon gestört ist. Sauerstoffmetaboliten sind erforderlich sowohl für die spontane als auch für die rezeptorvermittelte Apoptose neutrophiler Granulozyten [33]. Die durch die Phagozytose von *E. coli* ausgelöste Sauerstoffradikalbildung führte – im Gegensatz zur Stimulation mit fMLP [14, 81] – zu einer Beschleunigung der spontanen Apoptose [81].

In den frühen Stadien der Apoptose scheint somit bei neutrophilen Granulozyten noch ein oxidativer Burst möglich zu sein. Bei extrazellulär angeregter Apoptose von Lymphomzellen konnte bei Wegnahme des Apoptosevermittlers sogar eine Wiederherstellung der asymmetrischen Verteilung der Phospholipide in der Zellmembran und eine Wiederaufnahme der Zellteilung bei ehemals Annexin V-positiven Zellen nachgewiesen werden [26]. Die Bildung der mit Annexin V markierbaren Bläschen auf der Zellmembran in der frühen Apoptose [64] kann zur Erfassung dieses frühen Apoptosestadiums geführt haben. Möglicherweise waren bei den Granulozyten im peripheren Blut vor allem noch diese Stadien der Apoptose nachweisbar, welche zur baldigen Erkennung und Aufnahme der Zellen durch Makrophagen führen, bevor die mit *E. coli* induzierte Sauerstoffradikalbildung meßbar reduziert war. Die Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche der Granulozyten, als Zeichen der frühen Apoptose, scheint noch nicht unbedingt mit einer Einschränkung bei der intrazellulären Bekämpfung phagozytierter Bakterien mit Sauerstoffradikalen verbunden zu sein. Die bei

Patienten im Vergleich zu Normal Spendern reduzierte spontane Apoptoserate in der vorliegenden Arbeit wurde auch bei Patienten mit SIRS [32] oder Sepsis [19] beobachtet.

4.4. Schlußfolgerungen

Ein Einfluß von entzündungshemmenden Zytokinen, Hormonen oder Medikamenten auf die Fähigkeit der Granulozyten im Blut auf Stimulation Sauerstoffradikale zu bilden, könnte zu der klinisch beobachteten gesteigerten Anfälligkeit gegenüber noskomialen Infektionen in der Sepsis beitragen. Auch die hier untersuchten Patienten litten zum Teil an Infektionen mit opportunistischen Keimen an mehreren Herden. Im Gegensatz zu der Vielzahl von Arbeiten, die sich mit der akuten Phase der Sepsis und des septischen Schocks beschäftigt haben, sind die an der Überwindung dieses Zustandes beteiligten Vorgänge nur ungenügend erforscht. Daß sich die normale Reaktionsfähigkeit der Granulozyten erst nach dem septischen Schock wiederherstellt, könnte nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie vermutet werden. Zur Klärung der Hintergründe, wann und für welche Patienten ein entzündungshemmender Einfluß auf die Granulozytenfunktion günstig oder ungünstig für den klinischen Verlauf ist, müßten Untersuchungen einer größeren Anzahl von Patienten mit einer zusätzlichen Bestimmung der Konzentrationen von Zytokinen, Sedativa und Hormonen im Blut vorgenommen werden. Bei verminderter Burstaktivität trotz weiterbestehender Infektion könnte eine Therapie mit G-CSF [85] vorteilhaft sein, um die Granulozytenfunktion zu steigern. Ein Zusammenhang des Auftretens früher Apoptosestadien bei neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut mit einem verminderten oxidativen Burst scheint nicht zu bestehen. Der bei den Patienten gefundene reduzierte Anteil apoptotischer Granulozyten im Blut, erfaßt anhand der mit Annexin V nachgewiesenen Exposition von PS-Resten auf der Zellmembran, könnte aber über eine Ausdehnung der Lebensdauer dieser Zellen die Fähigkeit zum oxidativen Burst länger bewahren.

5. Zusammenfassung

Die Fähigkeit neutrophiler Granulozyten im Verlauf des septischen Schocks Sauerstoffradikale zu bilden und der Einfluß des natürlichen Zelltodes (Apoptose) auf diese Funktion wurde bisher ungenügend untersucht. Bei 17 Patienten auf einer anästhesiologischen Intensivstation wurden während und nach einem mindestens drei Tage andauernden septischen Schock täglich die Granulozyten im Blut untersucht. Als Kontrollgruppe dienten zehn gesunde Freiwillige. Mit der Durchflußzytometrie wurde die Bildung von Sauerstoffradikalen auf Stimulation mit dem chemotaktischen Peptid *N*-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) und opsonisierten *Escherichia coli* über Oxidation von Dihydrorhodamin 123 in Rhodamin 123 nachgewiesen. Die Apoptose wurde als Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der Zellmembran mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) markiertem Protein Annexin V bestimmt.

In den Tagen nach Beginn des septischen Schocks zeigte die Sauerstoffradikalbildung nach Phagozytose von *E. coli* bei der überwiegenden Anzahl der Patienten einen abfallenden Verlauf. Sie fiel bei Überlebenden vom ersten auf den letzten Tag mit septischem Schock erheblich, d.h. im Median um 69 %, ab ($p = 0,043$). Nach dem septischen Schock stieg die Sauerstoffradikalbildung im Verlauf deutlich an und erreichte innerhalb von drei Tagen um 103 % höhere Werte ($p = 0,028$). Der Anteil von mit fMLP zur Bildung von Sauerstoffradikalen anregbaren Granulozyten änderte sich nicht deutlich. Wesentliche Unterschiede zur Kontrollgruppe waren bei den Patienten im Anteil Annexin V positiver Granulozyten nachweisbar, welcher überwiegend unter dem Kontrollbereich lag. Es gab keinen Zusammenhang zwischen der durch Annexin V nachgewiesenen Apoptose und einer schwächeren Bildung von Sauerstoffradikalen durch Granulozyten aus dem Blut.

Im Verlauf des septischen Schocks wird die Burstaktivität geringer und wird nach der Schockphase gesteigert. Die Hemmung der Burstaktivität könnte durch endogene Streßhormone und Zytokine oder exogen zugeführte Katecholamine und Sedativa im septischen Schock verursacht worden sein. Die mit Annexin V detektierte Apoptose hat keine wesentliche Bedeutung für eine eingeschränkte induzierbare Sauerstoffradikalbildung von neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut von Patienten im septischen Schock.

6. Anhang

6.1. Einstellungen am Durchflußzytometer

- **Quantitative Bestimmung des oxidativen Burst**

Tabelle 7: PARAMETERS (Burst)

SIGNAL	VOLTS	GAIN	TOTAL GAIN
FS	24	7,5	8,04
SS	293	10,0	18,79
FL1	836	1,0	
AUX	500	10,0	25,00

**Tabelle 8: DISCRIMINATORS
(Burst)**

SENSOR VALUE	FS
	21

- **Nachweis von Phosphatidylserin mittels Annexin V**

Tabelle 9: PARAMETERS (Annexin V)

SIGNAL	VOLTS	GAIN	TOTAL GAIN
FS	427	2,0	4,56
SS	123	20,0	27,38
FL1	1132	1,0	
FL4	1073	1,0	
AUX	500	10,0	25,00

**Tabelle 11: COMPENSATION
(Annexin V)**

Signal out = Y - % X		X	
		FL1	FL4
Y	FL1		0,0
	FL4	1,5	

Tabelle 10: DISCRIMINATORS (Annexin V)

SENSOR VALUE	FS
	103

6.2. Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) Score

Tabelle 12: SOFA-Score nach Vincent *et al.* [78] – modifiziert: Ohne Berücksichtigung der Glasgow-Komaskala; Maximalpunktzahl: 20 statt 24

SOFA Score	1	2	3	4
<i>Atmung</i> P _a O ₂ /FiO ₂ [mmHg]	< 400	< 300	< 200 ——mit Beatmungsunterstützung——	< 100
<i>Gerinnung</i> Thrombozyten [G/l]	< 150	< 100	< 50	< 20
<i>Leber</i> Bilirubin [μ mol/l]	20 – 32	33 – 101	102 – 204	> 204
<i>Herzkreislauf</i> Hypotension (Dosis in μ g/kg•min)	MAP < 70 mmHg	Dopamin \leq 5 <u>oder</u> Dobutamin > 0	Dopamin > 5 <u>oder</u> Adrenalin \leq 0.1 <u>oder</u> Noradrenalin \leq 0.1	Dopamin > 15 <u>oder</u> Adrenalin > 0.1 <u>oder</u> Noradrenalin > 0.1
<i>Niere</i> Kreatinin [μ mol/l] oder Urinausscheidung	110 – 170	171 – 299	300 – 440 <u>oder</u> < 500 ml/Tag	> 440 <u>oder</u> < 200 ml/Tag

Der Score wird errechnet durch Addition der in den fünf Organsystemen erreichten Punktzahlen. MAP: Mittlerer arterieller Blutdruck; P_aO₂: arterieller Sauerstoffpartialdruck; FiO₂: inspiratorische Sauerstofffraktion.

Literaturverzeichnis

1. Ahmed NA; McGill S; Yee J; Hu F; Michel RP; Christou NV: Mechanisms for the diminished neutrophil exudation to secondary inflammatory sites in infected patients with a systemic inflammatory response (sepsis). *Crit Care Med* 27: 2459-68 (1999)
2. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 20: 864-74 (1992)
3. Andree HA; Reutelingsperger CP; Hauptmann R; Hemker HC; Hermens WT; Willems GM: Binding of vascular anticoagulant α (VAC α) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 265: 4923-8 (1990)
4. Babior BM: Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 64: 959-66 (1984)
5. Bass DA; Olbrantz P; Szejda P; Seeds MC; McCall CE: Subpopulations of neutrophils with increased oxidative product formation in blood of patients with infection. *J Immunol* 136: 860-6 (1986)
6. Baue AE; Gunther B; Hartl W; Ackenheil M; Heberer G: Altered hormonal activity in severely ill patients after injury or sepsis. *Arch Surg* 119: 1125-32 (1984)
7. Bergmann M; Gornikiewicz A; Sautner T; Waldmann E; Weber T; Mittlbock M; Roth E; Fugger R: Attenuation of catecholamine-induced immunosuppression in whole blood from patients with sepsis. *Shock* 12: 421-7 (1999)
8. Bone RC: Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 24: 1125-8 (1996)
9. Brown CC; Malech HL; Gallin JI: Intravenous endotoxin recruits a distinct subset of human neutrophils, defined by monoclonal antibody 31D8, from bone marrow to the peripheral circulation. *Cell Immunol* 123: 294-306 (1989)
10. Brun-Buisson C; Doyon F; Carlet J; Dellamonica P; Gouin F; Lepoutre A; Mercier JC; Offenstadt G; Regnier B: Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA* 274: 968-74 (1995)

11. Burns AM; Keogan M; Donaldson M; Brown DL; Park GR: Effects of inotropes on human leucocyte numbers, neutrophil function and lymphocyte subtypes. *Br J Anaesth* 78: 530-5 (1997)
12. Chollet-Martin S; Montravers P; Gibert C; Elbim C; Desmonts JM; Fagon JY; Gougerot-Pocidallo MA: Subpopulation of hyperresponsive polymorphonuclear neutrophils in patients with adult respiratory distress syndrome. Role of cytokine production. *Am Rev Respir Dis* 146: 990-6 (1992)
13. Cobb JP; Danner RL: Nitric oxide and septic shock. *J Amer Med Ass* 275: 1192-6 (1996)
14. Colotta F; Re F; Polentarutti N; Sozzani S; Mantovani A: Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 80: 2012-20 (1992)
15. Dahlgren C; Karlsson A: Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods* 232: 3-14 (1999)
16. Elbim C; Bailly S; Chollet-Martin S; Hakim J; Gougerot-Pocidallo MA: Differential priming effects of proinflammatory cytokines on human neutrophil oxidative burst in response to bacterial *N*-formyl peptides. *Infect Immun* 62: 2195-201 (1994)
17. Emmendorffer A; Hecht M; Lohmann-Matthes ML; Roesler J: A fast and easy method to determine the production of reactive oxygen intermediates by human and murine phagocytes using dihydrorhodamine 123. *J Immunol Methods* 131: 269-75 (1990)
18. Ertel W; Kremer JP; Kenney J; Steckholzer U; Jarrar D; Trentz O; Schildberg FW: Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients. *Blood* 85: 1341-7 (1995)
19. Ertel W; Keel M; Infanger M; Ungethum U; Steckholzer U; Trentz O: Circulating mediators in serum of injured patients with septic complications inhibit neutrophil apoptosis through up-regulation of protein-tyrosine phosphorylation. *J Trauma* 44: 767-75 (1998)
20. Fadok VA; Savill JS; Haslett C; Bratton DL; Doherty DE; Campbell PA; Henson PM: Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol* 149: 4029-35 (1992)

21. Fadok VA; Voelker DR; Campbell PA; Cohen JJ; Bratton DL; Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 148: 2207-16 (1992)
22. Fadok VA; Warner ML; Bratton DL; Henson PM: CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$). *J Immunol* 161: 6250-7 (1998)
23. Forehand JR; Pabst MJ; Phillips WA; Johnston RB Jr: Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium. *J Clin Invest* 83: 74-83 (1989)
24. Gorczyca W; Gong J; Darzynkiewicz Z: Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the *in situ* terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res* 53: 1945-51 (1993)
25. Goris RJ: MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response? *World J Surg* 20: 418-21 (1996)
26. Hammill AK; Uhr JW; Scheuermann RH: Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death. *Exp Cell Res* 251: 16-21 (1999)
27. Hannah S; Mecklenburgh K; Rahman I; Bellingan GJ; Greening A; Haslett C; Chilvers ER: Hypoxia prolongs neutrophil survival *in vitro*. *FEBS Lett* 372: 233-7 (1995)
28. Haslett C; Guthrie LA; Kopaniak MM; Johnston RB Jr; Henson PM: Modulation of multiple neutrophil functions by preparative methods or trace concentrations of bacterial lipopolysaccharide. *Am J Pathol* 119: 101-10 (1985)
29. Henderson LM; Chappell JB: Dihydrorhodamine 123: a fluorescent probe for superoxide generation? *Eur J Biochem* 217: 973-80 (1993)
30. Homburg CH; de Haas M; von dem Borne AE; Verhoeven AJ; Reutelingsperger CP; Roos D: Human neutrophils lose their surface Fc γ RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis *in vitro*. *Blood* 85: 532-40 (1995)
31. Jersmann HP; Rathjen DA; Ferrante A: Enhancement of lipopolysaccharide-induced neutrophil oxygen radical production by tumor necrosis factor alpha. *Infect Immun* 66: 1744-7 (1998)

32. Jimenez MF; Watson RW; Parodo J; Evans D; Foster D; Steinberg M; Rotstein OD; Marshall JC: Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome. *Arch Surg* 132: 1263-9 (1997)
33. Kasahara Y; Iwai K; Yachie A; Ohta K; Konno A; Seki H; Miyawaki T; Taniguchi N: Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood* 89: 1748-53 (1997)
34. Konig B; Konig W: Effect of growth factors on *Escherichia coli* alpha-hemolysin-induced mediator release from human inflammatory cells: involvement of the signal transduction pathway. *Infect Immun* 62: 2085-93 (1994)
35. Koopman G; Reutelingsperger CP; Kuijten GA; Keehnen RM; Pals ST; van Oers MH: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-20 (1994)
36. Kragstjerg P; Holmberg H; Vikerfors T: Dynamics of blood cytokine concentrations in patients with bacteremic infections. *Scand J Infect Dis* 28: 391-8 (1996)
37. Krumholz W; Demel C; Jung S; Meuthen G; Hempelmann G: The influence of fentanyl and alfentanil on functions of human polymorphonuclear leukocytes *in vitro*. *Acta Anaesthesiol Scand* 37: 386-9 (1993)
38. Krumholz W; Endrass J; Knecht J; Hempelmann G: The effects of midazolam, droperidol, fentanyl, and alfentanil on phagocytosis and killing of bacteria by polymorphonuclear leukocytes *in vitro*. *Acta Anaesthesiol Scand* 39: 624-7 (1995)
39. Kuijpers TW; Tool AT; van der Schoot CE; Ginsel LA; Onderwater JJ; Roos D; Verhoeven AJ: Membrane surface antigen expression on neutrophils: a reappraisal of the use of surface markers for neutrophil activation. *Blood* 78: 1105-11 (1991)
40. Laichalk LL; Danforth JM; Standiford TJ: Interleukin-10 inhibits neutrophil phagocytic and bactericidal activity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 15: 181-7 (1996)
41. Martin SJ; Bradley JG; Cotter TG: HL-60 cells induced to differentiate towards neutrophils subsequently die via apoptosis. *Clin Exp Immunol* 79: 448-53 (1990)
42. Martin SJ; Reutelingsperger CP; McGahon AJ; Rader JA; van Schie RC; LaFace DM; Green DR: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of *Bcl-2* and *Abl*. *J Exp Med* 182: 1545-56 (1995)

43. Martin TR; Pistorese BP; Hudson LD; Maunder RJ: The function of lung and blood neutrophils in patients with the adult respiratory distress syndrome. Implications for the pathogenesis of lung infections. *Am Rev Respir Dis* 144: 254-62 (1991)
44. Matsuba KT; Van Eeden SF; Bicknell SG; Walker BA; Hayashi S; Hogg JC: Apoptosis in circulating PMN: increased susceptibility in L-selectin-deficient PMN. *Am J Physiol* 272: H2852-8 (1997)
45. Matute-Bello G; Liles WC; Radella F 2nd; Steinberg KP; Ruzinski JT; Jonas M; Chi EY; Hudson LD; Martin TR: Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1969-77 (1997)
46. Meagher LC; Savill JS; Baker A; Fuller RW; Haslett C: Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage release of thromboxane B₂. *J Leukoc Biol* 52: 269-73 (1992)
47. Mikawa K; Akamatsu H; Nishina K; Shiga M; Maekawa N; Obara H; Niwa Y: Propofol inhibits human neutrophil functions. *Anesth Analg* 87: 695-700 (1998)
48. Munoz C; Carlet J; Fitting C; Misset B; Bleriot JP; Cavaillon JM: Dysregulation of *in vitro* cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 88: 1747-54 (1991)
49. Nishina K; Akamatsu H; Mikawa K; Shiga M; Maekawa N; Obara H; Niwa Y: The inhibitory effects of thiopental, midazolam, and ketamine on human neutrophil functions. *Anesth Analg* 86: 159-65 (1998)
50. O'Brien IE; Reutelingsperger CP; Holdaway KM: Annexin V and TUNEL use in monitoring the progression of apoptosis in plants. *Cytometry* 29: 28-33 (1997)
51. Pascual C; Bredle D; Karzai W; Meier-Hellmann A; Oberhoffer M; Reinhart K: Effect of plasma and LPS on respiratory burst of neutrophils in septic patients. *Intensive Care Med* 24: 1181-6 (1998)
52. Pember SO; Barnes KC; Brandt SJ; Kinkade JM Jr: Density heterogeneity of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes: gradient fractionation and relationship to chemotactic stimulation. *Blood* 61: 1105-15 (1983)
53. Pericle F; Liu JH; Diaz JI; Blanchard DK; Wei S; Forni G; Djeu JY: Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur J Immunol* 24: 440-4 (1994)

54. Richardson MP; Ayliffe MJ; Helbert M; Davies EG: A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *J Immunol Methods* 219: 187-93 (1998)
55. Richardson RP; Rhyne CD; Fong Y; Hesse DG; Tracey KJ; Marano MA; Lowry SF; Antonacci AC; Calvano SE: Peripheral blood leukocyte kinetics following *in vivo* lipopolysaccharide (LPS) administration to normal human subjects. Influence of elicited hormones and cytokines. *Ann Surg* 210: 239-45 (1989)
56. Rothe G; Oser A; Valet G: Dihydrorhodamine 123: a new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 75: 354-5 (1988)
57. Savill J; Hogg N; Ren Y; Haslett C: Thrombospondin cooperates with CD36 and the vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis. *J Clin Invest* 90: 1513-22 (1992)
58. Savill JS; Wyllie AH; Henson JE; Walport MJ; Henson PM; Haslett C: Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 83: 865-75 (1989)
59. Schoenberg MH; Weiss M; Radermacher P: Outcome of patients with sepsis and septic shock after ICU treatment. *Langenbecks Arch Surg* 383: 44-8 (1998)
60. Smith JA; Weidemann MJ: Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry. *J Immunol Methods* 162: 261-8 (1993)
61. Solomkin JS; Cotta LA; Brodt JK; Hurst JM: Regulation of neutrophil superoxide production in sepsis. *Arch Surg* 120: 93-8 (1985)
62. Steele RW; Steele CR; Pilkington NS Jr; Charlton RK: Functional capacity of marginated and bone marrow reserve granulocytes. *Infect Immun* 55: 2359-63 (1987)
63. Steinhauser ML; Hogaboam CM; Kunkel SL; Lukacs NW; Strieter RM; Standiford TJ: IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *J Immunol* 162: 392-9 (1999)
64. Stuart MC; Damoiseaux JG; Frederik PM; Arends JW; Reutelingsperger CP: Surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis of rat thymocytes precedes nuclear changes. *Eur J Cell Biol* 76: 77-83 (1998)

65. Swank GM; Deitch EA: Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 20: 411-7 (1996)
66. Tennenberg SD; Solomkin JS: Activation of neutrophils by cachectin/tumor necrosis factor: priming of *N*-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced oxidative responsiveness via receptor mobilization without degranulation. *J Leukoc Biol* 47: 217-23 (1990)
67. Terregino CA; Lubkin CL; Thom SR: Impaired neutrophil adherence as an early marker of systemic inflammatory response syndrome and severe sepsis. *Ann Emerg Med* 29: 400-3 (1997)
68. Toft P; Lillevang ST; Tonnesen E; Nielsen CH; Rasmussen JW: The redistribution of granulocytes following *E. coli* endotoxin induced sepsis. *Acta Anaesthesiol Scand* 38: 852-7 (1994)
69. Tschaikowsky K; Sittl R; Braun GG; Hering W; Rugheimer E: Increased fMet-Leu-Phe receptor expression and altered superoxide production of neutrophil granulocytes in septic and posttraumatic patients. *Clin Invest* 72: 18-25 (1993)
70. van der Poll T; Jansen J; Endert E; Sauerwein HP; van Deventer SJ: Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infect Immun* 62: 2046-50 (1994)
71. van der Poll T; Coyle SM; Barbosa K; Braxton CC; Lowry SF: Epinephrine inhibits tumor necrosis factor- α and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J Clin Invest* 97: 713-9 (1996)
72. van der Poll T; Lowry SF: Epinephrine inhibits endotoxin-induced IL-1 β production: roles of tumor necrosis factor- α and IL-10. *Am J Physiol* 273: R1885-90 (1997)
73. van Eeden SF; Klut ME; Walker BA; Hogg JC: The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods* 232: 23-43 (1999)
74. van Pelt LJ; van Zwieten R; Weening RS; Roos D; Verhoeven AJ; Bolscher BG: Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. *J Immunol Methods* 191: 187-96 (1996)
75. Verhoven B; Schlegel RA; Williamson P: Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *J Exp Med* 182: 1597-601 (1995)

76. Vermes I; Haanen C; Steffens-Nakken H; Reutelingsperger C: A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51 (1995)
77. Vespasiano MC; Lewandoski JR; Zimmerman JJ: Longitudinal analysis of neutrophil superoxide anion generation in patients with septic shock. *Crit Care Med* 21: 666-72 (1993)
78. Vincent JL; Moreno R; Takala J; Willatts S; De Mendonca A; Bruining H; Reinhart CK; Suter PM; Thijs LG: The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 22: 707-10 (1996)
79. Vowells SJ; Sekhsaria S; Malech HL; Shalit M; Fleisher TA: Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst: a comparison study of fluorescent probes. *J Immunol Methods* 178: 89-97 (1995)
80. Wakabayashi G; Gelfand JA; Jung WK; Connolly RJ; Burke JF; Dinarello CA: *Staphylococcus epidermidis* induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia. Comparison to *Escherichia coli*. *J Clin Invest* 87: 1925-35 (1991)
81. Watson RW; Redmond HP; Wang JH; Condron C; Bouchier-Hayes D: Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *J Immunol* 156: 3986-92 (1996)
82. Weiss M; Mirow N; Birkhahn A; Schneider M; Wernet P: Benzodiazepines and their solvents influence neutrophil granulocyte function. *Br J Anaesth* 70: 317-21 (1993)
83. Weiss M; Birkhahn A; Krone M; Schneider EM: Do etomidate and propofol influence oxygen radical production of neutrophils? *Immunopharmacol Immunotoxicol* 18: 291-307 (1996)
84. Weiss M; Schneider EM; Liebert S; Mettler S; Lemoine H: Vasoactive drugs inhibit oxygen radical production of neutrophils. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 19: 239-63 (1997)
85. Weiss M; Moldawer LL; Schneider EM: Granulocyte colony-stimulating factor to prevent the progression of systemic nonresponsiveness in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Blood* 93: 425-39 (1999)

86. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365-76 (1989)
87. Wenisch C; Graninger W: Are soluble factors relevant for polymorphonuclear leukocyte dysregulation in septicemia? *Clin Diagn Lab Immunol* 2: 241-5 (1995)
88. Wenisch C; Parschalk P; Hasenhundl M; Griesmacher A; Graninger W: Polymorphonuclear leucocyte dysregulation in patients with gram-negative septicaemia assessed by flow cytometry. *Eur J Clin Invest* 25: 418-24 (1995)
89. Wenisch C; Parschalk B; Weiss A; Zedwitz-Liebenstein K; Hahsler B; Wenisch H; Georgopoulos A; Graninger W: High-dose catecholamine treatment decreases polymorphonuclear leukocyte phagocytic capacity and reactive oxygen production. *Clin Diagn Lab Immunol* 3: 423-8 (1996)
90. Whyte MK; Meagher LC; MacDermot J; Haslett C: Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J Immunol* 150: 5124-34 (1993)
91. Woltmann A; Hamann L; Ulmer AJ; Gerdes J; Bruch HP; Rietschel ET: Molecular mechanisms of sepsis. *Langenbecks Arch Surg* 383: 2-10 (1998)
92. Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-6 (1980)
93. Wyllie AH; Kerr JF; Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68: 251-306 (1980)
94. Wyllie AH; Morris RG: Hormone-induced cell death. Purification and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment. *Am J Pathol* 109: 78-87 (1982)
95. Yamamoto C; Yoshida S; Taniguchi H; Qin MH; Miyamoto H; Mizuguchi Y: Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infect Immun* 61: 1972-9 (1993)
96. Yeh CJ; Hsi BL; Faulk WP: Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability studies. *J Immunol Methods* 43: 269-75 (1981)

Danksagung

Herrn PD Dr. med. Manfred Weiß danke ich für die Überlassung des interessanten Themas und die gute Betreuung. Herr Weiß nahm sich in anerkennenswerter Weise auch die Zeit für die Klärung spezieller Fragen. Herrn Dr. med. Michael Ruoff, Dr. med. Eberhard Barth und besonders Herrn Dr. med. Günther Fischer danke ich für die Unterstützung und Betreuung der Arbeiten, vor allem für die Hilfe bei Problemen mit den Computersystemen. Danken möchte ich insbesondere meinen Mitdoktoranden Mohammed Elsharkawi und Alexander Unrath. In Zusammenarbeit mit ihnen wurden die Laboruntersuchungen im Rahmen eines größeren Projektes durchgeführt, dessen Teil diese Studie war.

Frau Prof. Dr. rer. nat. Elisabeth Marion Schneider, der Leiterin der Abteilung Experimentelle Anästhesiologie und Ursula Fideler danke ich für die Etablierung des Annexin V-Tests für das Projekt. Frau Heidelinde Feist gebührt der Dank für die Unterstützung und Überwachung der Labortätigkeiten. Der Leiterin der anästhesiologischen Intensivstation Frau PD Dr. med. Heidemarie Wiedeck, ihren ärztlichen Mitarbeitern und dem Pflegepersonal möchte ich danken, daß sie die Entnahme der Proben ermöglicht haben. Besondere Dankbarkeit gebührt vor allem den Patienten auf der Intensivstation, die der Teilnahme an der Studie zugestimmt haben.

Für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die nützlichen Anregungen danke ich Markus Juchems. Für die orthographische Überprüfung bedanke ich mich bei Gabi Ströbele.

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Michael Georgieff, der das Projekt durch die Mittel seiner Abteilung unterstützt hat.