

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie der  
Universitätskliniken des Saarlandes  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. R. Larsen

---

**Einfluss der Sedativa Midazolam und Propofol auf die  
monozytäre Dysfunktion und die Zytokinantwort bei  
Intensivpatienten mit schwerer Sepsis**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Medizin

an der

Hohen Medizinischen Fakultät der  
Universität des Saarlandes

2007

vorgelegt von  
Jan Clinton Moritz Luedtke  
geboren am 28.09.1975 in Freiburg

---

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>5</b>
1.1	SUMMARY	7
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>10</b>
2.1	Geschichte der Sepsis	10
2.2	Definitionen	11
2.3	Pathophysiologie der Sepsis	14
2.3.1	Klinisches Bild der Sepsis	15
2.3.2	Molekulare Mechanismen der Sepsis	16
2.4	Bakterielle Toxine	17
2.5	Monozyten/Makrophagen	18
2.6	Zytokine	20
2.7	Analgosedierung bei Intensivpatienten	25
2.7.1	Fentanyl	26
2.7.2	Midazolam	27
2.7.3	Propofol	28
2.8	Modulation der Immunantwort durch Anästhetika	29
2.9	Fragestellung	31
<b>3</b>	<b>METHODIK</b>	<b>33</b>
3.1	Patienten mit schwerer Sepsis	33
3.1.1	Einschluss- und Ausschlusskriterien	33
3.1.2	Analgosedierung	34
3.1.3	Allgemeine Intensivtherapie	35
3.1.4	Katecholamintherapie	38
3.1.5	Intensivmedizinische Scores	38
3.1.6	Probenentnahme, Messparameter und -zeitpunkte	42
3.2	Gesunde Probanden	43
3.2.1	Probenentnahme und Messparameter	43
3.3	Probenaufarbeitung und Messmethodik	43
3.3.1	Probenaufarbeitung Sepsispatienten	44
3.3.2	Probenaufarbeitung Probanden	45
3.3.3	Durchflusszytometrische Analyse der Monozyten/Makrophagen	46
3.3.4	Messung der Zytokine mittels ELISA	49
3.4	Statistik	51
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>53</b>
4.1	Demographische Daten und SIRS-Kriterien	53
4.2	Intensivmedizinische Diagnosen und Erreger	54
4.3	Katecholamintherapie	56

<b>4.4</b>	<b>Intensivmedizinische Scores</b> .....	<b>57</b>
4.4.1	APACHE II-Score .....	57
4.4.2	MOF-Score .....	58
4.4.3	SOFA-Score .....	59
<b>4.5</b>	<b>Leukozytenzahl</b> .....	<b>59</b>
<b>4.6</b>	<b>Monozytenfunktion bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis</b> .....	<b>60</b>
4.6.1	HLA-DR-Expression der Monozyten bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis .....	60
4.6.2	CD14-Expression der Monozyten bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis: Fraktion der CD14 einfach-positiven Monozyten.....	62
4.6.3	CD14-Expression der Monozyten bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis: Fraktion der CD14 zweifach-positiven Monozyten .....	64
<b>4.7</b>	<b>Spontane Zytokinantwort bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis</b> .....	<b>66</b>
4.7.1	spontane TNF- $\alpha$ -Antwort .....	67
4.7.2	spontane IL-10-Antwort .....	67
4.7.3	spontane IL-6-Antwort .....	68
<b>4.8</b>	<b>Zytokinantwort nach <i>ex vivo</i>-Stimulation mit LPS bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis sowie nach <i>ex vivo</i>-Stimulation mit SAC-I bei Patienten mit schwerer Sepsis</b> .....	<b>70</b>
4.8.1	TNF- $\alpha$ -Antwort nach Stimulation mit LPS.....	71
4.8.2	TNF- $\alpha$ -Antwort nach Stimulation mit SAC-I.....	73
4.8.3	IL-10-Antwort nach Stimulation mit LPS .....	74
4.8.4	IL-10-Antwort nach Stimulation mit SAC-I .....	76
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>78</b>
<b>5.1</b>	<b>Kritische Wertung der Methodik</b> .....	<b>78</b>
5.1.1	Patienten mit schwerer Sepsis .....	78
5.1.2	Analgosedierung.....	81
5.1.3	Gesunde Probanden.....	82
5.1.4	Messzeitpunkte.....	82
5.1.5	Messmethodik.....	83
<b>5.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b> .....	<b>86</b>
5.2.1	Einfluss der Sedativa Midazolam und Propofol auf die Monozytenfunktion bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis .....	86
5.2.2	Einfluss der Sedativa Midazolam und Propofol auf die Zytokinantwort bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis .....	89

5.2.3	Schlussfolgerung .....	96
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>120</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>121</b>

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Nach wie vor ist die Sepsis mit all ihren Manifestationen die häufigste Todesursache auf Intensivstationen. Trotz eines immensen Zuwachses an Erkenntnissen zur Pathogenese der Sepsis bis hin zu den molekularen Mechanismen bleibt die Mortalität der Sepsis nahezu unverändert hoch. Im Zentrum der pathogenetischen Vorstellungen zur Entwicklung eines septischen Multiorganversagens steht heute die Fehlregulation potentiell protektiver Defensivsysteme des septischen Patienten. Dabei hat eine unkontrolliert überschießende Entzündungsantwort letztlich die gleichen deletären Folgen wie eine exzessive antiinflammatorische Gegenregulation, die in einer allgemeinen Immunparalyse enden kann. Charakteristisch hierfür ist die Deaktivierung der Monozyten im peripheren Blut mit einer verminderten Expression von Oberflächenmolekülen sowie einer abgeschwächten stimulierbaren Zytokinantwort.

Aus einer großen Anzahl von Studien geht hervor, dass Sedativa und Anästhetika, die während einer Operation und zur Behandlung intensivpflichtiger Patienten eingesetzt werden, die humoralen und zellulären Komponenten des Immunsystems *in vitro* beeinflussen können. Die Relevanz dieser Erkenntnisse und die möglichen beteiligten Mechanismen *in vivo* sind jedoch noch wenig erforscht. Insbesondere ist der Einfluss von Anästhetika bei Sepsispatienten relevant, die im Rahmen der intensivmedizinischen Versorgung über mehrere Tage kontinuierlich analgosediert werden. Dabei sind einer aktuellen Untersuchung zufolge Midazolam und Propofol die am häufigsten eingesetzten Sedativa auf europäischen Intensivstationen.

In der vorliegenden prospektiv randomisierten Studie wurden daher die Monozytenfunktion sowie die spontane und stimulierbare Zytokinantwort von intensivtherapiepflichtigen Patienten mit schwerer Sepsis in Abhängigkeit einer prolongierten kontinuierlichen Infusion von Midazolam oder Propofol untersucht. Es wurden 24 Patienten mit schwerer Sepsis konsekutiv aufgenommen. Ausgehend von einer einheitlichen Analgosedierung mit Midazolam/Fentanyl wurden die Patienten in die beiden gleich großen Behandlungsgruppen Midazolam/Fentanyl oder Propofol/Fentanyl randomisiert und über einen achttägigen Zeitraum untersucht. Zusätzlich wurden die Ergebnisse mit den Werten von 6 gesunden Probanden verglichen.

Die HLA-DR- und CD14-Expression der Monozyten wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zytokinkonzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 wurden mittels „Enzyme

linked immunosorbant assay“ (ELISA) gemessen. Für die *ex vivo* Stimulierung der Zytokinantwort wurde in einem Vollblutansatz sowohl gramnegatives Endotoxin (LPS) als auch grampositives Staphylokokkentoxin (SAC-I) verwendet, um zusätzlich den Einfluss des stimulierenden Bakterientoxins darstellen zu können. Zur Einschätzung der Erkrankungsschwere wurde täglich der Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (APACHE) II -Score, der Multiple Organ Failure (MOF) -Score und der Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA) -Score erhoben. Beide Patientengruppen waren im Alter vergleichbar und wiesen bei Studieneinschluss vergleichbar hohe Scorewerte auf.

Im Vergleich zu den gesunden Probanden wiesen die Patienten mit schwerer Sepsis eine signifikant verminderte monozytäre HLA-DR-Expression sowie eine signifikant niedrigere Fraktion der CD14 zweifach positiven Zellen auf. Bei den Patienten mit schwerer Sepsis führte in der ersten Hälfte des Untersuchungszeitraums Propofol, nicht aber Midazolam, zu einem signifikanten Anstieg der Fraktion der CD14 einfach positiven Zellen, einem Zelltyp der vornehmlich proinflammatorische Zytokine produziert. Parallel dazu führte Propofol, nicht aber Midazolam, in der ersten Hälfte des Untersuchungszeitraums zu einem signifikanten Anstieg der spontanen IL-6-Konzentration. Die Analyse der spontanen TNF- $\alpha$ -Antwort ergab dagegen keinen signifikanten Unterschied.

Langzeitsedierung mit Propofol, nicht aber mit Midazolam, führte im Verlauf zu einem deutlichen Anstieg HLA-DR positiver Monozyten. In einigen Studien zeigte sich bei einer verminderten monozytären HLA-DR-Expression eine reduzierte TNF- $\alpha$ -Antwort nach Stimulierung mit LPS. In der vorliegenden Studie führte Propofol zu einer signifikanten Erholung der im Vergleich zu den gesunden Probanden deutlich supprimierten LPS-stimulierten TNF- $\alpha$ - und IL-10-Freisetzung, während die Zytokinkonzentrationen bei Sedierung mit Midazolam auf einem konstant niedrigen Niveau verblieben. Es zeigte sich ferner, dass diese Erholung der Zytokinkonzentrationen keineswegs für gramnegatives LPS spezifisch war. Auch unter Stimulierung mit dem grampositiven Toxin SAC-I war ein signifikanter Anstieg der TNF- $\alpha$ - und IL-10-Freisetzung mit Propofol, nicht aber mit Midazolam zu beobachten. Das Gram-Verhalten des stimulierenden Bakterientoxins hatte keinen Einfluss auf die Zytokinantwort der Sepsispatienten.

In einigen Studien wird eine erhöhte Morbiditäts- und Letalitätsrate bei Patienten mit anhaltend niedriger HLA-DR-Expression, einhergehend mit einer herabgesetzten TNF- $\alpha$ -Freisetzung der Monozyten/Makrophagen auf eine Stimulation mit LPS gezeigt. In der vorliegenden Studie zeigte sich bei den intensivmedizinischen Scorewerten der Sepsispatienten eine Korrelation mit der sich erholenden Stimulierbarkeit der Zytokinantwort.

Propofol führte sowohl im MOF-, SOFA- als auch im APACHE II Score zu einer signifikant schnelleren Erholung der Scorewerte gegenüber der Sedierung mit Midazolam.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass Midazolam und Propofol im Rahmen der Langzeitsedierung bei Patienten mit schwerer Sepsis einen unterschiedlichen, teils konträren Einfluss auf die spontane Produktion proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine haben. In Anbetracht der Tatsache, dass sowohl hohe Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine, als auch hohe Konzentrationen antiinflammatorischer Zytokine zu einer vitalen Bedrohung führen können, ist die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen entscheidend. Dies gilt sowohl für den Verlauf einer Sepsis mit ihren unterschiedlichen Manifestationen („systemic inflammatory response syndrome“ = SIRS oder „compensatory anti-inflammatory response syndrome“ = CARS), als auch für mögliche Therapieansätze. Vor diesem Hintergrund, insbesondere bei einer möglichst individuell abgestimmten Therapie der schweren Sepsis intensivpflichtiger Patienten, kann die Wahl des geeigneten Sedativums durchaus klinische Bedeutung haben. Darüber hinaus lassen die anhaltend starke Suppression der Monozytenfunktion sowie die fehlende Erholung der stimulierten Zytokinantwort unter Sedierung mit Midazolam verbunden mit einer langsameren Erholung der intensivmedizinischen Scorewerte einen günstigeren Krankheitsverlauf unter einer Sedierung mit Propofol vermuten.

## 1.1 SUMMARY

Despite advances in the understanding of the complex pathogenesis, sepsis remains the most common cause of death in intensive care units. Systemic activation of essentially protective mechanisms may lead to autodestructive “host defense failure disease” resulting in multiple organ dysfunction. An excessive systemic inflammatory response will have similar deleterious consequences as an excessive compensatory anti-inflammatory response that may lead to a state of immunoparalysis characterised by impaired monocyte function with decreased HLA-DR expression and impaired stimulated cytokine response.

A huge number of studies have shown that many of the analgesic, sedative, and anaesthetic agents commonly used both during surgery and in critically ill patients on the intensive care unit (ICU), modify components of the immune response *in vitro*. The *in vivo* relevance of these findings and the possible mechanisms involved are much less clear. The influence of anaesthetic agents is in particular relevant in septic ICU patients, receiving continuous

analgo-sedation for several days. Pursuant to a recent study midazolam and propofol are the most commonly used sedative agents in European ICUs.

The aim of this study was to investigate monocyte function and cytokine production in critically ill patients with severe sepsis with regard to a prolonged continuous infusion of midazolam and propofol. 24 consecutive patients admitted to ICU fulfilling ACCP/SCCM criteria for severe sepsis were prospectively studied. Starting from a uniform analgo-sedation with midazolam/fentanyl at day 1 the patients were then randomly allocated to one of two equally sized groups receiving either midazolam/fentanyl or propofol/fentanyl. In addition, the results were compared to the results obtained in whole blood of 6 healthy volunteers.

Monocyte HLA-DR and CD14 expression was analyzed by flow cytometry. Cytokine concentration of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and IL-10 were assayed by „Enzyme linked immunosorbant assay“ (ELISA). The cytokine response was stimulated in whole blood cultures *ex vivo* with LPS (*E. coli* O111:B4) as gram-negative stimulus or with *Staphylococcus aureus* Cowan strain I (SAC-I) lysate as gram-positive stimulus. Measurements were taken at days 1, 2, 3, 4, and 8 after enrollment. To evaluate the severity of disease “Acute Physiology And Chronic Health Evaluation” (APACHE) II -Score, “Multiple Organ Failure” (MOF) -Score and “Sepsis-related Organ Failure Assessment” (SOFA) -Score were carried out daily. Demographic data were similar in both groups.

Compared to healthy volunteers patients with severe sepsis showed a significant decrease in monocyte HLA-DR expression and a significant decrease of CD14<sup>++</sup> monocytes. In septic patients propofol but not midazolam caused a significant increase of CD14<sup>+</sup> monocytes within the first 4 days, a cell type mainly producing pro-inflammatory cytokines. Within the same period of time propofol but not midazolam led to a significant increase of spontaneous IL-6 release. There was no significant difference in the unstimulated TNF- $\alpha$  response

Long-term sedation with propofol but not with midazolam caused an increase of HLA-DR positive monocytes. It is known from the literature that reduced monocyte HLA-DR expression is associated with reduced TNF- $\alpha$  response following stimulation with LPS. In the present study propofol but not midazolam caused a significant recovery of suppressed LPS-stimulated TNF- $\alpha$  and IL-10 response. Furthermore, it could be demonstrated that the recovery of TNF- $\alpha$  and IL-10 release during sedation with propofol was not at all specific for gram-negative LPS. A significant increase of TNF- $\alpha$  and IL-10 release could also be found by stimulation with the gram-positive toxin SAC-I during propofol sedation but not during

midazolam sedation. The gram specific behaviour of the stimulating bacterial toxin had no influence on the cytokine response in septic patients.

Increased rates for morbidity and lethality have been described for patients with continuously low monocyte HLA-DR expression, accompanied by reduced TNF- $\alpha$  release of monocytes in response to stimulation with LPS. The present study demonstrates correlation of intensive care scores in septic patients with the recovery of the stimulated cytokine response. Following treatment with propofol, MOF-, SOFA- as well as APACHE II scores showed a significantly faster recovery as compared to sedation with midazolam.

The results of the study presented suggest, that in the course of long-term sedation midazolam and propofol show a different, partially contrary influence on the spontaneous production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. Regarding the fact that high concentrations of pro-inflammatory cytokines as well as high concentrations of anti-inflammatory cytokines may lead to vital reactions, the balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is crucial not only for the course of sepsis as with its different manifestations such as SIRS and CARS but also for possibly different therapeutic approaches. In this context and in particular in regard to individually designed therapies of severe sepsis in intensive care patients, the choice of a suitable sedative agent may very well have clinical consequences. The continuous high suppression of the monocyte function as well as the missing recovery of the stimulated cytokine response under treatment with midazolam in conjunction with slower recovery of the intensive care scores may give reasons to assume a more favourable course of disease under sedation with propofol.

## 2 EINLEITUNG

Nach wie vor ist die Sepsis in ihrer klinischen Manifestation als systemische Entzündungsreaktion („systemic inflammatory response syndrome“ = SIRS) mit septischem Schock und Organdysfunktion („multiple organ dysfunction syndrome“ = MODS) die Hauptursache von Morbidität und Letalität von Intensivpatienten. Trotz aller Fortschritte der modernen Intensivmedizin und trotz eines immensen Zuwachses an Erkenntnissen zur Pathogenese ist der Verlauf der schweren Sepsis auch heute noch bei vielen Patienten, die wegen einer schweren Infektion, großen Operationen oder ausgedehnten Unfall- oder Brandverletzungen intensivmedizinisch behandelt werden müssen, tödlich [TRAN, 1990; MARSHALL 1995]. Nach aktuellen Angaben erkranken in Deutschland jährlich etwa 150.000 Einwohner an einer Sepsis; dabei entwickelt etwa die Hälfte dieser Patienten eine schwere Sepsis bzw. einen septischen Schock. Mit rund 60.000 Todesfällen pro Jahr stellen septische Erkrankungen nach der koronaren Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt die dritthäufigste Todesursache dar [BAUER, 2006]. Auch limitiert die Zunahme der Inzidenz und die persistierend hohe Letalität der Sepsis die Fortschritte neuer oder experimenteller Therapieverfahren zahlreicher Fachgebiete (z.B. Viszeralchirurgie, Transplantationsmedizin, Hämatonkologie mit Hochdosischemotherapie), die alle mit einer Erhöhung des Sepsisrisikos einhergehen.

Neben patienteneigenen biologischen Determinanten wie Alter, Geschlecht oder genetisch bedingten Alterationen des Immunsystems und neben dem chirurgischen Trauma als solches haben Anästhetika und Anästhesieverfahren einen nachhaltigen Einfluss auf die postoperative Immunantwort [STEVENSON, 1990; SHEERAN, 1997]. Dieser medikamentöse Einfluss ist insbesondere bei Sepsispatienten relevant, die im Rahmen der intensivmedizinischen Versorgung über mehrere Tage kontinuierlich intravenös analgosediert werden mit Substanzen wie Fentanyl, Propofol und Midazolam.

### 2.1 Geschichte der Sepsis

Sepsis kommt aus dem Griechischen und bedeutet Fäulnis (σηπω = faulen machen). Zurückzuführen ist dieser Begriff auf Hippokrates. Dieser beschrieb ca. 400 v.Chr. eine Krankheit, die ein bis zwei Wochen nach einer Verwundung als Fieber beginnt, „das verursacht wird durch eine Materie, die fault“, und die häufig mit dem Tod endet. Als Erklärung dieses Phänomens nahm Hippokrates eine Freisetzung von Giften aus dem

faulenden Gewebe an. Diese Hypothese zur Beantwortung der entscheidenden Frage, wie es ausgehend von einer lokalen Verletzung zu einer systemischen Entzündungsreaktion und Organschädigungen kommen kann, bzw. welche Mediatoren hierbei eine Rolle spielen, blieb als pathophysiologische Erklärung bis weit ins 19. Jahrhundert bestimmend [Übersicht in KREYMANN, 1996].

Erst um 1860 wurde mit der Begründung der modernen Mikrobiologie durch Pasteur und Koch die Grundlage für eine rationale Erklärung der Sepsis gegeben [FASQUELLE, 1986]. Bereits 1905 definierte Ziegler in seinem Lehrbuch der Pathologie die Sepsis als „eine Vergiftung des Organismus durch Toxine, Toxalbumine, Fermente und andere Produkte bakterieller Zersetzung, also eine septische Intoxikation“ [ZIEGLER, 1905]. 1914 definierte Schottmüller die Sepsis wie folgt: „eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem aus konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, derart, dass durch diese Invasion subjektiv oder objektiv Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“ Diese vielzitierte Definition der Sepsis blieb über viele Jahrzehnte die beherrschende Lehrmeinung [SCHOTTMÜLLER, 1914].

## 2.2 Definitionen

Über viele Jahre blieb der Begriff „Sepsis“ nur sehr unscharf definiert. Zwar wurde Schottmüllers Sepsisdefinition in der Folgezeit ständig variiert, nicht aber substantiell geändert. Auch wurden Begriffe wie „Septikämie“, „Sepsis-Syndrom“ o.ä. parallel oder synonym für verschiedenste Krankheitsbilder verwandt [ELEBUTE, 1983; KREYMANN, 1996]. Zwei Erkenntnisse gegen Ende der 80er Jahre führten dann zu der heute dominierenden syndromorientierten Terminologie:

Als 1987 zwei Multicenter Studien veröffentlicht wurden, in denen der Einsatz von Methylprednisolon als adjuvante Sepsistherapie geprüft worden war, stellte sich in der Diskussion dieser Studien heraus, dass die Einschlusskriterien die Studienergebnisse erheblich beeinflussen [BONE, 1987; The Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group, 1987].

Außerdem mehrten sich im gleichen Zeitraum klinische Beobachtungen, dass auch primär abakterielle Erkrankungen wie hämorrhagisch-traumatischer Schock oder Pankreatitis zur Manifestation eines „septischen“ Zustandsbildes führen konnten. So konnten Tachykardie, Tachypnoe, Fieber oder Leukozytose auch bei polytraumatisierten Patienten sowie bei

Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen unter Einsatz der Herzlungenmaschine beobachtet werden [WESTABY, 1987].

Auch für die Organfunktionsstörungen wurden Analogien zwischen infektiösen und offensichtlich nicht-infektiösen Erkrankungen festgestellt. 1988 zeigte Nuytinck durch Analysen der Autopsie- und Histologiebefunde von Patienten, die wenige Tage nach einem schweren Trauma verstarben, dass auch primär unverletzte Organe makro- und mikroskopische Zeichen einer generalisierten Entzündungsreaktion aufwiesen. Die Organe waren ödematös vergrößert und wiesen histologisch Ansammlungen polymorphkerniger Leukozyten, ein intrazelluläres und/oder ein interstitielles Ödem und z.T. auch Zellnekrosen auf [NUYTINCK, 1988]. Diese Befunde zeigen deutlich, dass

- I.** Entzündungsreaktionen nicht nur mikrobiell, sondern auch durch eine Vielzahl anderer Noxen induziert werden können
- II.** primär nicht erkrankte oder traumatisierte Organe sekundär durch inflammatorische Prozesse geschädigt werden können, im Sinne eines „remote organ failure“
- III.** durch Generalisation der Entzündungsantwort ein ursprünglich protektiver Mechanismus des Körpers zu einer eigenständigen Bedrohung des Organismus führen kann [GORIS, 1985; KOCH, 1996]

Vor diesem Hintergrund trafen 1991 Vertreter des American College of Chest Physicians (ACCP) und der amerikanischen Society of Critical Care Medicine (SCCM) in einer Konsensuskonferenz zusammen, im Bemühen um eine einheitliche und verbindliche Definition der Sepsis, die auch den neugewonnenen pathophysiologischen Erkenntnissen gerecht werden sollte. Unabhängig der Genese wird als neutraler Oberbegriff für eine systemische inflammatorische Reaktion der Begriff „systemic inflammatory response syndrome (SIRS)“ eingeführt [ACCP/SCCM Consensus Conference, 1992].

## **SIRS**

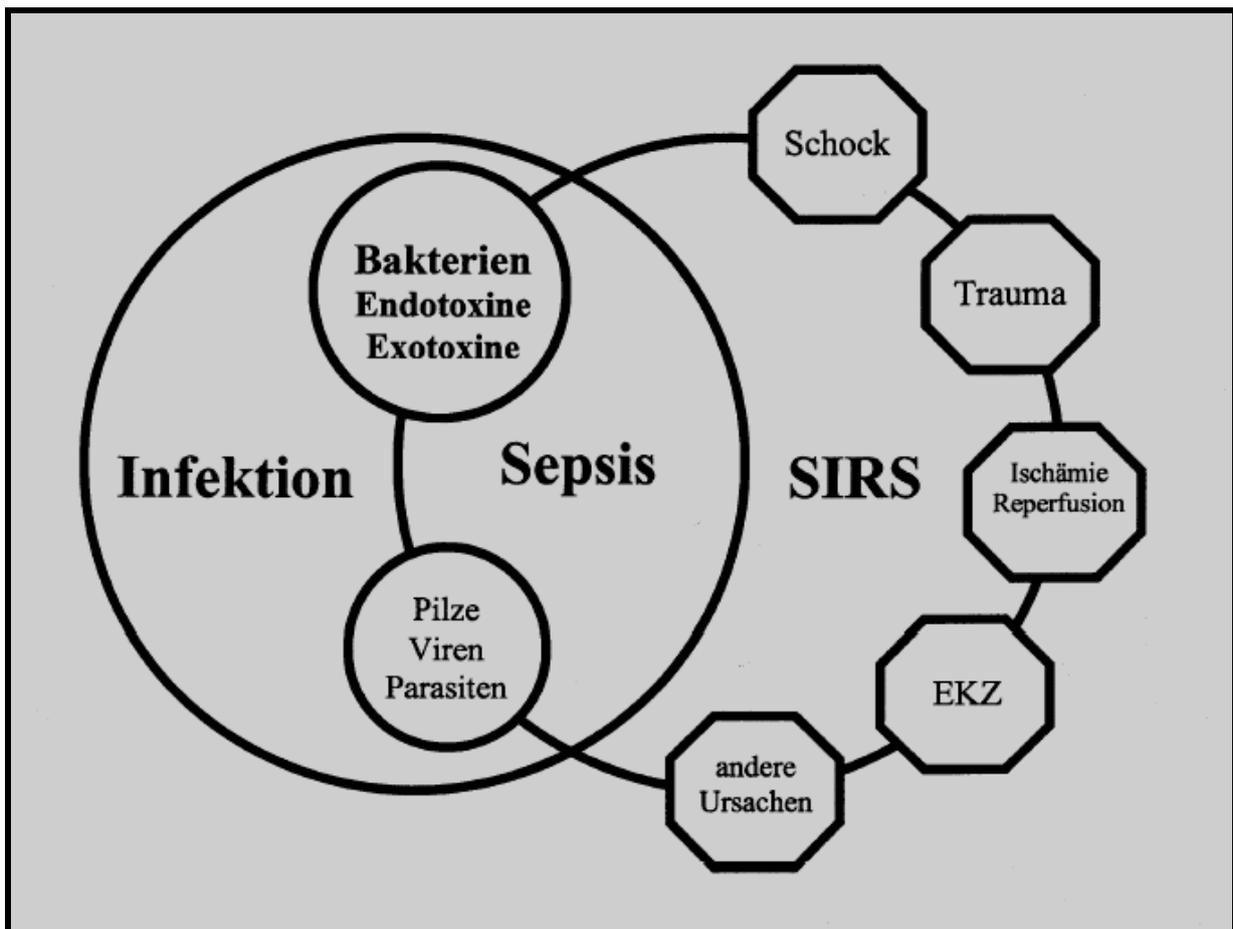
Das klinische Bild des SIRS ist gekennzeichnet durch mindestens zwei der folgenden Symptome:

- Körpertemperatur über 38°C oder unter 36°C
- Erhöhte Herzfrequenz (> 90 / min)
- Respiratorische Insuffizienz: Tachypnoe (Atemfrequenz > 20 / min) oder Hyperventilation ( $\text{PaCO}_2 < 32$  mm Hg)
- Veränderungen im weißen Blutbild: Leukozytose (> 12 000 /  $\mu\text{l}$ ) oder Leukozytopenie (< 4000 /  $\mu\text{l}$ ) oder Linksverschiebung mit mehr als 10% unreifen Neutrophilen

## Sepsis

Ist das SIRS infektionsbedingt (z.B. durch Bakterien, Viren, Pilze oder Parasiten) so handelt es sich laut Definition der Konsensuskonferenz um eine Sepsis. Auch hier müssen wieder mindestens zwei der o.g. SIRS-Kriterien vorliegen. Der Zusammenhang zwischen SIRS und Sepsis ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

Abb. 2.1: Beziehungen zwischen Infektion, SIRS und Sepsis



Modifiziert nach KOCH 1996

Um die unterschiedlichen Schweregrade einer Sepsis benennen zu können, die auch die jeweilige Prognose beeinflussen, definierte die Konsensuskonferenz zwei von einer einfachen Sepsis abzugrenzende Stadien: die schwere Sepsis und den septischen Schock.

## Schwere Sepsis

Eine schwere Sepsis ist gekennzeichnet durch eine oder mehrere der folgenden zusätzlichen Kriterien:

- Organdysfunktion
- septische Hypotension (definiert als systolischer Blutdruck unter 90 mmHg bzw. ein Druckabfall größer als 40 mmHg unter Ausgangswert)
- Hypoperfusion (klinisch erkennbar an einer Laktat-Erhöhung, Azidose, Oligurie oder einer akuten Veränderung der Bewusstseinslage)

## Septischer Schock

Persistiert die Hypotension bei einer schweren Sepsis trotz adäquater Flüssigkeitstherapie und unter Ausschluss anderer Ursachen (z.B. kardiogen, anaphylaktisch, hypovolämisch), liegt ein septischer Schock vor.

Die im Zusammenhang mit schwerer Sepsis und septischem Schock stehenden Organdysfunktionen werden entsprechend den Richtlinien der ACCP / SCCP als „multiple organ dysfunction syndrome (MODS)“ bezeichnet. Das MODS ist definiert als das Auftreten von alterierten Organfunktionen beim Akutkranken mit der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Intervention zur Aufrechterhaltung der Homöostase. Verlauf und Prognose der Sepsis hängen im Wesentlichen von der Manifestation eines MODS bzw. eines Schocks ab [BAKKER, 1996; SMITH, 1991].

## 2.3 Pathophysiologie der Sepsis

Basierend auf zahlreichen klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen haben sich die pathophysiologischen Vorstellungen der Sepsis grundlegend gewandelt. Standen in der Vergangenheit die Einwirkungen des Erregers auf den Organismus im Vordergrund, so kommt nach heutiger Auffassung der Fehlregulation primär protektiver Defensivsysteme des septischen Patienten im Sinne einer „host defense failure disease“ eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Sepsis bzw. des MODS zu [GORIS, 1985; SIEGEL, 1993; BAUER, 1996; BONE, 1996]. Initialer Auslöser einer systemischen Entzündungsreaktion ist offenbar die Aktivierung des unspezifischen Immunsystems durch Toxine pathologischer Keime, die nach Überwindung lokaler Gewebesbarrieren in die Blutbahn gelangen und zu einer exzessiven Produktion von Entzündungsmediatoren führen. Als Folge der überschießenden Inflammationsreaktion kommt es zu einer generalisierten Störung der Zell-Zellkommunikation

und subzellulärer Funktionen wie Signaltransduktion und Stressgenexpression. Als Trigger kommen bei der Sepsis neben Zellwandbestandteilen gramnegativer wie grampositiver Bakterien auch Pilze, Parasiten oder Viren in Frage.

### 2.3.1 Klinisches Bild der Sepsis

Im Initialstadium ist das klinische Bild der Sepsis geprägt von lokalen Manifestationen im Bereich des Entzündungsherds (z.B. Abszess oder Pneumonie). Im weiteren Verlauf treten systemische Ereignisse im Sinne eines SIRS hinzu, wobei Fieber und Schüttelfrost, häufig mit diskontinuierlichem Verlauf, als typische unspezifische Entzündungszeichen beobachtet werden. Die weiteren Symptome ergeben sich aus den verschiedenen Organmanifestationen. So kann sich beispielsweise eine plötzliche Veränderung der Bewusstseinslage, eine Oligurie, eine respiratorische Insuffizienz sowie ein Kreislaufschock entwickeln. Die metabolische Azidose mit Hyperlaktatämie ist das laborchemische Korrelat der schockspezifischen Störungen von Sauerstoffangebot und -verbrauch. Diese ergeben sich im Einzelnen durch pathophysiologische Veränderungen wie:

- **myokardiale Dysfunktion** mit verminderter Kontraktilität des Herzens durch negativ inotrope Eigenschaften von Stickstoffmonoxid (NO) (u.a. induziert durch TNF- $\alpha$ )
- **rechtsventrikuläre Dysfunktion** infolge einer pulmonalen Hypertonie bei ARDS
- exzessive **Vasodilatation** durch unphysiologisch hohe NO-Produktion mit systemischen wie regionalen Kreislaufveränderungen
- absolutes und relatives **intravasales Volumendefizit** durch:
  - Umverteilung des Volumens aufgrund eines erhöhten venösen Poolings
  - Anstieg der Kapillarpermeabilität mit Flüssigkeitsverlust in den interstitiellen Raum
  - Erhöhte Verluste via Kutis und Ventilation
  - Verminderte Flüssigkeitsaufnahme
- unphysiologische Verteilung des **HZV** auf die verschiedenen Organe (v.a. zu Lasten des Gastrointestinaltrakts mit konsekutiver Hypoxie und intramukosaler Azidose gefolgt von einer erhöhten mukosalen Permeabilität mit bakterieller Translokation)
- ausgeprägte **Mikrozirkulationsstörungen** durch:
  - vasogene Faktoren wie Thromboxane, Prostazykline, Endothelin und NO
  - Verbrauchskoagulopathie (DIC)
  - „Leukozyten-Sticking“
  - Endothelschwellung und Gewebeödem

Im Frühstadium der Sepsis sind die Organdysfunktionen als Folge von Herz-Kreislaufstörungen noch prinzipiell reversibel, während das etablierte Organversagen im

Spätstadium der Sepsis prognose- und verlaufsentscheidend ist. Dabei zeigt der klinische Verlauf der Sepsis, dass die Entwicklung von Komplikationen, insbesondere des MODS, bei vergleichbaren Bedingungen wie Schwere des Traumas, Alter, oder Vorerkrankungen der Patienten, einer erheblichen interindividuellen Variabilität unterliegt. [BAUER, 1996; REINHART, 2001]

### **2.3.2 Molekulare Mechanismen der Sepsis**

Die molekularen Mechanismen der Entzündungsantwort sind am besten untersucht bei der Infektion mit gramnegativen Bakterien:

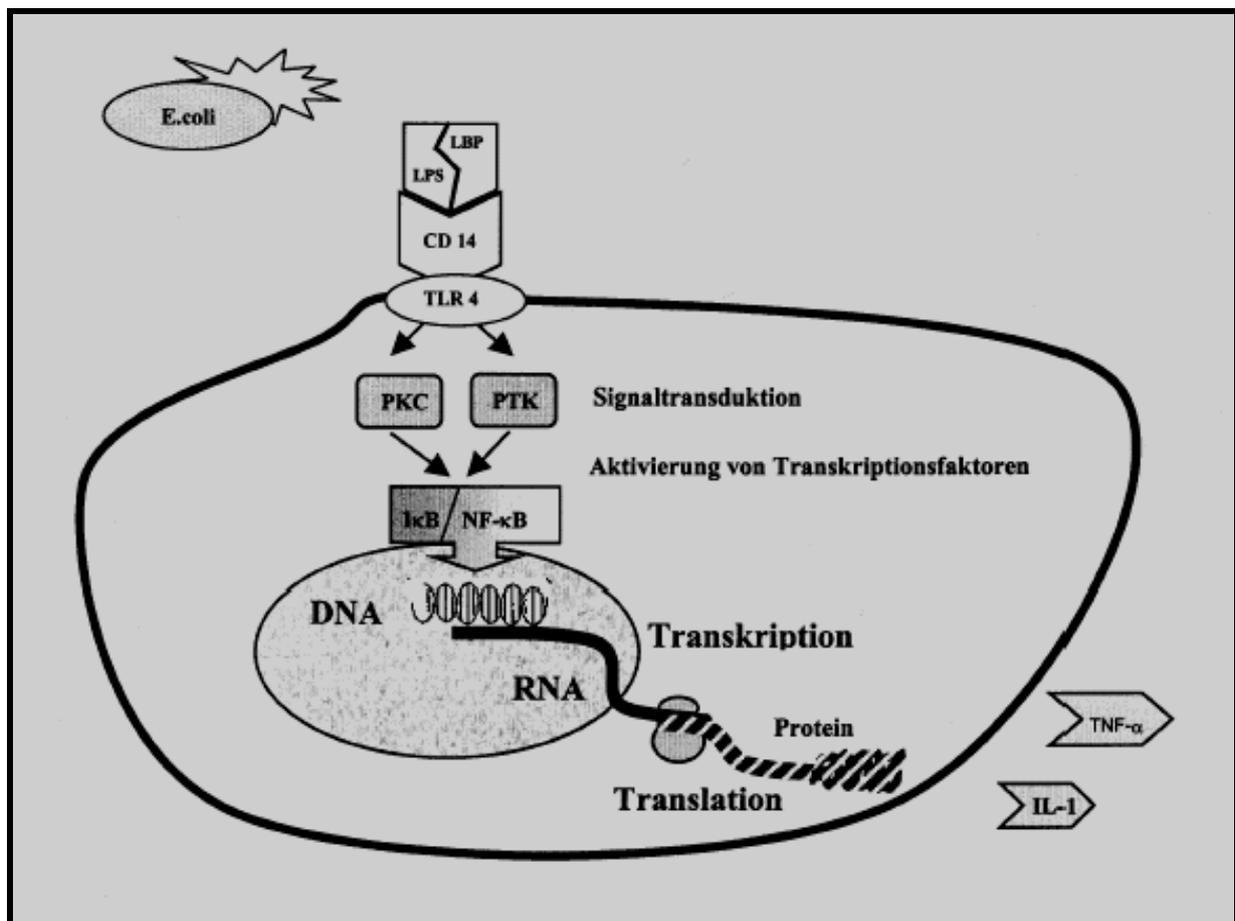
Aus der Zellwand gramnegativer Bakterien wird nach Lyse durch immunkompetente Zellen oder auch durch bakterizide Antibiotika Lipopolysaccharid (LPS) freigesetzt. Das Endotoxin LPS wird nun an das LPS-bindende Protein (LBP), ein in der Leber synthetisiertes Akute-Phase-Protein, gekoppelt [BEUTLER, 2001]. Der so entstandene LPS-LBP-Komplex interagiert dann mit dem CD14-Rezeptor zirkulierender Monozyten oder gewebeständiger Makrophagen (CD= "cluster of differentiation"; international einheitliche Nomenklatur für Zelloberflächenmarker) [WRIGHT, 1990]. Auch können über lösliche CD14-Rezeptoren, nach deren Bindung an LPS/LBP, Endothelzellen aktiviert werden, die primär nicht in der Lage sind, diesen Oberflächenrezeptor zu exprimieren [ULEVITCH, 1995].

Nach erfolgter Bindung von LPS/LBP an den CD14-Rezeptoren von Monozyten/Makrophagen ist an der Initiierung der intrazellulären Signaltransduktion ein weiteres transmembranöses Rezeptorprotein beteiligt. Aufgrund seiner Ähnlichkeit mit dem Drosophila-Protein Toll, wird dieses Rezeptorprotein als "Toll-like"-Rezeptor 4 (TLR4) bezeichnet. Derzeit sind 10 TLR bekannt. Der Ligand für TLR4 ist das gramnegative Endotoxin während TLR2 verschiedene grampositive Zellwandbestandteile bindet [ADEREM, 2001; EDELMAN, 2006; LIEN, 2002].

Durch die Bindung des LPS-LBP-Komplexes an die Oberflächenrezeptoren CD14 und TLR4 wird eine intrazelluläre Signaltransduktionskaskade stimuliert, die auf einem komplexen Zusammenspiel von Proteinkinasen und Proteinphosphatasen beruht [HUNTER, 1995 und 2000]. Insbesondere unter dem Einfluss der Proteinkinase C (PKC) und der Proteintyrosinkinase (PTK) kommt es zu einer Phosphorylierung von I $\kappa$ B, der inhibitorischen Untereinheit des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (nuklärer Faktor- $\kappa$ B) [GENG 1993, MELLOR 1998, SHAPIRA 1994, WEST 1997]. Durch die Phosphorylierung wird I $\kappa$ B inaktiviert und damit NF- $\kappa$ B aktiviert [BAEUEERLE 1998, WULCZYN 1996]. Es folgt eine gesteigerte

Transkription abhängiger Gene, die mit einer vermehrten Zytokinproduktion einhergeht. So führt die Stimulation mit LPS zu einer etwa 100fachen Zunahme der mRNA-Konzentration und einer erneut um den Faktor 100 höheren Sekretionsleistung des Makrophagen für Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [BEUTLER 1985]. Neben TNF- $\alpha$  kommt es außerdem zu einer verstärkten Expression diverser Interleukine (IL), die dann entweder in der Zelle verbleiben oder aber von der Zelle abgegeben werden (Abbildung 2.2).

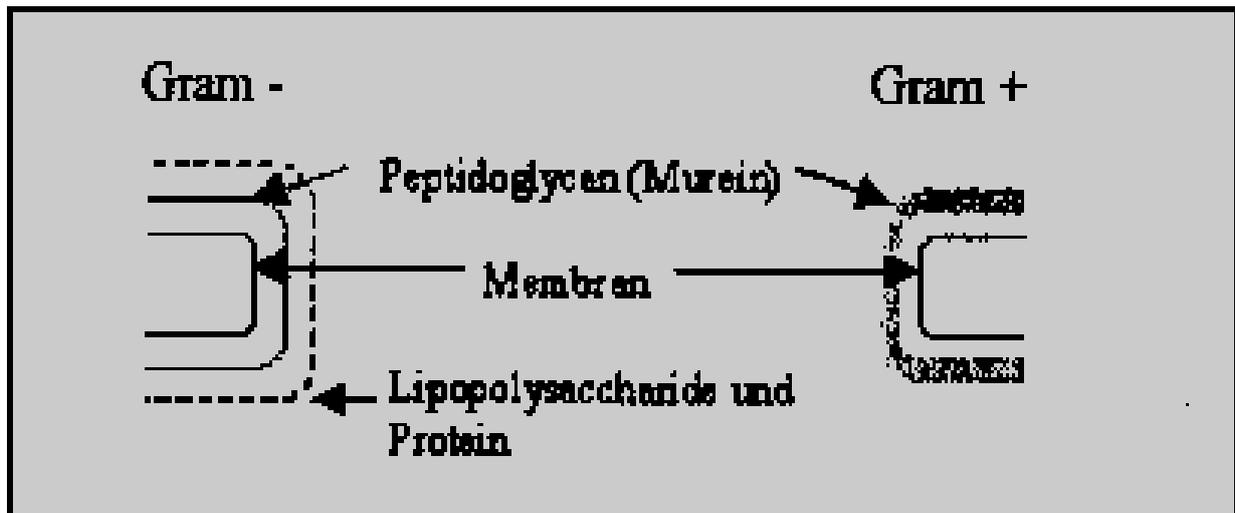
Abb. 2.2: Kaskade der Signaltransduktion; Erläuterung im Text



## 2.4 Bakterielle Toxine

Die wichtigste Differentialfärbung zur mikroskopischen Darstellung von Bakterien stellt die Gram-Färbung dar. Entwickelt wurde diese Färbemethode Ende des 19. Jahrhunderts von dem dänischen Arzt und Bakteriologen Hans Christian Gram. Aus diesem so genannten Gram-Verhalten folgt eine Einteilung in grampositive Bakterien, die violett/blau erscheinen, und gramnegative Bakterien, die rot gefärbt werden (Abbildung 2.3).

Abb. 2.3: Gram-Verhalten: Aufbau von Zellwand und Kapsel gramnegativer und grampositiver Bakterien [Pschyrembel, 1998]



Das Wiederaufleben grampositiver bakterieller Infektionen hat einen dramatischen Wechsel im Prävalenzmuster nosokomialer Infektionen nach sich gezogen. 50% aller Sepsisfälle sind mittlerweile durch grampositive Bakterien bedingt mit steigender Tendenz [WENZEL, 1988; PINNER, 1996; SOLOMKIN, 2001]. Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren sind die beiden Hauptzellwandkomponenten grampositiver Bakterien. Diese spielen eine entscheidende Rolle in der Initiierung der deletären Zytokinantwort, die mit Sepsis und MODS assoziiert ist.

Um dieser Entwicklung Rechnung zu tragen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Zytokinantwort neben gramnegativem LPS auch mit dem grampositiven Lysat aus *Staphylococcus aureus* (SAC-I = *Staphylococcus aureus* Cowan strain-I-lysate) stimuliert.

## 2.5 Monozyten/Makrophagen

In der Pathophysiologie der Sepsis nehmen die Monozyten/Makrophagen eine zentrale Stellung ein. Nach ihrer Differenzierung aus den myeloischen Stammzellen des Knochenmarks gelangen sie zunächst als Monozyten in die Blutbahn. Innerhalb weniger Tage treten sie ins Gewebe über und verbleiben dort als ortständige Makrophagen. Dort steuern sie im Rahmen der lokalen Immunabwehr die Reparatur verletzter Strukturen über die sequentielle Freisetzung verschiedener humoraler Faktoren. Die induzierte Expression von Adhäsionsrezeptoren führt zur Granulozyteninfiltration, die Freisetzung von Wachstumsfaktoren fördert die Angiogenese und die Narbenbildung [BAUER, 1996]. Auch nehmen diverse Chemokine, wie „monocyte inflammatory proteins (MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ )“ oder

„monocyte chemoattractant proteins (MCP-1 bis MCP-5)“ Einfluss auf die monozytäre Immunantwort [LUSTER, 1998]. Bei Überschreiten eines kritischen Schwellenwerts erfolgt die Freisetzung von Zytokinen, in deren unmittelbarer Folge z.B. TNF- $\alpha$  lokal die phagozytotische Aktivität der neutrophilen Granulozyten hochreguliert [KLEBANOFF, 1986; LARRICK, 1987]. Im Verlauf der systemischen Entzündungsreaktion sind es vor allem die Monozyten/Makrophagen, die unmittelbar nach Toxinexposition aktiviert werden, erste Zytokine freisetzen und die weitere Zytokinantwort initiieren. Gleichzeitig stellen sie quantitativ die bedeutendste Quelle für Proteasen und Sauerstoffradikale dar [ROTHER, 1999].

Im Rahmen der Bakterientoxin-stimulierten Entzündungsantwort der Sepsis spielt der eingangs beschriebene CD14-Rezeptor der Monozyten/Makrophagen eine entscheidende Rolle. Nach ZIEGLER-HEITBROCK können die Monozyten/Makrophagen bezüglich ihrer Expressionsdichte des Oberflächenrezeptors CD14 in zwei Subpopulationen aufgeteilt werden: in Zellen mit niedriger Expressionsdichte (CD14 einfach-positive Zellen; CD14<sup>+</sup>), ein Phänotyp, der vorwiegend proinflammatorische Zytokine produziert und Zellen mit hoher Expressionsdichte (CD14 zweifach-positive Zellen; CD14<sup>++</sup>), die primär für die antiinflammatorische Zytokinantwort nach Endotoxin-Stimulation verantwortlich sind [ZIEGLER-HEITBROCK, 1988; PASSLICK, 1989; FRANKENBERGER, 1996].

Ein weiteres bedeutendes Oberflächenmolekül der Monozyten/Makrophagen ist das HLA-DR (human leukocyte locus A system). Es gehört zur Gruppe der MHC („Major Histocompatibility Complex“) Moleküle der Klasse II, welche die HLA-D Genloci repräsentieren und nur von Zellen exprimiert werden, die zur Antigenpräsentation befähigt sind. Exogene Antigene werden, nach Phagozytose und intrazellulärer Aufbereitung, als Antigen-HLA-DR-Komplex von T-Helfer-Zellen erkannt. In der Folge initiieren die sensibilisierten T-Helfer-Zellen die Differenzierung der B-Lymphozyten zu antikörperbildenden Plasmazellen. Die MHC-Klasse-II-Expression ist für die Immunkompetenz von entscheidender Bedeutung. Eine verminderte HLA-DR-Expression gilt als Marker für die Deaktivierung der Monozyten/Makrophagen [AYALA, 1996; VOLK, 1996], wobei die gestörte Antigenpräsentation als Hauptursache der erhöhten Infektanfälligkeit im Verlauf der Sepsis anzusehen ist [BAUER, 1996].

Als phagozytierende und antigen-präsentierende Zellen sowie in ihrer Funktion als Produzenten diverser Zytokine stehen die Monozyten/Makrophagen an der Schnittstelle von unspezifischem und spezifischem Immunsystem. Störungen dieser vulnerablen Funktionen gelten als zentrale Determinanten systemischer Entzündungsreaktionen.

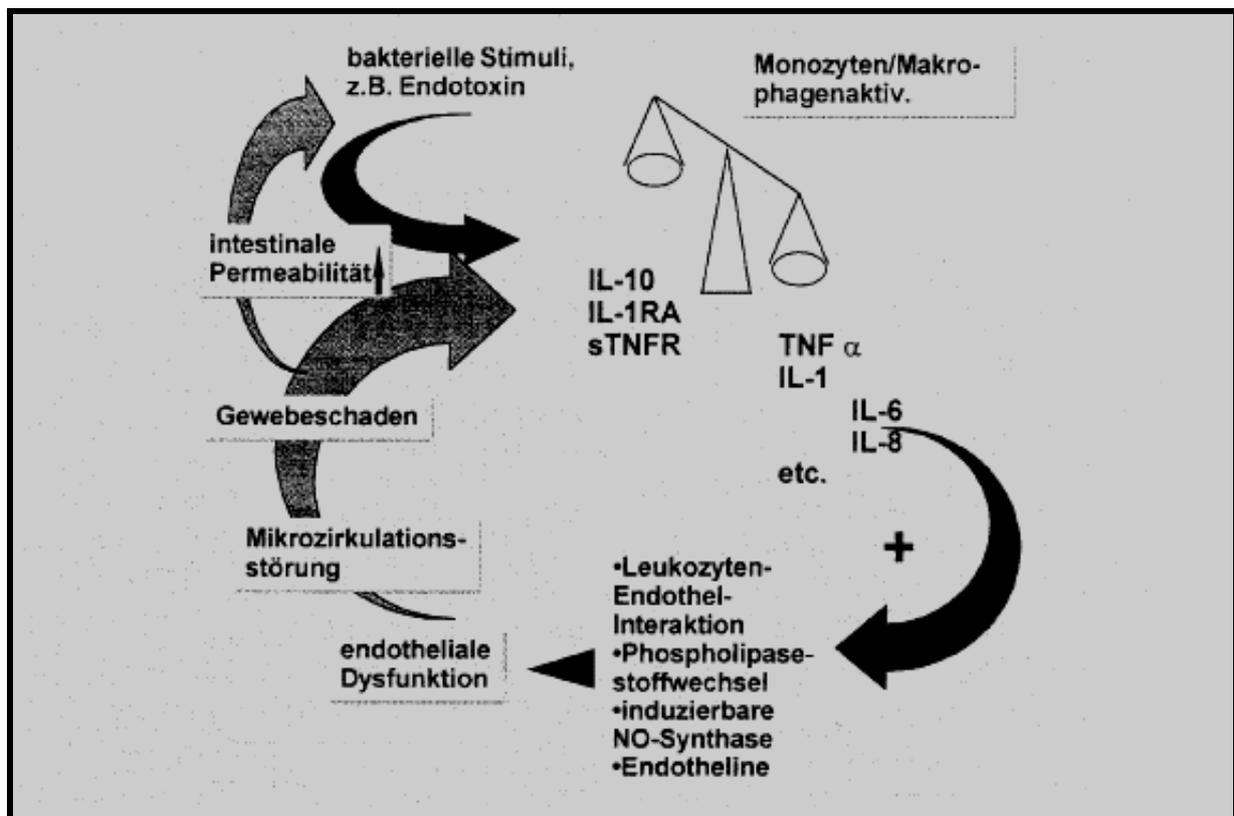
## 2.6 Zytokine

Zytokine sind pluripotente Polypeptide kleiner Molekülgröße mit einem Molekulargewicht von unter 50 kDa und werden von immunkompetenten Zellen produziert, v.a. von Monozyten/Makrophagen aber auch von Endothelzellen oder diversen Parenchymzellen. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion nehmen Zytokine eine bedeutende Rolle ein. Über die Beeinflussung zellulärer und humoraler Reaktionen können sie Dauer und Intensität der Immunantwort entscheidend beeinflussen. Man unterteilt die Zytokine grob in zwei Gruppen: Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 haben vorwiegend entzündungsverstärkende Eigenschaften und zählen zu den sogenannten proinflammatorischen Zytokinen. Bei Zytokinen wie z.B. IL-1-Rezeptorantagonist (IL-1RA), IL-4 oder IL-10 überwiegen entzündungshemmende Wirkungen. Sie gehören folglich zur Gruppe der antiinflammatorischen Zytokine. Eine strenge Einteilung der Zytokine in eine der beiden Gruppen ist allerdings nicht möglich [SHEERAN, 1997]. Die Wirkung der Zytokine auf die jeweilige Zielzelle erfolgt über spezifische Zytokinrezeptoren, wobei unter physiologischen Bedingungen die autokrinen und parakrinen Effekte, im Sinne einer Zell-Zell-Kommunikation, im Vordergrund stehen [FONG, 1990]. So spielen z.B. die lokalen Wirkungen der proinflammatorischen Zytokine bei der Demarkation von Abszessen sowie bei der lokalen Regulation von Reparationsvorgängen eine zentrale Rolle [ECHTENACHER, 1990]. Es kommt hierbei zur Migration von Neutrophilen, Lymphozyten und Monozyten an den Entzündungsort, ermöglicht durch eine gesteigerte Endothelpermeabilität und unterstützt durch Adhäsionsmoleküle [MENGER, 1998] und chemotaktische Zytokine (sog. „Chemokine“) wie z.B. IL-8 [LUSTER, 1998]. Im Gegensatz zu diesen primär protektiven lokalen Effekten kommt es im Rahmen einer Sepsis zu einer überschießenden Freisetzung von TNF- $\alpha$  und anderen proinflammatorischen Zytokinen mit einer verstärkten systemischen (endokrinen) Wirkung. Nach heutigem Verständnis kommt dieser häufig zu beobachtenden "Zytokinämie" eine zentrale Bedeutung in der Pathogenese des septischen MODS zu [BAUER, 1996].

Die individuelle Immunantwort wird durch eine komplexe Interaktion synergistisch und antagonistisch wirkender Abschnitte des Zytokinnetzwerks moduliert, dessen einzelne Komponenten vielfältige und von Konzentration und Zielzelle abhängige Wirkungen entfalten können. Entscheidend für den Ablauf eines physiologischen Krankheitsprozesses ist die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen [MCBRIDE, 1998]. So kann die Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine das frühe proinflammatorische Signal der Monozyten/Makrophagen beenden und dadurch den Organismus vor den deletären Folgen einer überschießenden Entzündungsantwort (SIRS) schützen [RENSING, 2001]. Aber auch

das andere Extrem, eine exzessive antiinflammatorische Gegenreaktion kann den Patienten vital bedrohen. Es kommt zur Immunparalyse mit einer verminderten HLA-DR-Expression der Monozyten/Makrophagen mit konsekutiver reduzierter Antigenpräsentation und reduzierter Produktion proinflammatorischer Zytokine mit gesteigerter Infektanfälligkeit des Organismus [ERTEL, 1995]. Dieses Krankheitsbild wird als "compensatory anti-inflammatory response syndrome" (CARS) bezeichnet [BONE, 1996].

**Abb. 2.4:** Initiale Triggerung einer systemischen Entzündungsreaktion [BAUER, 1996]; Erläuterung im Text



Die Frühphase der systemischen Entzündungsantwort (SIRS) ist gekennzeichnet durch eine exzessive Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1. Diese sogenannten "proximalen" oder "Alarmzytokine" werden bereits innerhalb der ersten Stunde nach LPS-Kontakt der Monozyten/Makrophagen ausgeschüttet. Sie stimulieren in der Folge, im Sinne eines positiven "feed back"-Mechanismus, die Freisetzung weiterer "distaler" Zytokine wie IL-6 und IL-8 [REDL, 1993; RENSING, 2001]. Obwohl gleichzeitig auch eine Gegenregulation eingeleitet wird im Sinne einer vermehrten Sezernierung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10, IL-4, IL-1RA oder transformierender Wachstumsfaktor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), ist die beobachtete systemische Entzündungsreaktion Resultat

eines Nettoüberwiegens bzw. einer ungenügenden Kontrolle proinflammatorischer Mediatorwirkungen (Abbildung 2.4). Im folgenden sollen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zytokine näher dargestellt werden:

### **Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

Die Bezeichnung „tumor necrosis factor“ beruht auf der Entdeckung von Carswell und Mitarbeitern aus dem Jahre 1975, dass dieser Serumfaktor zur Nekrose von transplantierten Tumoren führen kann [CARSWELL, 1975]. Lokalisiert ist der humane Genlocus für TNF- $\alpha$  auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, im Bereich des „major histocompatibility complex“ (MHC). Initial wird TNF- $\alpha$  als 26 kDa-Prohormon synthetisiert. Nach Acylierung als Typ-II-Membranprotein kann TNF- $\alpha$  über eine N-terminale hydrophobe Domäne an die Zellmembran gebunden und dort partiell gespeichert werden [SHEERAN, 1997; TRACY, 1993]. Aus dem Prohormon entsteht nach Abspaltung ein inaktives 17 kDa-Polypeptid, das erst durch Trimerisierung als TNF- $\alpha$  biologisch aktiv wird [SMITH, 1987].

TNF- $\alpha$  übernimmt im Rahmen der Entzündungsantwort die Rolle eines zentralen Mediators. Zu einer messbaren Freisetzung von TNF- $\alpha$  kommt es bereits wenige Minuten nach Endotoxinkontakt. Innerhalb von 1 h nach LPS-Gabe konnten bei gesunden Probanden Plasmakonzentrationen von 1000 pg/ml TNF- $\alpha$  erreicht werden [LIN, 1999]. TNF- $\alpha$  initiiert die Synthese weiterer Zytokine wie IL-1, IL-6 und IL-8, die ihrerseits wieder die biologischen Effekte von TNF- $\alpha$  verstärken können. So zeigten Fong und Mitarbeiter in einem Tiermodell, dass durch Vorbehandlung mit monoklonalen anti-TNF-Antikörpern die durch E. coli-Injektion induzierbare Freisetzung von IL-1 $\beta$  und IL-6 vermindert werden konnte [FONG, 1989].

In einer Vielzahl von Untersuchungen konnte die Bedeutung von TNF- $\alpha$  für die Pathogenese von Sepsis und Organversagen gezeigt werden. So wurden bei Patienten mit Karzinomkrankungen, denen rekombinantes TNF- $\alpha$  infundiert wurde, die typischen Zeichen eines generalisierten Inflammationssyndroms wie Fieber, Leukozytose und hämodynamische Instabilität beobachtet, verbunden mit einer Beeinträchtigung von Oxygenierungsindex sowie Leber- und Nierenfunktion [CHAPMAN, 1987; RENSING, 2001; SELBY, 1987]. Bereits Anfang der 90er Jahre berichteten verschiedene Arbeitsgruppen, dass TNF- $\alpha$ , aber auch IL-1 $\beta$  und IL-6 bei Patienten mit septischem Schock in höheren Konzentrationen nachweisbar waren als bei Patienten mit einem hämorrhagischen Schock [ENDO, 1992]. Auch wurden höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen bei Intensivpatienten mit Sepsis gemessen im Vergleich zu Patienten, die z.B. nach Myokardinfarkt oder wegen dekompensierter Herzinsuffizienz intensivtherapiepflichtig waren [CASEY, 1993].

**Interleukin-6 (IL-6)**

Das 21 kDa-Glykoprotein Interleukin-6 kann von verschiedenen Zellen synthetisiert werden, u.a. von Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten und Fibroblasten. Die Wirkung von IL-6 resultiert aus einer Interaktion mit einem spezifischen Rezeptorkomplex, der aus einem 80 kDa-Rezeptorprotein und einem 130 kDa-Glykoprotein besteht, wobei die Anwesenheit des Glykoproteins offensichtlich für eine effektive Signaltransduktion erforderlich ist [HIBI, 1990; SHEERAN 1997]. IL-6 nimmt im Rahmen der Entzündungsantwort verschiedene Funktionen wahr. So induziert IL-6 die Produktion der Akute-Phase-Proteine in der Leber, aktiviert B- und T-Lymphozyten, wirkt modulierend auf die Hämatopoese, aktiviert das Gerinnungssystem und wirkt schließlich auch eigenständig als Pyrogen [BORDEN, 1994; DINARELLO, 1989; VAN DER POLL, 1994].

Verschiedene Stimuli bedingen eine Freisetzung von IL-6, wobei TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Endotoxin potente Aktivatoren darstellen [FONG, 1989; HACK, 1989]. So wurden in der oben genannten Studie von Lin und Mitarbeitern ca. 2 h nach LPS-Injektion IL-6-Plasmakonzentrationen von über 1400 pg/ml bei gesunden Probanden gemessen [LIN, 1999]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen verschiedene klinische Untersuchungen, bei denen IL-6 nach Stressereignissen wie Trauma oder Verbrennung, Operation oder bei Sepsis in z.T. hohen systemischen Konzentrationen nachweisbar war [FRIELING, 1995; GRZELAK, 1996; MARTIN, 1994; RODRIGUEZ, 1993]. Von allen Zytokinen scheint bei Sepsis IL-6 am besten mit Schweregrad und Prognose der Erkrankung zu korrelieren [FRIELING, 1995; GARDLUND, 1995; SULLIVAN, 1992].

**Interleukin-10 (IL-10)**

Fiorentino beschrieb 1989 einen Faktor, der von T<sub>H2</sub>-Zellen sezerniert wird und die Synthese von  $\gamma$ -IFN in T<sub>H1</sub>-Klonen hemmt. Dieser ursprünglich als „cytokine synthesis inhibiting factor“ (CSIF) benannte Mediator wurde als Interleukin 10 in die Zytokinnomenklatur aufgenommen.

Das 18 kDa-Polypeptid IL-10 gehört im Gegensatz zu TNF- $\alpha$  zu der Gruppe der antiinflammatorischen Zytokine. IL-10 kann wirkungsvoll die Effektorfunktion der Monozyten/Makrophagen inhibieren, u.a. durch Hemmung der Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-8 [BLACKWELL, 1996; FIORENTINO, 1991; KLAVA, 1997]. Außerdem stimuliert IL-10 die Produktion anderer antiinflammatorischer Moleküle wie IL-1-Rezeptorantagonist, sodass daraus in der Summe eine ausgeprägte antiinflammatorische Aktivität resultiert [CASSATELLA 1994]. In der oben genannten Untersuchung an gesunden Probanden konnten Lin und Mitarbeiter zeigen, dass die durch LPS-Gabe induzierbare Inflammationsreaktion letztendlich auch zu einer

messbaren Freisetzung von IL-10 führt. Dabei wurde das Maximum der IL-10-Antwort nach 3 h und damit zeitlich nach dem von TNF- $\alpha$  und IL-6 beobachtet. Weiterhin legen mehrere Untersuchungen nahe, dass IL-10 selektiv die HLA-DR-Expression von Monozyten unterdrücken und damit die Interaktion mit den T-Lymphozyten stören kann [GIANNOUDIS, 2000; KLAVA 1997; SPITTLER, 1995]. Außerdem kann IL-10 offensichtlich über den CD95-Signaltransduktionsweg Apoptose in Monozyten induzieren, sodass auch die Apoptoseregulation als weiterer antiinflammatorischer Mechanismus diskutiert werden kann [SCHMIDT, 2000].

**Tabelle 2.1: Übersicht über die Wirkungen und Synthesorte von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10**

Zytokin	Syntheseort	Wirkung
<b>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)</b>	Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Natürliche Killerzellen, Mastzellen, Endothelzellen, Keratinozyten, Astrozyten, Mikrogliazellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten	Fieber, HZV $\uparrow$ , SV $\downarrow$ , Tachykardie, Induktion von Adhäsionsmolekülen, Lymphozytopenie, Monozytopenie, Aktivierung und Erhöhung der zirkulierenden Zahl neutrophiler Granulozyten, Gerinnungsaktivierung, Schlafinduktion, Induktion der Akute-Phase-Reaktion, Induktion der endokrinen Stressantwort (CRH $\uparrow$ ), Glykogenolyse, Hemmung der Lipoproteinlipase, Apoptose, Induktion der distalen „Zytokinkaskade“
<b>Interleukin-6 (IL-6)</b>	Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, Hepatozyten, Fibroblasten, Keratinozyten	Induktion der Akute-Phase-Reaktion, Hämatopoese, Differenzierung von B-Lymphozyten, Regulation der B- und T-Lymphozytenfunktion, synergische Wirkung mit TNF- $\alpha$ , Freisetzung von TNFR, Hemmung der TNF- $\alpha$ Genexpression
<b>Interleukin-10 (IL-10)</b>	Monozyten, Makrophagen, Keratinozyten, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten	HLA-DR-Expression $\downarrow$ , TNF- $\alpha$ $\downarrow$ , IL-1 $\downarrow$ , IL-8 $\downarrow$ , PGE2 $\downarrow$ , verminderte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, Aktivierung des Wachstums und der Differenzierung von B-Lymphozyten

Modifiziert nach BAUER 1998

IL-10 konnte in verschiedenen klinischen Untersuchungen sowohl bei Patienten mit Sepsis bzw. mit septischem Schock, als auch bei Patienten nach großen chirurgischen oder

orthopädischen Eingriffen nachgewiesen werden [DERKX 1995, GIANNOUDIS 2000, GOMEZ-JIMENEZ 1995, MARCHANT 1994, OGATA 2000]. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist das antiinflammatorisch wirksame IL-10 offensichtlich integraler Bestandteil der Entzündungsantwort nach Infektion oder chirurgischem Trauma. Tabelle 2.1 bietet einen Überblick über die Hauptwirkungen der oben beschriebenen Zytokine.

## 2.7 Analgosedierung bei Intensivpatienten

Ähnlich wie die maschinelle Beatmungs- oder die Ernährungstherapie gehören heute auch Analgesie und Sedierung zu den Standardtherapieverfahren beim Intensivpatienten. Ziel der Analgosedierung ist es, den Patienten vor zahlreichen stress- und schmerzbedingten Stimuli zu schützen, sowie die Gewährleistung von Anxiolyse, nächtlichem Schlaf und Amnesie [MURDOCH, 2000; SHAPIRO, 1995]. Außerdem trägt die Sedierung zur Reduktion des sympathischen Tonus, der Senkung des Sauerstoffverbrauchs in kritischen Situationen und somit indirekt zur Stabilisierung der Hämodynamik bei [SYDOW, 1999]. Das ideale Sedierungslevel mag von Patient zu Patient variieren, doch gilt als allgemeines Idealbild ein schmerz- und angstfreier, sedierter und doch weckbarer, kooperativer Beatmungspatient [PRIEN, 2000; TUNG, 1995; YOUNG, 2000]. Die richtige Dosierung ist dabei von hoher Wichtigkeit, da sowohl eine inadäquate Schmerzbehandlung wie auch eine Unter- oder Übersedierung den Heilungsprozess des Intensivpatienten negativ beeinflussen können [SHAFER, 1998]. Die Anwendung einer Sedierungsskala führt zu einer Reduktion der Anzahl der Patienten mit exzessiver Sedierung [DETRICHE, 1999]. Die am häufigsten eingesetzte Sedierungsskala ist dabei die Ramsay-Skala, wahrscheinlich auch wegen ihrer leichten Anwendbarkeit in der Praxis.

Einer aktuellen Untersuchung zufolge kommen auf europäischen Intensivstationen derzeit meist Midazolam oder Propofol zur Sedierung und Fentanyl oder Morphin als Opioidanalgetika zur Anwendung. Midazolam wurde dabei von 63% der befragten Intensivmediziner oft oder immer benutzt, Propofol von 35% und Fentanyl und Morphin von jeweils 33% [SOLIMAN, 2001]. Es zeigten sich teilweise erhebliche landesspezifische Unterschiede im Gebrauch der einzelnen Substanzen. So wird z.B. in Norwegen und Frankreich fast ausschließlich Midazolam eingesetzt; auch in den Niederlanden, Österreich und Deutschland wird Midazolam als Sedativum bevorzugt. In den übrigen Staaten hält sich der Gebrauch von Midazolam und Propofol in etwa die Waage. Morphin ist das dominierende Analgetikum in Norwegen und in der Schweiz. Favorisiert wird Morphin

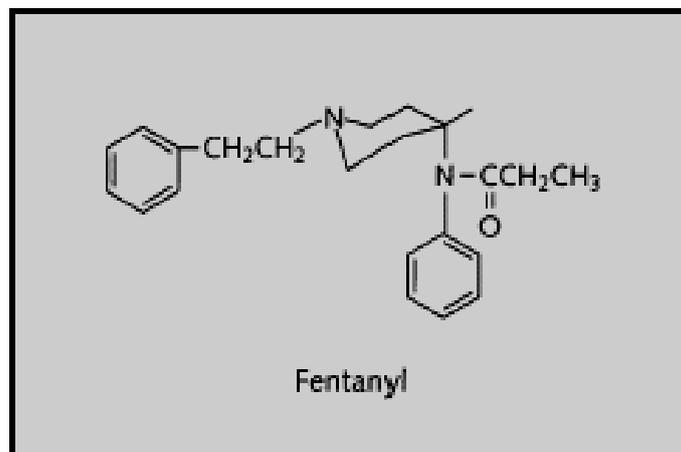
außerdem in Großbritannien, Irland, Schweden und Spanien, während in Deutschland, Frankreich und Italien Fentanyl bevorzugt wird [MURDOCH, 2000].

Im folgenden soll kurz auf die Pharmakokinetik der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Sedativa Midazolam und Propofol sowie des als Hintergrundanalgetikum verabreichten Fentanyl eingegangen werden:

### 2.7.1 Fentanyl

Bereits 1961 wurde Fentanyl als das erste synthetische Opioid auf dem deutschen Markt eingeführt. Das Anilinopiperidinderivat Fentanyl (Phenylethyl-propionyl-anilinopiperidin), chemisch dem Pethidin verwandt, ist pharmakologisch wie Morphin ein  $\mu$ -Rezeptoragonist mit einer ca. 125fach stärkeren analgetischen Wirkung. Seine intrinsische Potenz ist dabei nur unwesentlich stärker als diejenige von Morphin [LEYSEN, 1983; STAHL, 1977].

Abb. 2.5: Strukturformel von Fentanyl



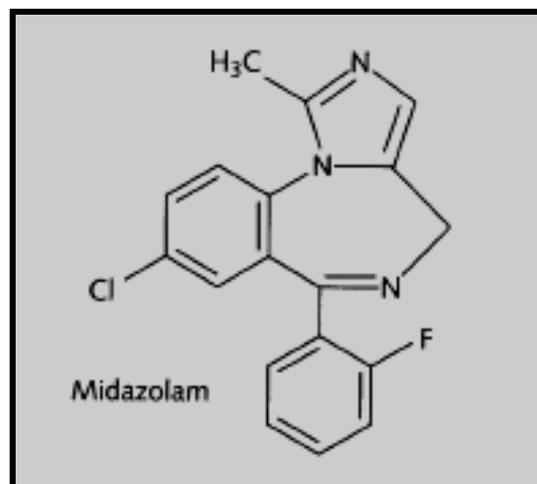
Die Pharmakokinetik von Fentanyl ist wegen seiner hohen Lipophilie komplex (Plasmaproteinbindung ca. 85%). Bei einer Einmalgabe ist seine Kinetik im wesentlichen durch die relativ schnelle Verteilungsphase bestimmt (kurze  $\alpha$ -HWZ von 2-13 min). Fentanyl durchdringt sehr rasch die Blut-Hirnschranke und erreicht nach 3-5 min maximale Effekte wobei die Konzentration im Gehirn um ein 10faches höher liegt als die Konzentration im Plasma. Der hohe Konzentrationsgradient begünstigt wiederum den Abstrom von Fentanyl aus dem Gehirn resultierend in einer kurzen Wirkdauer [LARSEN, 2002].

Anders verhält sich die Kinetik bei repetitiver oder kontinuierlicher Anwendung. Das extrem fettlösliche Fentanyl sequestriert dosis- und perfusionsabhängig schnell in lipophiles Gewebe und diffundiert bei wiederholter Anwendung aufgrund seiner vergleichbar langen  $\beta$ -HWZ von 3,1-6,6 h entsprechend langsam zurück. Es kommt zur Kumulation im ZNS, Muskel- und Fettgewebekompartiment, in der Lunge sowie aufgrund seiner Basizität auch in der sauren Magenschleimhaut (basisches Fentanyl) [ROERIG, 1987; WATERS, 1999]. Daraus resultiert eine verlängerte Wirkdauer bzw. eine klinisch relevante Verlängerung der  $\beta$ -HWZ. Dieses Phänomen wird durch die Kontext-sensitive HWZ beschrieben; "Kontext" steht dabei für die Infusionsdauer [HUGHES, 1992]. Bereits nach 2-stündiger i.v.-Gabe steigt sie steil und fast linear an mit konsekutiv protrahierter Aufwachphase mit der Gefahr einer späten Atemdepression. Die Elimination von Fentanyl erfolgt zu mehr als 90% nach hepatischer Metabolisierung, nur ein sehr geringer Teil erscheint unverändert im Urin.

### 2.7.2 Midazolam

Das wasserlösliche Benzodiazepin Midazolam (8-Chlor-6-[2-fluorphenyl]-1-methyl-4H-imidazo-benzodiazepin) wurde 1984 als Dormicum®-Injektionslösung in die Klinik eingeführt.

Abb. 2.6: Strukturformel von Midazolam



Midazolam hat aufgrund seiner Lipophilie bei physiologischem pH-Wert eine ausgezeichnete Biomembrangängigkeit. Bei einer Verteilungs- $\alpha$ -HWZ von 7-15 min und einer Eliminations  $\beta$ -HWZ von 2-4 h weist das kurzwirksame Benzodiazepin nach i.v.-Anwendung einen bi-exponentiellen Verlauf der Serumkonzentrationskurve auf. Nach rascher Bolusinjektion fällt die Plasmakonzentration in den ersten 15 min auf 10-20% des Ausgangswertes, nach 2 h

auf ca. 5% [KLOTZ, 1989; LARSEN, 2002]. Die Biotransformation von Midazolam erfolgt rasch vor allem in der Leber zum pharmakologischen Hauptmetabolit Hydroxymidazolam. Nach hepatischer Glukuronidierung erfolgt die Elimination renal. Interindividuelle Unterschiede im Ansprechen auf Midazolam sind im wesentlichen bedingt durch seine hohe Eiweißbindung (94 bis 96%). Bei Niereninsuffizienz vermindert sich dieser Anteil auf 93%. Eine Änderung der Eiweißbindung induziert eine unverhältnismäßige Änderung der freien Wirkstoff-Fraktion [VINIK, 1983].

In der Langzeitanwendung von Midazolam bei Intensivpatienten finden sich große interindividuelle Unterschiede in der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik [BEHNE, 1987]. Länger dauernde Zufuhr von Benzodiazepinen führt zu einer Herunterregulierung der ZNS-Rezeptoren mit nachfolgender Toleranz gegenüber der Benzodiazepinwirkung. So benötigen Intensivpatienten für eine effektive Sedierung häufig erheblich höhere Dosen als Patienten die Midazolam im Rahmen diagnostischer und therapeutischer Eingriffe erhalten [DIRKSEN, 1987; DRIESSEN, 1991; OLDENHOF, 1988; SHAFER, 1990]. Aufgrund einer verlängerten Eliminationshalbwertszeit ist bei vielen Intensivpatienten die Aufwachphase verzögert. Ursache für die langen Eliminationshalbwertszeiten sind zum einen eine eingeschränkte metabolische Kapazität mit verminderter Clearance und/oder ein erhöhtes Verteilungsvolumen. Das erhöhte Verteilungsvolumen ist dabei auf einen niedrigen Albumingehalt im Plasma mit verminderter Plasmaproteinbindung zurückzuführen [VREE, 1989]. Als mögliche Ursachen der verminderten Clearance werden Hypovolämie, verminderte Leberperfusion, reduzierte Leberfunktion, Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten, erniedrigtes Herzzeitvolumen, veränderte Gewebbindung, geringere Plasmaproteinbindung sowie Veränderungen im Rahmen einer Sepsis beschrieben [DIRKSEN, 1987; MALACRIDA, 1991; SHELLY, 1987].

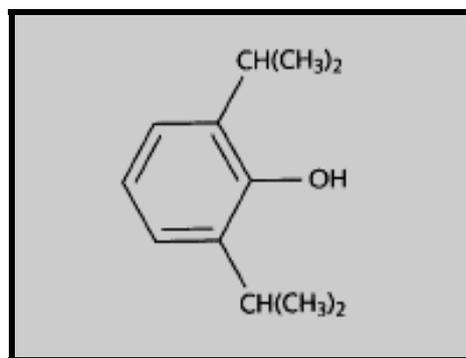
### 2.7.3 Propofol

Propofol (Disoprivan®) wurde 1988 auf dem deutschen Markt eingeführt. Als alkyliertes Phenol ist Propofol (2,6-Di-isopropylphenol) praktisch wasserunlöslich und liegt daher zur intravenösen Anwendung als 2%ige isotone Öl-in-Wasser-Emulsion vor.

Im Dreikompartmentsystem ergibt sich für Propofol eine  $\alpha$ -Halbwertszeit von wenigen Minuten und eine  $\beta$ -Halbwertszeit von 30 - 70 min. Das Erwachen erfolgt gewöhnlich rasch, weil selbst nach langer Infusionszeit eine Umverteilung von Propofol aus dem zentralen Kompartiment in die peripheren Kompartimente bei gleichzeitiger Metabolisierung stattfindet (die Kontext-sensitive HWZ beträgt nach 3std. Infusion ca. 25 min., nach 8std. Infusion ca. 40 min). Auch

nach kontinuierlicher Gabe kumuliert Propofol nicht, jedoch muss nach längerer Zufuhr in der intensivmedizinischen Analgosedierung mit einer deutlich verlängerten Aufwachphase gerechnet werden, selten tritt auch ein verlängertes Koma nach Propofol-Sedierung auf [HEDERA, 1999; KOWALSKI, 1999]. Die Plasmaproteinbindung ist mit 98% sehr hoch. Auch seine Clearance ist mit 20 – 30 ml/kg/min hoch [BAILIE, 1992]. Die metabolische Inaktivierung von Propofol erfolgt durch Hydroxylierung und Konjugation in der Leber mit anschließender renaler Ausscheidung der Metaboliten.

**Abb. 2.7: Strukturformel von Propofol**



Nach Langzeitgabe von Propofol muss in der Phase der Entwöhnung von der Beatmung („weaning“) die Atmung bzw. der physiologische Gasaustausch überwacht werden. Besonders bei Komedikation mit Opioiden besteht die Gefahr einer respiratorischen Insuffizienz bzw. respiratorischen Hyperkapnie mit Azidose. Auch gilt es, die durch kontinuierliche Zufuhr von Lipidemulsionen erhöhte Triglyceridkonzentration zu berücksichtigen, auch vor dem Hintergrund einer kalorischen Abstimmung in der parenteralen Ernährung [LARSEN, 2002].

## 2.8 Modulation der Immunantwort durch Anästhetika

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts ging man davon aus, dass Anästhetika einen ungünstigen Einfluss auf das Immunsystem haben können: 1899 beschrieben Chadbourne und Mitarbeiter eine sich entwickelnde Leukozytose nach operativem Eingriff unter Diethyläther [CHADBOURNE, 1899]. 1903 beobachteten Snell und Mitarbeiter in tierexperimentellen Untersuchungen eine Beeinträchtigung der Abwehrfunktion durch verschiedene Anästhesieverfahren [SNELL, 1903]. Spätere Studien zeigten postoperativ

eine verminderte T-Zell-Population, eine verminderte T-Zell-Migration nach Mitogenstimulation, sowie eine durch diverse Anästhetika reversibel gehemmte Chemotaxis [MOUDGIL, 1977; PARK, 1971; SLADE, 1975; WALTON, 1979]. Außerdem werden direkte und durch Beeinflussung der neurohumoralen Stressantwort bedingte indirekte Effekte der Anästhetika auf das Immunsystem zusätzlich durch unspezifische Wirkungen wie z.B. einen Blutdruckabfall beeinflusst [HEESEN, 1995].

Um den perioperativen Einfluss auf das Immunsystem genauer zu evaluieren, wurden in den 1980er Jahren mehrere Studien durchgeführt mit dem primären Ziel, den Einfluss einer Allgemeinanästhesie vom operativen Trauma als solches abzugrenzen. So zeigten Hole und Mitarbeiter eine erheblich eingeschränkte Monozytenfunktion, gemessen an der induzierten Lyse maligner Zellen, während und nach Operationen am Hüftgelenk unter Allgemeinanästhesie nicht jedoch unter Epiduralanästhesie [HOLE, 1982]. Whelan und Mitarbeiter beschrieben eine signifikante Reduktion der Lymphozytenzahl und eine abgeschwächte Reaktion der Lymphozyten auf Mitogene und Histokompatibilitätsantigene bei transurethralen Resektionen der Prostata unter Allgemeinanästhesie, während unter Epiduralanästhesie durchgeführte Behandlungen dagegen nur zu minimalen Veränderungen der Lymphozyten/Leukozyten führten [WHELAN, 1982]. Bei Hysterektomien in Neuroleptanästhesie fanden Tønnesen und Wahlgreen postoperativ eine signifikante Verminderung der NK-Zellen-Aktivität begleitet von einer Leukozytose und einer Lymphopenie. Unter Epiduralanästhesie blieben die Veränderungen aus [TØNNESEN, 1988].

Mittlerweile existieren eine Fülle von Studien, die eine Beeinflussung des Immunsystems durch Anästhetika nachweisen. So konnte für Thiopental, Midazolam und Propofol in klinischen Konzentrationen eine Beeinträchtigung der Monozyten/Makrophagen Funktion bezüglich Chemotaxis, Phagozytose und Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies gezeigt werden [HELLER, 1998; JENSEN, 1993; KRESS, 1989; KRUMHOLZ, 1994 und 1995; MIKAWA, 1998; NISHINA, 1998]. In anderen Studien hatte Midazolam im Gegensatz zu Propofol keinen Einfluss auf die Neutrophilenfunktion [HEINE, 1996; O'DONNELL, 1992]. Auch konnten Inada und Mitarbeiter an einem Rattenmodell mit induzierter abdominaler Sepsis nachweisen, dass Propofol die Wasserstoffperoxidproduktion der neutrophilen Granulozyten signifikant stärker unterdrückt als Midazolam [INADA, 2001]. Für Midazolam konnte ferner in einem Mäusemodell gezeigt werden, dass Midazolam die Mastzellproliferation und die IgE-vermittelte TNF- $\alpha$ -Freisetzung hemmt [BIDRI, 1999]. Für Propofol konnte *in vitro* ein erhöhter Quotient aus T-Helferzellen des Typ 1 zu Zellen des Typ 2 nachgewiesen werden, während Thiopental einen konträren Effekt ausübte [SALO, 1997].

In einer anderen Studie führte die Infusionsanästhesie mit Propofol bei Patientinnen, die sich einer Brustoperation unterzogen, zu einem erhöhten Prozentsatz an T-Helferzellen [PIRTTIKANGAS, 1994]. In einer Studie an chirurgischen Intensivpatienten setzte Propofol nach *in vitro* Toxinstimulation die Lymphozytenproliferation herab, während dieser Effekt bei gesunden Probanden ausblieb [PIRTTIKANGAS, 1993]. Für Ketamin konnte in Tierversuchen ein protektiver Effekt nachgewiesen werden. In einem Rattenmodell mit endotoxinbedingtem septischen Schock konnte für Ketamin ein hemmender Effekt auf die Hypotension, metabolische Azidose und die TNF- $\alpha$ - und IL-6-Konzentration mit einer Senkung der Letalität nachgewiesen werden [SHAKED, 2004; TANIGUCHI, 2001]. Auch für die Lokalanästhetika Lidocain und Bupivacain konnten im Tierversuch an Mäusen mit Sepsis eine Reduktion der TNF- $\alpha$ -Konzentration sowie eine geringere Inzidenz eines renalen und hepatischen Versagens mit reduzierter Letalität nachgewiesen werden [GALLOS, 2004]. In einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe konnten Larsen und Mitarbeiter in Vollblutkulturen gesunder Probanden nach *ex vivo* Stimulation mit LPS eine Modulation der Zytokinantwort durch diverse Anästhetika nachweisen: So wurde die TNF- $\alpha$ -Antwort durch Thiopental und Ketamin in pharmakologischen Konzentrationen gehemmt, während Propofol bereits in klinischen Konzentrationen zu einer vermehrten TNF- $\alpha$ -Freisetzung führte. Ketamin setzte außerdem die IL-1 $\beta$ -Antwort herab. Etomidat und Thiopental führten zu einer gesteigerten IL-10-Produktion [LARSEN, 1998].

## 2.9 Fragestellung

Die dargestellten Literaturbefunde belegen, dass neben patienteneigenen biologischen Determinanten wie Alter, Geschlecht oder genetisch bedingten Alterationen des Immunsystems und neben dem chirurgischen Trauma als solches, Anästhetika und Anästhesieverfahren die einzelnen Komponenten der Immunantwort beeinflussen können. [STEVENSON, 1990; SHEERAN, 1997; LARSEN, 1998]. Dieser medikamentöse Einfluss ist insbesondere bei Sepsispatienten relevant, die im Rahmen der intensivmedizinischen Versorgung über mehrere Tage kontinuierlich intravenös analgosediert werden mit Substanzen wie Fentanyl, Propofol und Midazolam. Während es in der Literatur eine Vielzahl an *in vitro* Studien gibt, untersuchten nur wenige Arbeiten den Einfluss der Anästhetika *in vivo*. Noch weniger Studien existieren, in denen Patienten einem spezifischen Anästhesieregime randomisiert zugewiesen wurden. Nur unzureichend charakterisiert ist somit die Relevanz der erhobenen *in vitro* Untersuchungsergebnisse sowie die exakten Mechanismen einer solchen Immunmodulation. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Monozytenfunktion und die Zytokinantwort bei einem größeren Patientenkollektiv mit

schwerer Sepsis unter dem Einfluss einer prolongierten kontinuierlichen Infusion von Propofol und Midazolam eingehend zu untersuchen. In der vorliegenden Untersuchungsreihe sollten dabei die folgenden Fragen beantwortet werden:

- **Welchen Einfluss haben Midazolam und Propofol auf die Deaktivierung der Monozyten bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis?**

Die dargestellten Literaturbefunde belegen, dass Monozyten/Makrophagen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Immunantwort des Organismus besitzen und demnach eine FunktionseinbuÙe dieser Zellpopulation bei verschiedenen Stressereignissen zu weitreichenden Konsequenzen für die Inflammationsantwort führen sollte. In diesem Teilabschnitt soll daher die monozytäre Dysfunktion bei Intensivpatienten mit schwerer Sepsis unter dem Einfluss einer Langzeitsedierung mit Midazolam bzw. Propofol untersucht werden.

- **Welchen Einfluss haben Midazolam und Propofol auf die im Vollblut *ex vivo* bestimmte spontane monozytäre Zytokinantwort bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis?**
- **Welchen Einfluss haben Midazolam und Propofol auf die im Vollblut *ex vivo* stimulierbare monozytäre Zytokinantwort bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis?**

Für die Stimulation der Zytokinantwort wurde sowohl gramnegatives Endotoxin (LPS) als auch grampositives Staphylokokkentoxin (SAC-I) verwendet, um zusätzlich den Einfluss des stimulierenden Bakterientoxins darstellen zu können.

## 3 METHODIK

Die vorliegende prospektiv randomisierte Studie wurde bei Patienten durchgeführt, die auf der anästhesiologischen oder der allgemein- bzw. unfallchirurgischen Intensivstation der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar, behandelt wurden. Darüber hinaus wurde für weitergehende Untersuchungen bei gesunden Probanden Vollblut entnommen und *ex vivo* analysiert. Die Forschungsvorhaben wurden von der zuständigen Ethikkommission der Ärztekammer des Saarlandes genehmigt und erfolgten mit dem Einverständnis der Probanden oder Patienten bzw. ihrer nächsten Angehörigen. Unter Berücksichtigung der Ein- und Ausschlusskriterien wurden die Patienten entsprechend der chronologischen Reihenfolge in die Untersuchungen aufgenommen.

### 3.1 Patienten mit schwerer Sepsis

Die Untersuchungen der Patienten mit „schwerer Sepsis“ erfolgte bei erwachsenen Patienten beiderlei Geschlechts, die auf den oben genannten Intensivstationen der Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar, behandelt wurden. Die Patienten wurden in enger Zusammenarbeit mit den für die Grunderkrankungen zuständigen Fachabteilungen betreut. Es wurden insgesamt 24 Patienten in die Studie eingeschlossen.

#### 3.1.1 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Grundlage der Einschlusskriterien zur Aufnahme in die Untersuchungen war die Definition des Begriffs „schwere Sepsis“ durch die Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) [ACCP/SCCM, 1992].

Die einzelnen Einschlusskriterien waren wie folgt vorgegeben:

- Schwere Sepsis, definiert durch:
  - Mindestens zwei der folgenden SIRS-Kriterien:
    - Körpertemperatur über 38°C oder unter 36°C
    - Herzfrequenz über 90/min
    - Atemfrequenz über 20/min oder  $\text{paCO}_2$  unter 32 mmHg
    - Leukozyten über 12.000/ $\mu\text{l}$  oder unter 4000/ $\mu\text{l}$  oder mehr als 10% unreife Formen
  - Klinisch oder mikrobiologisch gesicherte infektiöse Ursache des SIRS

- Mindestens eine der folgenden zusätzlichen Kriterien:
  - Organdysfunktion
  - Septische Hypotension (definiert als systolischer Blutdruck unter 90 mmHg bzw. ein Druckabfall größer als 40 mmHg unter Ausgangswert)
  - Hypoperfusion (klinisch erkennbar an einer Laktat-Erhöhung, Azidose, Oligurie oder einer akuten Veränderung der Bewusstseinslage)
- Respiratorische Insuffizienz, die eine maschinelle Beatmung für mindestens 3 Tage erfordert
- Lebensalter über 18 Jahre

Als Ausschlusskriterien waren folgende Erkrankungen bzw. Begleitumstände definiert:

- Immunsuppression aktuell oder in den letzten 12 Monaten (z.B. Behandlung mit Kortikoiden, Zytostatika oder Immunsuppressiva)
- Hämatologische Systemerkrankung (z.B. Hodgkin- oder Non-Hodgkin-Erkrankungen, akute oder chronische Leukämien)
- Kontraindikation gegen eine der zur Analgosedierung vorgesehenen Substanzen
- Behandlung mit Dopamin
- Teilnahme an einer anderen wissenschaftlichen Untersuchung

### 3.1.2 Analgosedierung

Um eine einheitliche Ausgangssituation zu gewährleisten erhielten alle 24 in die Studie eingeschlossenen Intensivpatienten am ersten Tag ( $T_1$ : Tag 1 nach Diagnosestellung "schwere Sepsis") Midazolam als Sedativum. Die Randomisierung zu einer der beiden gleich großen Behandlungsgruppen erfolgte dann an Tag 2:

**Midazolamgruppe:** Die Patienten ( $n = 12$ ) erhielten zunächst eine kontinuierliche Infusion von 0,05 mg/kgKG/h Dormicum® (Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen)

**Propofolgruppe:** Die Patienten ( $n = 12$ ) erhielten anfänglich eine Dosierung von 2 mg/kgKG/h Disoprivan® (Zeneca, Plankstadt)

Alle Patienten erhielten als analgetische Komponente eine Hintergrundinfusion von 1 µg/kgKG/h Fentanyl (Fentanyl®-Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss). Die weitere Infusionsgeschwindigkeit wurde in Schritten von jeweils 25% der Ausgangsdosierung an den klinischen Bedarf angepasst. Die Tiefe der Analgosedierung wurde mit der 6-Punkte-Skala nach Ramsay abgeschätzt [RAMSAY, 1974]. Ziel war zunächst ein Score-Wert von 4-5, d.h. der Patient reagiert auf laute Ansprache oder ein leichtes Klopfen auf die Stirn mit sofortigem bis trägen Erwachen. Die Sedierungsskala nach Ramsay ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1: Sedierungsscore nach Ramsay 1974

Scorewert	Klinischer Zustand
1	Wach: ängstlich, agitiert, unruhig
2	Wach: kooperativ, orientiert, ruhig
3	Weckbar auf Ansprache: Reaktion auf Kommandos erhalten
4	Schlaf: sofortige, klare Reaktion auf einen Stimulus (laute Ansprache, leichtes Beklopfen der Stirn)
5	Schlaf: träge Reaktion auf einen Stimulus (laute Ansprache, leichtes Beklopfen der Stirn)
6	Schlaf: keine Reaktion auf einen Stimulus (laute Ansprache, leichtes Beklopfen der Stirn)

### 3.1.3 Allgemeine Intensivtherapie

Die Patienten wurden in der Regel aus dem OP-Saal auf die Intensivstation übernommen. Mit den beteiligten Fachkollegen wurden Erkrankung, bisherige medikamentöse bzw. chirurgische Therapie und weiterhin geplante diagnostische und therapeutische Maßnahmen besprochen. Die Intensivtherapie der Patienten erfolgte nach den auf unserer Intensivstation üblichen Behandlungsstandards und Therapieprotokollen [WILHELM, 1999].

#### Maschinelle Beatmungstherapie

Die Beatmungstherapie erfolgte ausschließlich mit Intensivrespiratoren vom Typ „Evita® 1“ oder „Evita® 4“ (Dräger AG, Lübeck) und generell über einen Endotrachealtubus oder eine Trachealkanüle. Für jeden Patienten wurde die Respiratoreinstellung individuell gewählt und durch kontinuierliche Pulsoxymetrie und regelmäßige arterielle Blutgasanalysen überwacht. Grundsätzlich wurde eine druckorientierte (z.B. druckkontrollierte oder druckbegrenzte) Beatmungsform mit positivem endexpiratorischen Druck (PEEP) angewandt, die eine Eigenatmung der Patienten ermöglicht, bzw. unterstützt (bevorzugt im BIPAP-Modus). Die Entwöhnung von der Beatmung („weaning“) erfolgte nach der üblichen klinischen Verfahrensweise, d.h. bei vermehrter Spontanatmung durch Reduktion der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO<sub>2</sub>) auf ≤ 0,4 und begleitet durch eine schrittweise Reduktion des PEEP-Niveaus auf 5 mbar. Die meisten Patienten konnten anschließend bei ausreichender Oxygenierung, Ventilation und Atemmechanik und hinlänglich stabiler Kreislaufsituation extubiert werden. Bei einigen Patienten mit prolongiertem Entwöhnungsverlauf wurde

vorübergehend ein Tracheostoma angelegt, in der Regel durch eine perkutane Dilatationstracheotomie nach Ciaglia (Cook Critical Care Europe, Bjaeverskov, Dänemark) [WALZ, 1996].

### **Flüssigkeits- und Elektrolyttherapie**

Die Flüssigkeits- und Elektrolyttherapie orientierte sich an dem korrigierten Basisbedarf erwachsener Patienten und erfolgte initial mit ca. 30-40 ml/kgKG/Tag einer Kalium-angereicherten Eindrittelektrolytlösung mit 5%-Glukosezusatz (Sterofundin® BG-5, B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Volumen- und Elektrolytstatus wurden regelmäßig klinisch, hämodynamisch bzw. anhand von Laboranalysen kontrolliert und entsprechend korrigiert. Insbesondere in der Initialphase der Sepsistherapie hatte die Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung eines ausreichenden intravasalen Volumens erste Behandlungspriorität.

### **Ernährungstherapie**

Die meisten Patienten mussten während der Intensivbehandlung künstlich ernährt werden. Soweit möglich wurde hierbei die enterale Ernährung, z.B. mittels Sondenkost, der parenteralen Therapie vorgezogen. Indikationsstellung und konkrete Nährstoffdosierungen orientierten sich dabei an der aktuellen Stoffwechselsituation, dem individuellen Ernährungszustand und an Art und Ausmaß der Erkrankung [HACKL, 1998; JOLLIET, 1998].

### **Antibiotikatherapie und mikrobiologisches Monitoring**

Gemäß den Einschlusskriterien für „schwere Sepsis“ musste die infektiöse Ursache der systemischen Entzündung mikrobiologisch gesichert oder zumindest nach klinischen Kriterien offensichtlich sein. Es wurde folglich bei allen untersuchten Patienten eine Antibiotikatherapie durchgeführt, in der Regel nach folgendem Schema:

- Entnahme von mikrobiologischem Untersuchungsmaterial bereits intraoperativ oder unmittelbar nach Aufnahme auf der Intensivstation, z.B. Peritonealflüssigkeit, Wundabstrich, Bronchialsekret, Urin und Blutkultur
- Anschließend sofortiger Beginn einer kalkulierten Omnispektrum-Antibiotikatherapie
- Dosisanpassung bei Organinsuffizienz, evtl. unterstützt durch intermittierende Bestimmung der Antibiotika-Serumkonzentrationen
- Bei klinischer Besserung und Erregeridentifikation Deeskalierung der Antibiotikatherapie und gezielte Behandlung nach Antibiogramm-Ergebnissen
- Im Einzelfall orale Weiterbehandlung oder Umstellung der Antibiotikatherapie bei verändertem klinischen Verlauf.

In Abhängigkeit vom Ausgangsbefund sowie vom individuellen Krankheitsverlauf erfolgten weitere mikrobiologische Untersuchungen. Alle Materialien wurden an das Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Direktor: Prof. Dr. M. Herrmann), der Universitätskliniken des Saarlandes eingesandt, die dort weiter bearbeitet wurden. Die Befunde wurden gemeinsam mit dem zuständigen Mikrobiologen besprochen.

### **Sonstige Intensivtherapie**

Bei allen Patienten wurde eine Stressulkusprophylaxe durchgeführt. Im Rahmen der Korrektur einer positiven Flüssigkeitsbilanz oder bei Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion war eine Diuretikatherapie zur Steigerung der Urinausscheidung indiziert. Die Dosierung richtete sich hierbei nach dem klinischen Bedarf. Traten Zeichen des akuten Nierenversagens auf, wurde eine kontinuierliche veno-venöse Hämodialyse (CVVHD) als Nierenersatzverfahren in enger Zusammenarbeit mit der hiesigen Medizinischen Klinik IV (Direktor: Prof. Dr. Köhler) eingesetzt. Abhängig vom individuellen Blutungsrisiko erfolgte bei den Patienten eine intravenöse Thromboembolieprophylaxe mit unfraktioniertem Heparin. Der Heparineffekt wurde durch Gerinnungsanalysen kontrolliert und die weitere Heparin-Dosierung individuell angepasst. Eine präoperative Dauermedikation wurde, sofern unter den Bedingungen der Intensivbehandlung sinnvoll, weitergeführt. Eine Therapie mit Blut- und Gerinnungsprodukten erfolgte entsprechend dem klinischen Zustand des einzelnen Patienten unter Berücksichtigung von Vorerkrankungen, Laboranalyseergebnissen, Hämodynamik und globalem Sauerstoffangebot [HEBERT, 1999].

### **Intensivmedizinisches Monitoring**

Alle Patienten mit schwerer Sepsis auf der Intensivstation wurden kontinuierlich überwacht. Folgende Vitalparameter wurden bei allen Patienten erhoben:

- Herzfrequenz und -rhythmus mit Monitor-EKG
- Systolischer, diastolischer und mittlerer arterieller Blutdruck mit kontinuierlicher invasiver Blutdruckmessung
- Zentraler Venendruck über einen zentralvenös platzierten Mehrlumenkatheter
- Partielle Sauerstoffsättigung mit Pulsoxymetrie
- Stündliche Urinausscheidung über einen transurethral oder suprapubisch eingeführten Blasenkateter
- Körpertemperatur über eine rektal eingeführte Messsonde

## Laboranalysen

Bei allen Patienten wurden mehrmals täglich arterielle Blutgasanalysen durchgeführt. Zusätzlich war im Verlauf der ersten Behandlungswoche die tägliche Analyse der folgenden Laborparameter vorgesehen:

- Blutbild und Differentialblutbild
- Gerinnungsanalyse
- Elektrolytkonzentrationen: Natrium, Kalium und Kalzium
- Serumwerte für Gesamteiweiß, Albumin, GOT, GPT,  $\gamma$ -GT, Bilirubin, alkalische Phosphatase, Cholinesterase, Kreatinin, Harnstoff, Laktat und C-reaktives Protein
- Kreatinin-Clearance

Die Analyse dieser Laborparameter erfolgte durch das Klinisch-Chemische Zentrallabor bzw. durch die Abteilung für Klinische Hämostaseologie und Transfusionsmedizin der Universitätskliniken des Saarlandes.

### 3.1.4 Katecholamintherapie

Die Katecholamintherapie orientierte sich an den derzeit gültigen Empfehlungen [HOLLENBERG, 1999; MEIER-HELLMANN, 2000]: Grundsätzlich wurde bei den septischen Patienten ein arterieller Mitteldruck von über 70-75 mmHg angestrebt unter gesonderter Berücksichtigung individueller Vorerkrankungen. Reichte die Volumentherapie zur Gewährleistung eines adäquaten arteriellen Perfusionsdrucks allein nicht aus, so wurde zusätzlich Noradrenalin (Arterenol<sup>®</sup>, Hoechst AG, Frankfurt a.M.) infundiert und bedarfsgerecht dosiert. Eine deutlich eingeschränkte myokardiale Pumpfunktion (z.B. bei einem Herzzeitindex unter 2,5 l/min/m<sup>2</sup>) wurde zusätzlich mit Dobutamin (Dobutrex<sup>®</sup>, Lilly Deutschland GmbH, Bad Homburg) behandelt. Auf den Einsatz von Dopamin wurde generell verzichtet. Nach aktueller Datenlage kann Dopamin die Oxygenierung der besonders hypoxiegefährdeten Darmmukosa verschlechtern, den hepatischen Blutfluss vermindern, die Ausschüttung verschiedener Hypophysenhormone beeinträchtigen und so, z.B. durch eine Hypoprolaktinämie, auch die Lymphozyten- und Makrophagenaktivität vermindern [GIRAUD, 1984; MEIER-HELLMANN, 1997; NEVIERE, 1996; VAN DEN BERGHE, 1996].

### 3.1.5 Intensivmedizinische Scores

Am Morgen jedes Behandlungstages wurden bei allen Patienten mehrere intensivmedizinische Scores erhoben: APACHE II-Score (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II-Score), MOF-Score (Multiple Organ Failure-Score) und SOFA-Score

(Sepsis-related Organ Failure Assessment-Score). Die Erhebung erfolgte in der vorliegenden Untersuchung ausschließlich durch einen einzigen Untersucher, um eine mögliche Beobachter-abhängige Variabilität der Ergebnisse grundsätzlich ausschließen zu können [POLDERMAN, 2001]. Bezüglich der Problematik der Ermittlung von Scorewerten anhand der Glasgow-Koma-Skala bei analgosedierten Patienten sei auf die Stellungnahme in Abschnitt 5.1.1 verwiesen. Zur Errechnung des jeweiligen Scores wurden für jeden Parameter die schlechtesten Werte der vorangegangenen 24 h herangezogen. Im folgenden sind die Scores im Detail abgebildet:

### **APACHE II-Score**

Der APACHE II-Score umfasst 11 physiologische Parameter, den Punktwert der Glasgow-Koma-Skala sowie Alter und bestimmte Vorerkrankungen und wurde als allgemeiner intensivmedizinischer Score und unter Berücksichtigung zusätzlicher Koeffizienten ursprünglich zur Prognoseberechnung entwickelt [KNAUS, 1985; TEASDALE, 1974]. In der vorliegenden Untersuchung wurde der APACHE II-Score wie vielfach üblich abweichend von der Originalpublikation verwendet und zur Schweregradklassifikation, zur Verlaufsbeobachtung sowie zum Vergleich verschiedener Intensivpatientengruppen herangezogen [KERN, 2001] (siehe Tabelle 3.2).

### **MOF-Score**

Der 1985 von Goris und Mitarbeitern entwickelte MOF-Score für die Beurteilung und den Vergleich der Dysfunktionen von einzelnen Organen ist nach wie vor weit verbreitet und anerkannt [GORIS, 1985]. Einteilungskriterien sind die Beurteilungen von sieben Organsystemen nach Funktion bzw. Dysfunktion. Jedes Organsystem wird von 0 bis 2 gradiert (siehe Tabelle 3.3).

### **SOFA-Score**

Der SOFA-Score wurde 1994 anlässlich einer Konsensuskonferenz der European Society of Intensive Care Medicine ausdrücklich nicht zur Prognoseabschätzung erstellt. Vielmehr soll der Score den individuellen Schweregrad von Organstörungen bei Sepsis beschreiben und eine tägliche Verlaufsbeobachtung ermöglichen. Der SOFA-Score erfasst insgesamt 6 Parameter (Oxygenierung, Blutgerinnung, Leber, Niere, Herzkreislaufsystem, ZNS); dabei wird der Schweregrad der Störung mit jeweils 1-4 Punkten bewertet [VINCENT, 1996] (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.2: APACHE II-Score nach Knaus 1985, modifiziert nach Neugebauer 2001

APACHE II	Erhöhte Werte					Erniedrigte Werte			
	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Rektaltemperatur (°C)	≥ 41	39,0 - 40,9		38,5 - 38,9	36,0 - 38,4	34,0 - 35,9	32,0 - 33,9	30,0 - 31,9	≤ 29,9
Arterieller Mittel- druck (mmHg)	≥ 160	130 - 159	110 - 129		70 - 109		50 - 69		≤ 49
Herzfrequenz (1/min)	≥ 180	140 - 179	110 - 139		70 - 109		55 - 69	40 - 54	≤ 39
Atemfrequenz (1/min)	≥ 50	35 - 49		25 - 34	12 - 24	10 - 11	6 - 9		≤ 5
Oxygenierung FiO <sub>2</sub> ≥ 0,5: AaDO <sub>2</sub> FiO <sub>2</sub> < 0,5: paO <sub>2</sub>	≥ 500	350 - 499	200 - 349	< 200					
Arterieller pH-Wert	≥ 7,7	7,60 - 7,69		7,50 - 7,59	7,33 - 7,49		7,25 - 7,32	7,15 - 7,24	< 7,15
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	≥ 180	160 - 179	155 - 159	150 - 154	130 - 149		120 - 129	111 - 119	≤ 110
K <sup>+</sup> (mmol/l)	≥ 7,0	6,0 - 6,9		5,5 - 5,9	3,5 - 5,4	3,0 - 3,4	2,5 - 2,9		< 2,5
Kreatinin (mg/dl) *	≥ 3,5	2,0 - 3,4	1,5 - 1,9		0,6 - 1,4		< 0,6		
Hämatokrit (%)	≥ 60,0		50,0 - 59,9	46,0 - 49,9	30,0 - 45,9		20,0 - 29,9		< 20,0
Leukozyten (x 10 <sup>3</sup> /μl)	≥ 40,0		20,0 - 39,9	15,0 - 19,9	3,0 - 14,9		1,0 - 2,9		< 1,0
Glasgow-Coma-Scale	15 - (Punktzahl der Glasgow-Coma-Scale)								
Alter (J)	≥ 75		65 - 74		55 - 64		45 - 54		≤ 44
Punktzahl	6		5		3		2		0
Grund der Intensiv- behandlung **	Intensivbehandlung nach Elektiv-OP			Intensivbehandlung nach Notfall-OP oder bei nichtoperativen Patienten					
Punktzahl	2			5					

\* Punkte für Kreatinin werden bei akutem Nierenversagen verdoppelt

\*\* Punkte in Abhängigkeit vom Grund der Intensivbehandlung werden nur addiert, wenn eine der folgenden chronischen Vorerkrankungen vorliegt:

- Lunge: chronisch restriktive, obstruktive oder vaskuläre Erkrankungen, die eine erhebliche Einschränkung der Leistungsfähigkeit bedingen; gesicherte chronische Hypoxie, Hyperkapnie, sekundäre Polyzythämie; schwere pulmonale Hypertonie (>40 mmHg); Respiratorabhängigkeit
- Herz-Kreislauf-System: Herzinsuffizienz NYHA Klasse IV
- Niere: chronisches dialysepflichtiges Nierenversagen
- Leber: histologisch gesicherte Leberzirrhose und dokumentierte portale Hypertension; Z.n. Ösophagusvarizenblutung, Leberversagen, Enzephalopathie, Koma
- Immunsystem (Anmerkung: Erkrankungen des Immunsystems waren Ausschlusskriterien für die vorliegende Untersuchung und werden daher nicht weiter aufgeführt.)

Tabelle 3.3: MOF-Score nach Goris 1985

MOF	Punktzahl		
	0 (leicht)	1 (mittelschwer)	2 (schwer)
<b>Lunge</b>	keine Beatmung	Beatmung: PEEP $\leq$ 10 cm H <sub>2</sub> O, FiO <sub>2</sub> < 0,4	Beatmung: PEEP > 10 cm H <sub>2</sub> O, FiO <sub>2</sub> $\geq$ 0,4
<b>Herz- kreislauf- system</b>	normaler RR ohne vasoaktive Substanzen	Therapie erforderlich (RR > 100mmHg) Dopamin $\leq$ 10 $\mu$ g/kg/min Nitroglycerin $\leq$ 20 $\mu$ g/kg/min Arterenol $\leq$ 0,1 $\mu$ g/kg/min	Arterielle Hypotension (RR $\leq$ 100mmHg) Dopamin > 10 $\mu$ g/kg/min Nitroglycerin > 20 $\mu$ g/kg/min Arterenol > 0,1 $\mu$ g/kg/min
<b>Niere</b>	Kreatinin < 2,0 mg/dl	Kreatinin > 2,0 mg/dl	Dialyse, Hämofiltration
<b>Leber</b>	sGOT < 25 U/L und Bilirubin < 2,0 mg/dl	sGOT $\geq$ 25 U/l und $\leq$ 50 U/L oder Bilirubin $\geq$ 2,0 mg/dl und $\leq$ 6,0 mg/dl	sGOT > 50 U/L oder Bilirubin > 6,0 mg/dl
<b>Blut</b>	Thrombozyten und Leukozyten normal	Thrombozyten < 50.000 / $\mu$ l oder Leukozyten $\geq$ 3500/ $\mu$ l und < 6000/ $\mu$ l	hämorrhagische Diathese oder Leukozyten < 2500/ $\mu$ l oder $\geq$ 6000/ $\mu$ l
<b>Gastro- intestinal- Trakt</b>	normale Funktion	Cholezystitis oder Ulkus	Blutung, Pankreatitis, Perforation Transfusion > 2 EK's/24h nekrotisierende Enterokolitis
<b>ZNS</b>	normale Funktion (GCS $\geq$ 14)	eingeschränktes Reaktionsvermögen (GCS $\geq$ 11, $\leq$ 13)	schwer gestörtes Reaktionsvermögen (GCS $\leq$ 10)

- PEEP = Positive endexpiratory pressure  
 FiO<sub>2</sub> = Inspiratorische Sauerstoffkonzentration  
 RR = Blutdruck nach Riva-Rocci  
 sGOT = Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase  
 EK = Erythrozytenkonzentrat  
 GCS = Glasgow-Coma-Score

Tabelle 3.4: SOFA-Score nach Vincent 1996

SOFA		Punktzahl			
		1	2	3	4
<b>Lunge</b>	paO <sub>2</sub> / FiO <sub>2</sub>	< 400 mmHg	< 300 mmHg	< 200 mmHg	< 100 mmHg
<b>Gerinnung</b>	TZ	< 150.000 / $\mu$ l	< 100.000 / $\mu$ l	< 50.000 / $\mu$ l	< 20.000 / $\mu$ l
<b>Leber</b>	Bilirubin	1,2 - 1,9 mg/dl	2,0 - 5,9 mg/dl	6,0 - 11,9 mg/dl	$\geq$ 12 mg/dl
<b>Herz- kreislauf- system</b>	Blutdruck bzw. Katechol- amintherapie *	MAP < 70 mmHg	Dopamin $\leq$ 5 $\mu$ g/kg/min oder Dobutamin (jede Dosis)	Dopamin > 5 $\mu$ g/kg/min, Noradrenalin $\leq$ 0,1 $\mu$ g/kg/min oder Adrenalin $\leq$ 0,1 $\mu$ g/kg/min	Dopamin > 15 $\mu$ g/kg/min, Noradrenalin > 0,1 $\mu$ g/kg/min oder Adrenalin > 0,1 $\mu$ g/kg/min
<b>ZNS</b>	GCS	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6
<b>Niere</b>	Kreatinin bzw. Rest- ausscheidung	1,2 - 1,9 mg/dl	2,0 - 3,4 mg/dl	3,5 - 4,9 mg/dl oder < 500 ml/Tag	> 5,0 mg/dl oder < 200 ml/Tag

\* Katecholamine müssen mindestens 1 h infundiert worden sein.

paO<sub>2</sub> = arterieller Sauerstoffpartialdruck  
 FiO<sub>2</sub> = Inspiratorische Sauerstoffkonzentration  
 TZ = Thrombozyten  
 GCS = Glasgow-Coma-Score

### 3.1.6 Probenentnahme, Messparameter und -zeitpunkte

Bei allen Patienten wurde über einen zentralen Venenkatheter 15 ml Vollblut in kommerziell erhältliche und pyrogenfreie Laborröhrchen (Zitrat-Monovette<sup>®</sup>, Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen. Die Blutproben wurden unmittelbar nach der Entnahme auf Eis gelagert, zum Forschungslabor transportiert und dort weiterverarbeitet. Die Probenentnahme erfolgte jeweils morgens um 8:00 Uhr zu den folgenden Messzeitpunkten:

- **T<sub>1</sub>**: Tag 1 nach Diagnosestellung "schwere Sepsis"
- **T<sub>2</sub>**: Tag 2 nach Diagnosestellung "schwere Sepsis"
- **T<sub>3</sub>**: Tag 3 nach Diagnosestellung "schwere Sepsis"
- **T<sub>4</sub>**: Tag 4 nach Diagnosestellung "schwere Sepsis"
- **T<sub>8</sub>**: Tag 8 nach Diagnosestellung "schwere Sepsis"

Dabei wurden folgende Parameter bestimmt:

- Spontane sowie LPS- und SAC-I-stimulierte TNF- $\alpha$ -Antwort
- Spontane sowie LPS- und SAC-I-stimulierte IL-10-Antwort
- Spontane IL-6-Antwort
- HLA-DR-Expression der Monozyten
- CD14-Expression der Monozyten

## 3.2 Gesunde Probanden

### 3.2.1 Probenentnahme und Messparameter

Venöses Blut von 6 gesunden Probanden wurde aseptisch entnommen und *in vitro* analysiert. Die Blutentnahmen fanden alle vormittags statt. Es wurden jeweils 15 ml Vollblut in kommerziell erhältliche und pyrogenfreie Laborröhrchen (Zitrat-Monovette<sup>®</sup>, Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen. Die Proben wurden unmittelbar in unserem Forschungslabor weiterverarbeitet. Dabei wurden folgende Parameter bestimmt:

- Spontane sowie LPS-stimulierte TNF- $\alpha$ -Antwort
- Spontane sowie LPS-stimulierte IL-10-Antwort
- Spontane IL-6-Antwort
- HLA-DR-Expression der Monozyten
- CD14-Expression der Monozyten

## 3.3 Probenaufarbeitung und Messmethodik

Die in den folgenden Untersuchungsabschnitten verwendeten Laborchemikalien waren von der höchsten erhältlichen Reinheit und wurden, sofern nicht anders erwähnt, von Sigma Chemicals (Taufkirchen) bezogen. Im Unterabschnitt zur Gewinnung der PBMC-Fraktion wurden, sofern nicht anders erwähnt, Materialien der Firma Becton Dickinson (Lincoln Park, NY) bezogen.

### 3.3.1 Probenaufarbeitung Sepsispatienten

#### Spontane, unstimulierte Zytokinkonzentrationen

Für die Messung der spontanen Zytokinantwort wurde in unserem Forschungslabor eine Zitrat-Monovette<sup>®</sup> sofort für 10 min bei 2755 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in Reaktionsgefäße pipettiert und bis zur Zytokinbestimmung mit ELISA bei –80°C eingefroren.

#### Stimulierte Zytokinkonzentrationen

In Anlehnung an das von Wilson beschriebene Vollblutprotokoll wurde eine zweite Zitrat-Monovette<sup>®</sup> sofort steril aufgearbeitet [WILSON, 1991 ergänzt durch GRUNDMANN, 2000; KLEINSCHMIDT, 1998; ZIEGENFUSS, 1999]. Es wurden 5 ml Zitratvollblut im Verhältnis 1:5 mit 20 ml Zellkulturmedium RPMI 1640 (Roche Molecular Diagnostics, Mannheim) verdünnt und nach Heparinisierung (2 IE/ml) durch Hinzufügen von 0,25 ml einer 250 mM Kalziumchloridlösung rekalkifiziert. Anschließend wurden jeweils 3 Proben à 2,5 ml für 1h bei 37°C in einer angefeuchteten Raumluft-Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>-Zusatz inkubiert. Die 3 Proben wurden dann kurzzeitig aus dem Inkubationsschrank entnommen und folgendermaßen weiterbehandelt:

- **Probe 1:** Zugabe von 1 µg/ml LPS (Lipopolysaccharid aus Escherichia coli O111:B4)
- **Probe 2:** Zugabe von 5 µl/ml einer nach Herstellerangaben vorbereiteten SAC-I-Suspension aus Staphylococcus aureus Cowan strain-I-Lysat
- **Probe 3:** Diese Probe wurde nicht stimuliert und diente als Kontrollwert

Die jeweils zugefügte Menge an Toxin wurde gewählt, da aus eigenen Voruntersuchungen bekannt war, dass diese Dosierungen unter den gegebenen Bedingungen zu einer jeweils maximalen TNF- $\alpha$ -Freisetzung führen; für die LPS-Dosis wurde dies auch von Mitov und Mitarbeitern berichtet [MITOV, 1997]. Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubationszeit wurden die Überstände abpipettiert und in Reaktionsgefäßen bis zur Zytokinbestimmung bei –80°C eingefroren.

#### Gewinnung der PBMC-Fraktion für die durchflusszytometrische Analyse der Monozyten/Makrophagen

Sofern nicht anders erwähnt wurden die in diesem Untersuchungsabschnitt verwendeten Materialien von Becton Dickinson (Lincoln Park, NY) bezogen. Zur Auftrennung des Blutes in seine einzelnen Fraktionen wurden in einem Zentrifugenröhrchen auf 5 ml Histopaque-Trennmedium (Sigma; Dichte: 1,077 g/ml) 5 ml Zitratblut geschichtet. Danach erfolgte die

Dichtegradientenzentrifugation für 20 Minuten bei 680 x g und 4°C. Nach der Zentrifugation waren vier Schichten voneinander getrennt. Am Boden des Zentrifugenröhrchens sedimentierten die Erythrozyten und die Granulozyten. Darüber befand sich die Interphase, bestehend aus Trennmedium und vereinzelt PBMC-Zellen. Als Schicht mit der geringsten Dichte bildete das Serum den oberen Abschluss. Der Hauptteil der monozytären Zellen des peripheren Blutes („peripheral blood mononuclear cells“ PBMC) sammelte sich als zellreiche schmale Schicht („buffy coat“) zwischen der Interphase und dem Serum. Der buffy coat und die Interphase wurden in sterile 13 ml Zentrifugenröhrchen pipettiert. Um die Zellen vom Trennmedium zu isolieren, wurden die Röhrchen bis auf 10 ml mit PBS (phosphate buffered saline; Life Technologies, Paisley, Scotland) aufgefüllt und für 10 Minuten bei 150 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in 500 µl PBS resuspendiert. Zur Markierung der Oberflächenantigene der PBMCs wurden spezifische fluoreszierende Antikörper verwendet. Zu der Suspension wurden jeweils 20 µl der monoklonalen Antikörper gegen die Oberflächenrezeptoren CD14 (anti CD14; Leu-M<sup>3</sup>; gekoppelt mit Fluoreszeinisothiozyanat, Klon MøP9) und HLA-DR (anti-HLA-DR, gekoppelt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin, Klon L243.9) pipettiert und für 10 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut für 10 min bei 150 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit den nicht gebundenen Antikörpern wurde verworfen, die Zellen mit 500 µl PBS resuspendiert und anschließend in ein Zentrifugenröhrchen übertragen, welches an das Fluoreszenzzytometer angepasst war.

### 3.3.2 Probenaufarbeitung Probanden

Es wurden 10 ml Zitratblut nach oben beschriebenem Vollblutprotokoll aufgearbeitet und jeweils 6 Proben à 2,5 ml für 1 h bei 37°C in angefeuchteter Raumluft-Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub>-Zusatz nach Zugabe der Sedativa vorinkubiert. Anschließend wurden die Proben kurzzeitig aus dem Inkubationsschrank entnommen und zum Teil mit LPS (Lipopolysaccharid aus Escherichia coli O111:B4) stimuliert:

- **Probe 1:** Zugabe von Midazolam ( $4.30 \cdot 10^{-5}$  M)
- **Probe 2:** Zugabe von Midazolam ( $4.30 \cdot 10^{-5}$  M), außerdem Zugabe von 1 µg/ml LPS nach 1 h Vorinkubation
- **Probe 3:** Zugabe von Propofol ( $1.57 \cdot 10^{-3}$  M)
- **Probe 4:** Zugabe von Propofol ( $1.57 \cdot 10^{-3}$  M), außerdem Zugabe von 1 µg/ml LPS nach 1 h Vorinkubation
- **Probe 5:** Kontrolle ohne Sedativum und ohne LPS
- **Probe 6:** Kontrolle ohne Sedativum mit 1 µg/ml LPS nach 1 h Vorinkubation

Die Berechnung der Anästhetikakonzentrationen erfolgte unter der Annahme eines Körpergewichts von 70 kg, einem Blutvolumen von 5 l und einer Injektionsdosis von 2 mg/kgKG Propofol bzw. 0.1 mg/kgKG Midazolam und entsprechen der 10fachen Dosis der klinischen Konzentration [LARSEN, 1998]. Diese supraklinische Dosierung schien für einen Vergleich mit Sepsispatienten die über mehrere Tage eine Dauerinfusion erhielten mit konsekutiven Kumulationseffekten sinnvoll. Siehe hierzu auch Anmerkungen in Abschnitt 5.1.2.

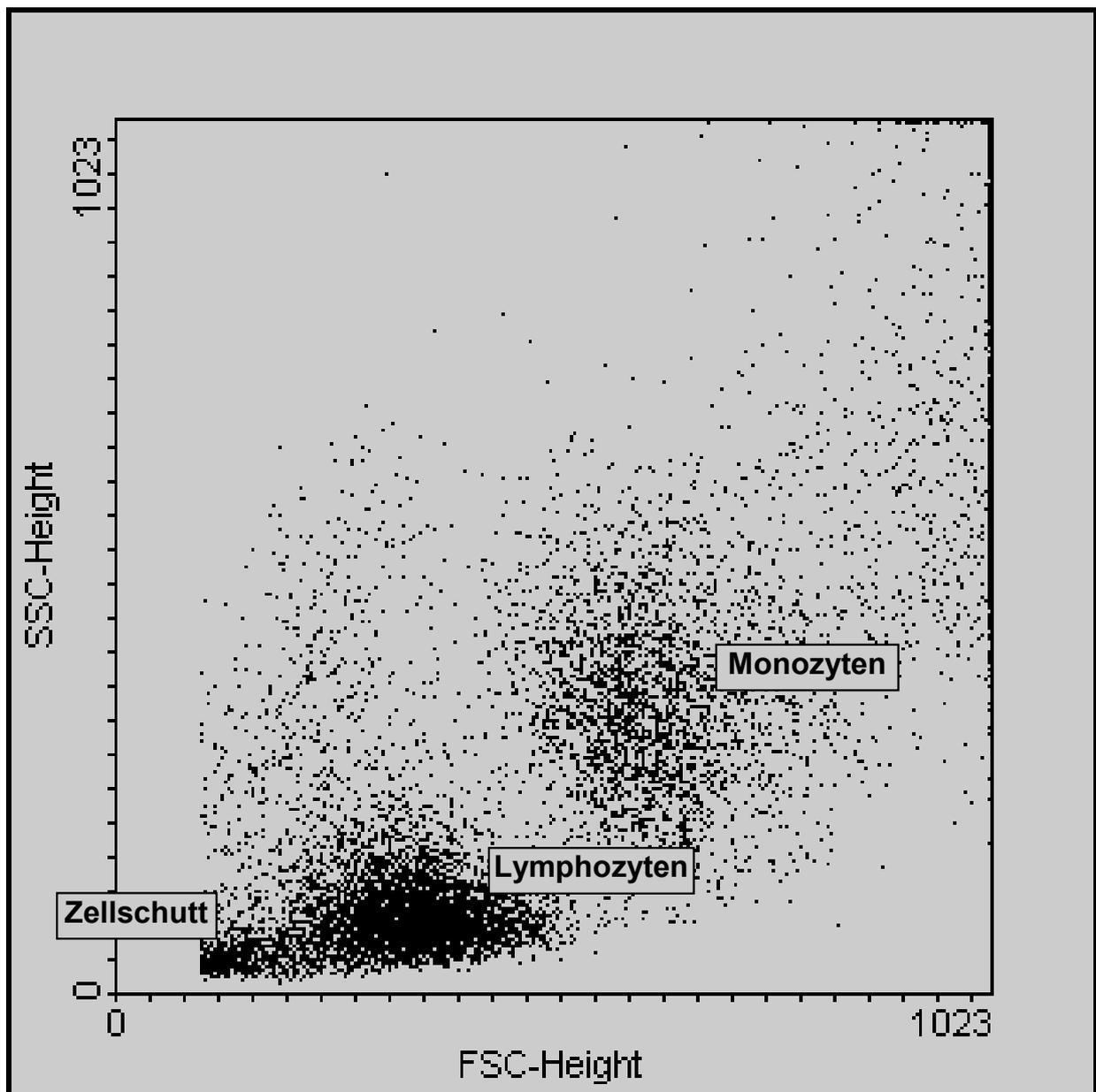
Nach einer weiteren 24-stündigen Inkubationszeit wurden die Proben bei 680 x g über einem Histopaque-Trennmedium (Dichte: 1,077 g/ml) für 20 min zentrifugiert. Die Plasma-Schicht wurde abpipettiert und in Reaktionsgefäßen bis zur Zytokinbestimmung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Der buffy coat und die Interphase wurden wie oben beschrieben separiert und für die durchflusszytometrische Analyse aufgearbeitet.

### **3.3.3 Durchflusszytometrische Analyse der Monozyten/Makrophagen**

Die PBMCs wurden mittels eines Durchflusszytometers (FACScan; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) analysiert und mit der Software von Cellquest (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) quantifiziert.

Mit jeder Patientenprobe wurden zwei Messungen durchgeführt. In der ersten Messung wurden 10.000 aller in der Suspension enthaltenen Zellen analysiert. Die gezählten Zellen ließen sich anhand ihrer Größe (x-Achse: forward scatter, FSC) und ihres Granulierungsgrades (y-Achse: side scatter, SSC) drei voneinander getrennten Zellpopulationen zuordnen: Die Population mit der geringsten Zellgröße bilden vereinzelte Erythrozyten und Zellschutt. Eine mittlere Zellgröße und Granularität besitzen die Lymphozyten. Die größten Zellen mit der stärksten Granularität sind Monozyten. In Abbildung 3.1 ist eine repräsentative Messung dargestellt.

Abb. 3.1: Darstellung einer repräsentativen durchflusszytometrischen Messung

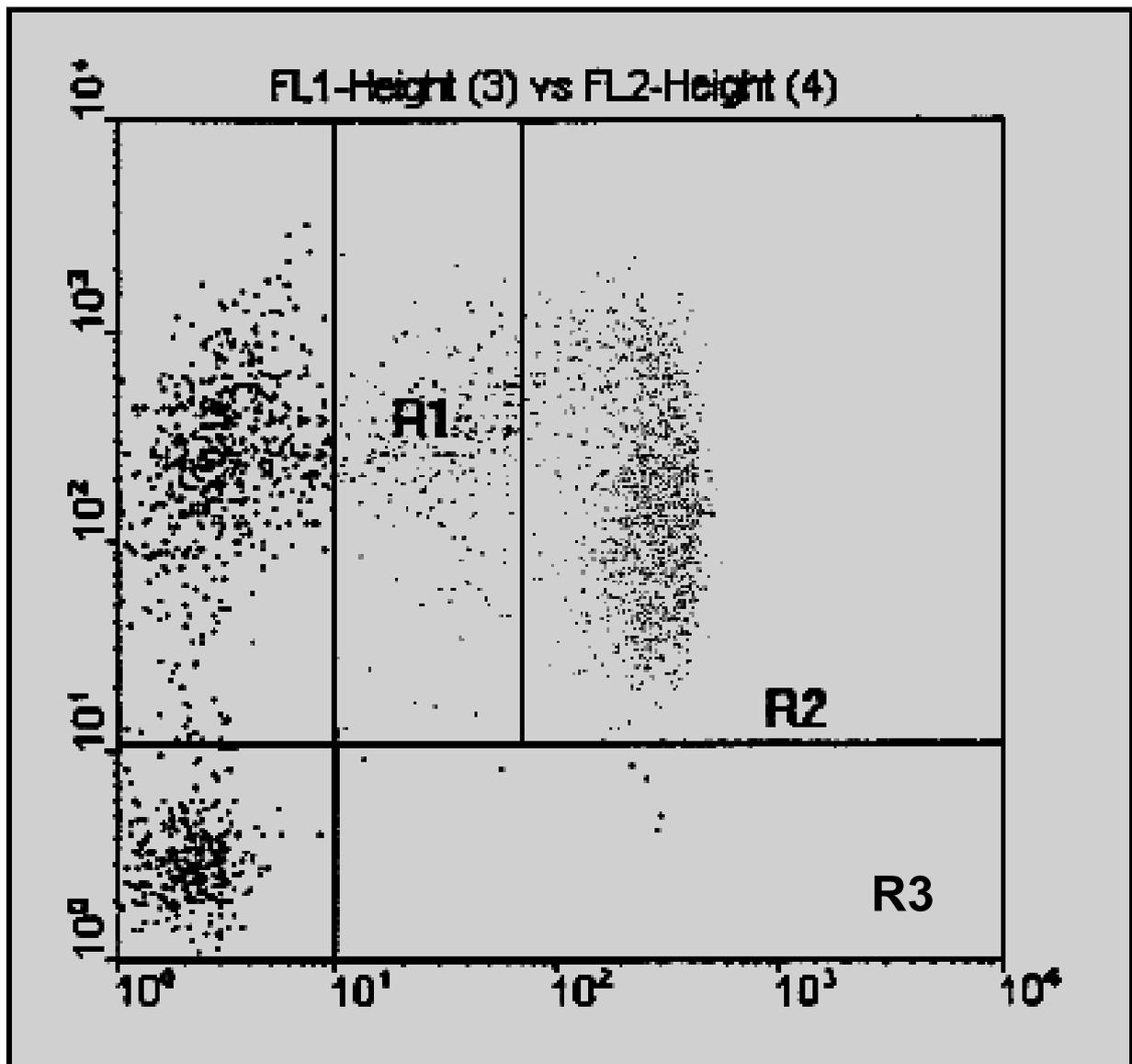


Die Zellgröße (x-Achse) ist gegen die Granularität (y-Achse) dargestellt. Einheit beider Achsen: 0,01 Volt

Um die zu analysierende Population der Monozyten wurde ein Fenster gesetzt und in einer zweiten Messung 10.000 Zellen aus diesem Rahmen gezählt. Diese Zellen wurden dann anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften näher differenziert. Aufgetragen wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von Fluoreszeinisothiozyanat (FITC), welches an den CD14-Antikörper gekoppelt ist gegen die MFI von Phycoerythin (PE), welches an den HLA-DR-Antikörper gekoppelt ist. Der so erhaltene Plot wurde durch zwei Geraden bei  $256 \cdot 10^{-2} \text{V}$  in vier Quadranten unterteilt, da aufgrund von Vorversuchen davon auszugehen war, dass es sich bei Messwerten unterhalb dieser Grenze um Autofluoreszenz bzw. unspezifische

Bindungen handelt. Zellen mit höheren Werten wurden als HLA-DR bzw. CD14 positiv angesehen. Nach Ziegler-Heitbrock wurde die Expressionsdichte des LPS-bindenden Oberflächenrezeptors CD14 zusätzlich semiquantitativ in zwei Subpopulationen aufgeteilt: in

**Abb. 3.2:** Darstellung der Monozyten-Subpopulationen; Mittlere Fluoreszenzintensitäten in Volt



Auf der x-Achse ist die MFI von FITC, gekoppelt an den CD14-AK, auf der y-Achse die MFI von PE, gekoppelt an den HLA-DR-AK dargestellt. Die beiden Linien, die die Achsen bei  $10^1$  schneiden, teilen den Graph in vier Quadranten. Werte  $<10$  entsprechen der Eigenfluoreszenz, Werte  $>10$  resultieren aus der Fluoreszenz der Antikörper.

- Region 1: CD14 einfach-positive, HLA-DR positive Monozyten
- Region 2: CD14 zweifach-positive, HLA-DR positive Monozyten
- Region 3: CD14 positive, HLA-DR negative Monozyten

Zellen mit niedriger Expressionsdichte (CD14 einfach-positive Zellen; CD14+), ein Phänotyp, der vorwiegend proinflammatorische Zytokine produziert und Zellen mit hoher Expressionsdichte (CD14 zweifach-positive Zellen; CD14++), die primär für die antiinflammatorische Zytokinantwort nach Endotoxinstimulation verantwortlich sind. Die Grenze zwischen beiden Populationen wurde in Anlehnung an Ziegler-Heitbrock bei einer mittleren Fluoreszenzintensität von  $468 \cdot 10^{-2}V$  angenommen [ZIEGLER-HEITBROCK, 1988]. So konnten in der gewählten Population der Monozyten drei verschiedene Subpopulationen unterschieden werden (Abbildung 3.2).

Zellen aus den Regionen 1, 2 und 3 wurden als Gesamtpopulation gleich 100% gesetzt und dienten den nachfolgenden Untersuchungen als Nennermenge. So errechnet sich beispielsweise die Fraktion der CD14 einfach-positiven Zellen funktionstüchtiger Monozyten aus der Formel:

$$\text{Region 1} / (\text{Region 1} + \text{Region 2} + \text{Region 3})$$

### 3.3.4 Messung der Zytokine mittels ELISA

Die Messungen der Zytokinkonzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 erfolgten, gesammelt für mehrere Patienten, innerhalb von drei Monaten nach Anfertigung des Vollblutansatzes mit kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (enzyme linked immunosorbent assay, Roche Molecular Diagnostics, Mannheim). Die Analyse selbst erfolgte exakt mit der vom Hersteller angegebenen Technik [ROCHE, 1999]. Die Testmethode der Zytokinassays beruht dabei auf einem quantitativen „Sandwich Prinzip“. Zwei monoklonale Maus-Antikörper erkennen unterschiedliche, in der Rezeptor-bindenden Region liegende Epitope des zu messenden Zytokins, so dass nur biologisch wirksames Zytokin gemessen wird. Die Analyse kann in folgende Einzelschritte aufgegliedert werden:

- Im Proben- oder Standardmaterial enthaltenes Zytokin wird im ersten Inkubationsschritt von einem biotinylierten Wandantikörper und von einem Peroxidase-konjugierten Detektionsantikörper gebunden (=Sandwich-Bildung). Der gebildete Komplex wird dabei über den biotinylierten Antikörper an die streptavidinbeschichtete Wand der Mikrotiterplatte fixiert.
- Im folgenden Waschschrift werden ungebundene Antikörper ausgewaschen und unspezifische Bindungen gelöst.
- Nach Zugabe von Tetramethylbenzidin als Substrat für die im Komplex gebundene Peroxidase wird in einem zweiten Inkubationsschritt eine Farbreaktion initiiert.

- Durch Zugabe von Schwefelsäure als Stopplösung wird die Farbentwicklung beendet und es erfolgt die photometrische Messung. Die Farbintensität ist der Zytokinkonzentration proportional.
- Für jede Testserie werden Standards mit bekannten Konzentrationen mitgeführt und eine Bezugskurve durch Auftragen von Extinktion gegen Konzentration erstellt. Die Zytokinkonzentration im Probenmaterial wird durch Ablesen an dieser Kurve ermittelt.

Die Assays für die verschiedenen Zytokine unterscheiden sich nur in Details. Die Abweichungen werden in Tabelle 3.5 aufgeführt.

**Tabelle 3.5: Arbeitsschema der verwendeten ELISA-Kits [ROCHE, 1999].**

Arbeitsschritte	Volumen (pro well)	Zeit		
		TNF- $\alpha$	IL-6	IL-10
<b>1</b> Proben und Standards in die entsprechenden wells der Mikrotiterplatte pipettieren	20 $\mu$ l			
<b>2</b> 1. Inkubation nach Zugabe der Immunoreagenzlösung (enthält die beiden Antikörper)	200 $\mu$ l	4 h bei RT auf einem Schüttler	2 h bei RT auf einem Schüttler	2 h bei RT auf einem Schüttler
<b>3</b> Zugabe der Waschlösung	3 x 300 $\mu$ l	3 x 1 min	3 x 1 min	3 x 1 min
<b>4</b> 2. Inkubation nach Zugabe der Substratlösung	200 $\mu$ l	15-25 min bei RT auf einem Schüttler im Dunkeln	20-30 min bei RT auf einem Schüttler im Dunkeln	15-25 min bei RT auf einem Schüttler im Dunkeln
<b>5</b> Zugabe der Stopplösung	50 $\mu$ l			
<b>6</b> Photometrische Messung bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm)				

RT = Raumtemperatur

Die Absorption wurde für alle Assays mit dem ELISA-Reader (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath) gemessen und mit Hilfe des Softwarepakets „MikroWin“ (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath) analysiert. Da aus Vorversuchen bekannt war, dass nach LPS- bzw. SAC-I-Stimulation deutlich höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen zu erwarten waren als bei spontaner Zytokinfreisetzung, wurden die stimulierten TNF- $\alpha$ -Proben im Verhältnis 1:10

verdünnt und der Verdünnungsfaktor anschließend bei der Berechnung der Konzentrationen berücksichtigt. Dadurch war es möglich, die Messungen im linearen Bereich der gleichzeitig erstellten Standardkurve durchzuführen. Alle unstimulierten Proben sowie die IL-10-Konzentrationen wurden unverdünnt analysiert. Weitere Informationen zu den verwendeten ELISA-Kits sind in Tabelle 3.6 zusammengefasst.

**Tabelle 3.6: Informationen zu den verwendeten ELISA-Kits [ROCHE, 1999]**

<b>ELISA-Kit</b>	<b>h-TNF-<math>\alpha</math></b>	<b>h-IL-6</b>	<b>h-IL-10</b>
<b>Sensitivität *</b>	> 12 pg/ml	> 10 pg/ml	> 5 pg/ml
<b>Messbereich</b>	20 - ca. 800 pg/ml	5 - ca. 1000 pg/ml	5 - ca. 700 pg/ml
<b>Intra-Assay Varianz</b>	4,6 $\pm$ 1,2%	< 8%	< 6%
<b>Inter-Assay Varianz</b>	6,7 $\pm$ 1,1%	< 15%	< 12%

Zahlenwerte sind Angaben als Grenzwert, Bereich oder Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung.

\* Die Sensitivität ist angegeben als Detektionsgrenze („Limit of detection“).

### 3.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik der Universität des Saarlandes und unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Software-Pakets SigmaStat<sup>®</sup> (Version 2.03, SPSS Science Software GmbH, Erkrath). Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurde das Zeichenprogramm SigmaPlot 2000<sup>®</sup> (Version 6.0, SPSS Science Software GmbH, Erkrath) benutzt. Bei den Prozentdarstellungen der Zytokinantwort erfolgte die Berechnung der Werte aufgrund des hohen SEM der durch das hohe Maß an interindividueller Variabilität bedingt ist in LOG%.

Für die Datenanalyse galt: Bei den stetigen Daten erfolgte zuerst eine Prüfung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test. Waren die Kriterien für eine parametrische Testung erfüllt, wurde zum Vergleich von zwei Gruppen der ungepaarte t-Test oder bei mehr als zwei Gruppen eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Bei wiederholten Messungen wurde innerhalb einer Gruppe der gepaarte t-Test bzw. die Varianzanalyse für wiederholte Messungen (repeated measures ANOVA) verwendet, zur

Analyse des Einflusses von zwei Merkmalen die zweifaktorielle Varianzanalyse für wiederholte Messungen. Wurde bei einer Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied festgestellt, erfolgte anschließend der Student-Newman-Keuls-Test zur post-hoc-Analyse für multiple Vergleiche bzw. der Bonferroni-Test zur post-hoc-Analyse für Vergleiche gegen eine Kontrollgruppe. Waren die Kriterien für die Durchführung parametrischer Testverfahren nicht erfüllt, so wurden entsprechende nichtparametrische Analyseverfahren (Mann-Whitney-U-Test, Wilcoxon-Test, Kruskal-Wallis-Test bzw. Friedman-Test) angewandt. Alle Tests wurden mit zweiseitiger Fragestellung durchgeführt, das Signifikanzniveau als  $p < 0,05$  festgelegt und die Daten als Mittelwert und Standardfehler (SEM) dargestellt. Die graphische Darstellung der Daten erfolgte als Liniendiagramm mit Angabe der Regressionsgeraden.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Demographische Daten und SIRS-Kriterien

Im Untersuchungszeitraum wurden insgesamt 24 Patienten mit der Diagnose „schwere Sepsis“ in die Studie eingeschlossen, jeweils 12 Patienten pro Gruppe.

#### **SIRS-Kriterien und C-reaktives Protein**

Die SIRS-Kriterien an Tag 1 bei Aufnahme in die vorliegende Untersuchung sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. In beiden Gruppen lag die Herzfrequenz (HF) deutlich über 100/min. Die Konzentration an C-reaktivem Protein (CRP) war ebenfalls in beiden Gruppen stark erhöht und lag in der Midazolamgruppe im Mittel bei über 200 mg/l, in der Propofolgruppe bei über 250 mg/l. Im Rahmen der Inflammationsreaktion wurden in beiden Patientengruppen erhöhte Leukozytenzahlen gemessen. Bei Studienbeginn lag eine Leukozytose von im Mittel 23.500 Leukozyten/ $\mu$ l in der Midazolamgruppe, sowie 17.500 Leukozyten/ $\mu$ l in der Propofolgruppe vor. Insgesamt konnten bei Studienbeginn keine signifikanten Unterschiede der beiden Gruppen festgestellt werden.

#### **Dauer der Intensivbehandlung und Beatmungstage**

Gemäß den Einschlusskriterien für die vorliegende Untersuchung wurden alle Patienten bei Studienbeginn maschinell beatmet. Der Aufenthalt auf der Intensivstation und die Beatmungsdauer wurden auf der Basis einer Mitternachtsstatistik ermittelt. Die Beatmungstherapie erfolgte generell über einen Endotrachealtubus oder eine Trachealkanüle. Patienten wurden als „beatmet“ bezeichnet, solange eine maschinelle Unterstützung erfolgte. Signifikante Unterschiede bezüglich der Länge der intensivmedizinischen Behandlung sowie der maschinellen Beatmung zwischen der Midazolam- und der Propofolgruppe wurden nicht festgestellt (Tabelle 4.1).

**Tabelle 4.1: Demographische Daten und SIRS-Kriterien bei Patienten mit schwerer Sepsis an Tag 1 nach Studieneinschluss**

Patientendaten		Midazolam	Propofol	p
Alter (Jahre)		58,8 ± 4,4	62,3 ± 4,1	n.s.
Größe (cm)		169 ± 1,6	167 ± 1,8	n.s.
Gewicht (kg)		75,9 ± 5,4	70,3 ± 4,3	n.s.
SIRS-Kriterien:	Körpertemp. (°C)	38,1 ± 0,2	38,0 ± 0,2	n.s.
	HF (1/min.)	115,4 ± 4,8	111,1 ± 3,5	n.s.
	Leukozyten (x10 <sup>3</sup> /µl)	23,5 ± 2,0	17,5 ± 2,2	n.s.
	CRP (mg/l)	207 ± 20,8	276 ± 39,8	n.s.
Dauer der Intensivbehandlung (Tage)		25,7 ± 5,0	24,5 ± 4,8	n.s.
Beatmungsdauer (Tage)		10,9 ± 1,5	12,9 ± 3,1	n.s.

Alle Angaben als Mittelwert ± SEM

n.s. = nicht signifikant

## 4.2 Intensivmedizinische Diagnosen und Erreger

Wie oben bereits dargelegt, musste die infektiöse Ursache der schweren Sepsis mikrobiologisch gesichert oder zumindest nach klinischen Kriterien augenscheinlich bewiesen sein. Daher wurde bei allen Patienten mikrobiologisches Untersuchungsmaterial schon intraoperativ oder unmittelbar nach Aufnahme auf der Intensivstation entnommen und eine zügige Erregeridentifikation angestrebt. Alle Befunde wurden bezüglich ihrer Plausibilität mit dem zuständigen Mikrobiologen besprochen.

Die jeweiligen intensivmedizinischen Hauptdiagnosen sowie die nachgewiesenen Erreger, die als verantwortlich für die Entstehung der Sepsis betrachtet wurden, sind in Tabelle 4.2 dargestellt.

**Tabelle 4.2: Diagnosen und nachgewiesene Erreger, die bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten als verantwortlich für die Entstehung der Sepsis betrachtet wurden**

Patient			Diagnose	Erreger
ID	Alter	Medikation		
1	69	Midazolam	Dünndarmperforation	Enterobacter
2	55	Midazolam	Perforierte Appendizitis	E.coli
3	48	Midazolam	Parapharyngealabszess	Streptokokken, Staph. aureus
4	90	Propofol	Rektumperforation	E.coli
5	61	Propofol	Dünndarmperforation	Enterokokken
6	42	Propofol	Kolonperforation	Salmonella sp.
7	59	Midazolam	Beinphlegmone	- Nicht identifiziert -
8	41	Propofol	Nekrot. Pankreatitis & P.-abszess	Koagulase-neg. Staph.
9	69	Midazolam	Nekrotisierende Cholezystitis	E.coli, Enterokokken
10	68	Propofol	intraabdomineller Abszeß	E.coli, Enterokokken, Pseudomonas
11	76	Midazolam	Perforierte Sigmadivertikulitis	Enterokokken, Pseudomonas
12	53	Midazolam	Anastomoseninsuff. nach Kolon-OP	Enterokokken, E.coli
13	45	Midazolam	Anastomoseninsuff. nach Jejunum-OP	Enterokokken
14	69	Propofol	Mediastinitis nach Ösophagusruptur	- Nicht identifiziert -
15	72	Propofol	Osteomyelitis nach Hüftgelenkersatz	Streptokokken
16	46	Midazolam	Dünndarmperforation	Pseudomonas, Enterokokken
17	72	Propofol	Pneumonie	Staph. aureus
18	60	Propofol	Kolonperforation	E.coli
19	62	Propofol	Anastomoseninsuffizienz	- Nicht identifiziert -
20	30	Midazolam	Pneumonie, Peritonitis	Pseudomonas
21	73	Midazolam	Dünndarmperforation	Enterokokken
22	46	Propofol	multiple Abszesse	Aktinomyces meyeri
23	82	Midazolam	Pneumonie	E.coli/Enterokokken
24	65	Propofol	Osteomyelitis und Psoasabszeß	Pseudomonas aeruginosa

Den Patienten mit schwerer Sepsis wurden in chronologischer Reihenfolge ID-Kennungen von 1 bis 24 zugeteilt.

Passend zu dem auf unserer Intensivstation überwiegend behandelten Patientengut wurde bei 18 Patienten (75%) eine abdominalchirurgische Erkrankung als Ursache der schweren Sepsis identifiziert; hingegen wurden z.B. lediglich 3 Patienten wegen einer Pneumonie in die Studie aufgenommen. Bei 13 Patienten (54%) wurden gramnegative Erreger nachgewiesen, die allein oder in Kombination als verantwortlich für die Entstehung der Sepsis betrachtet wurden. Bei weiteren 3 Patienten (13%) wurden zwar ausschließlich Enterokokken nachgewiesen, jedoch kann hier aufgrund der Erkrankungslokalisation (Dünndarm) eine Mitbeteiligung gramnegativer Erreger nicht ausgeschlossen werden. Bei 5 Patienten (21%) wurde ausschließlich von grampositiven Erregern als Ursache der Erkrankung ausgegangen. Kein Erreger konnte schließlich bei 3 Patienten (13%) identifiziert werden (Tabelle 4.2).

### 4.3 Katecholamintherapie

Eine Insuffizienz des Herz-Kreislaufsystems erforderte bei 10 von 12 (83,3%) der Patienten in der Midazolamgruppe und bei allen Patienten in der Propofolgruppe eine kreislaufunterstützende Katecholamintherapie mit Noradrenalin. Bei Studieneinschluss betrug die mittlere Dosierung bei Patienten der Midazolamgruppe 0,43 µg/kg/min (Bereich 0,03 - 1,55 µg/kg/min) und bei Patienten der Propofolgruppe 0,40 µg/kg/min (Bereich 0,04 - 0,98 µg/kg/min). Die Dosierungshöhe der Katecholamine war in beiden Gruppen auch im weiteren Verlauf der Therapie vergleichbar; statistisch signifikante Unterschiede bestanden nicht (Tabelle 4.3).

**Tabelle 4.3: Noradrenalintherapie bei Patienten mit schwerer Sepsis**

Noradrenalin	Midazolam		Propofol	
	(in µg/kg/min)	n	(in µg/kg/min)	n
Tag 1	0,43 ± 0,17	9	0,40 ± 0,08	12
Tag 2	0,40 ± 0,17	10	0,55 ± 0,18	12
Tag 3	0,34 ± 0,14	9	0,71 ± 0,46	9
Tag 4	0,33 ± 0,12	7	0,54 ± 0,34	8
Tag 8	0,28 ± 0,09	4	0,03	1

Alle Angaben als Mittelwert ± SEM

Zusätzlich wurde bei einigen Patienten Dobutamin eingesetzt. Auch hier ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich beider Gruppen (Tabelle 4.4).

**Tabelle 4.4: Dobutamintherapie bei Patienten mit schwerer Sepsis**

Dobutamin	Midazolam		Propofol	
	(in µg/kg/min)	n	(in µg/kg/min)	n
Tag 1	--	0	--	0
Tag 2	1,81	1	1,96	1
Tag 3	3,29 ± 1,48	2	2,17 ± 0,21	2
Tag 4	2,84 ± 1,93	2	4,76	1
Tag 8	2,38	1	--	0

Alle Angaben als Mittelwert ± SEM

## 4.4 Intensivmedizinische Scores

Passend zu den Einschlusskriterien wiesen die Patienten mit schwerer Sepsis insgesamt hohe APACHE II-, MOF- und SOFA- Scorewerte auf. Dabei waren die Scorewerte bei Studieneinschluss in beiden Gruppen vergleichbar. Signifikante Unterschiede an Tag 1 bestanden nicht (Tabelle 4.5).

**Tabelle 4.5: Intensivmedizinische Scorewerte der Patienten mit schwerer Sepsis an Tag 1**

<b>Tag 1</b>	<b>Midazolam (Punktwerte)</b>	<b>Propofol (Punktwerte)</b>	<b>p</b>
<b>APACHE II-Score</b>	24,2 ± 2,0	27,1 ± 1,6	n.s.
<b>MOF-Score</b>	9,6 ± 0,5	9,8 ± 0,3	n.s.
<b>SOFA-Score</b>	10,8 ± 0,5	12,1 ± 0,7	n.s.

Alle Angaben als Mittelwert ± SEM

n.s. = nicht signifikant

Im folgenden wird der Verlauf der intensivmedizinischen Scores innerhalb der ersten 8 Tage nach Studieneinschluss dargestellt:

### 4.4.1 APACHE II-Score

Den Einschlusskriterien entsprechend wurden bei allen Patienten initial hohe Scorewerte beobachtet (24,2 ± 2,0 Punkte in der Midazolamgruppe und 27,1 ± 1,6 Punkte in der Propofolgruppe). Am achten Tag nach Beobachtungsbeginn lag der Scorewert in der Propofolgruppe mit 16,0 ± 2,6 Punkten signifikant unterhalb des Ausgangswertes. Auch bei den Patienten in der Midazolamgruppe konnte eine Erholung der Scorewerte auf 20,9 ± 2,1 Punkte verzeichnet werden (Tabelle 4.6). Allerdings blieb der Punktwertabfall hier ohne Signifikanz. Auch der Vergleich beider Gruppen untereinander (Midazolam vs. Propofol) ergab keine signifikanten Unterschiede.

**Tabelle 4.6: APACHE II-Scores der Patienten mit schwerer Sepsis im Verlauf der ersten 8 Tage nach Studieneinschluss**

<b>APACHE II-Score</b>	<b>Midazolam (Punktwerte)</b>	<b>Propofol (Punktwerte)</b>	<b>p</b>
<b>Tag 1</b>	24,2 ± 2,0	27,1 ± 1,6	n.s.
<b>Tag 2</b>	23,2 ± 1,9	24,2 ± 2,5	n.s.
<b>Tag 3</b>	24,4 ± 2,2	22,7 ± 1,9	n.s.
<b>Tag 4</b>	22,0 ± 1,9	22,1 ± 2,3	n.s.
<b>Tag 8</b>	20,9 ± 2,1	16,0 ± 2,6 #	n.s. / <0,001

Alle Angaben als Mittelwert ± SEM

n.s. = nicht signifikant

# =  $p < 0,05$  vs. Tag 1

#### 4.4.2 MOF-Score

Wie bei den APACHE II-Scores, wurden auch initial hohe Werte in den MOF-Scores beobachtet (9,6 ± 0,5 Punkte in der Midazolamgruppe und 9,8 ± 0,3 Punkte in der Propofolgruppe). Im Verlauf des Beobachtungszeitraumes waren die Werte in beiden Gruppen rückläufig. Auch hier war der Punktwertabfall in der Propofolgruppe mit Durchschnittswerten von 5,6 ± 0,7 am achten Tag insgesamt deutlicher ausgeprägt als in der Midazolamgruppe, jedoch in beiden Gruppen signifikant. Der Vergleich beider Gruppen untereinander (Midazolam vs. Propofol) ergab keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 4.7).

**Tabelle 4.7: MOF-Scores der Patienten mit schwerer Sepsis im Verlauf der ersten 8 Tage nach Studieneinschluss**

<b>MOF-Score</b>	<b>Midazolam (Punktwerte)</b>	<b>Propofol (Punktwerte)</b>	<b>p</b>
<b>Tag 1</b>	9,6 ± 0,5	9,8 ± 0,3	n.s.
<b>Tag 2</b>	9,4 ± 0,6	9,6 ± 0,5	n.s.
<b>Tag 3</b>	8,9 ± 0,8	8,8 ± 0,6	n.s.
<b>Tag 4</b>	8,4 ± 0,8	8,5 ± 0,9	n.s.
<b>Tag 8</b>	7,4 ± 0,9 #	5,6 ± 0,7 #	<0,001 / <0,001

Alle Angaben als Mittelwert ± SEM

n.s. = nicht signifikant

# =  $p < 0,05$  vs. Tag 1

#### 4.4.3 SOFA-Score

Wie bereits für APACHE II- und MOF-Scores beschrieben, waren auch die SOFA-Scores initial erhöht ( $10,8 \pm 0,5$  Punkte in der Midazolamgruppe und  $12,1 \pm 0,7$  Punkte in der Propofolgruppe). Im weiteren Verlauf zeigte sich auch hier ein Rückgang der Scorewerte in beiden Gruppen mit Signifikanz an Tag 8 ( $7,8 \pm 1,6$  Punkte in der Midazolamgruppe und  $4,1 \pm 0,8$  Punkte in der Propofolgruppe). Der Vergleich beider Gruppen untereinander (Midazolam vs. Propofol) ergab keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 4.8).

**Tabelle 4.8: SOFA-Scores der Patienten mit schwerer Sepsis im Verlauf der ersten 8 Tage nach Studieneinschluss**

SOFA-Score	Midazolam (Punktwerte)	Propofol (Punktwerte)	p
Tag 1	$10,8 \pm 0,5$	$12,1 \pm 0,7$	n.s.
Tag 2	$10,3 \pm 0,8$	$12,0 \pm 0,7$	n.s.
Tag 3	$10,3 \pm 1,1$	$11,0 \pm 0,8$	n.s.
Tag 4	$9,9 \pm 1,2$	$9,8 \pm 1,3$	n.s.
Tag 8	$7,8 \pm 1,6 \#$	$4,1 \pm 0,8 \#$	<b>0,002 / &lt;0,001</b>

Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM

n.s. = nicht signifikant

# =  $p < 0,05$  vs. Tag 1

Auffallend in der Betrachtung der Ergebnisse aller drei intensivmedizinischen Scores ist, dass die Patienten der Propofolgruppe trotz allgemein höheren Ausgangswerten an Tag 1 am Ende des Untersuchungszeitraums niedrigere Scores als die Patienten der Midazolamgruppe erreichten.

#### 4.5 Leukozytenzahl

Im Rahmen der Inflammationsreaktion wurden in beiden Patientengruppen erhöhte Leukozytenzahlen gemessen (bei Studienbeginn im Mittel  $23.500/\mu\text{l}$  in der Midazolamgruppe und  $17.500/\mu\text{l}$  in der Propofolgruppe). Ein signifikanter Unterschied an Tag 1 zwischen beiden Gruppen bestand nicht. Eine Leukozytopenie an Tag 1 wurde bei keinem der Patienten beider Gruppen nachgewiesen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung konnte in

beiden Gruppen eine kontinuierliche Rückbildung der Leukozytose auf mittlere Werte von 18.100/ $\mu\text{l}$  in der Midazolamgruppe sowie 14.000/ $\mu\text{l}$  in der Propofolgruppe beobachtet werden. Die Normalisierung der Leukozytenzahlen war jedoch nur in der Midazolamgruppe (Tag 8) signifikant. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen bestand lediglich an Tag 3. Die Leukozytenzahlen sind in Tabelle 4.9 dargestellt.

**Tabelle 4.9: Leukozytenzahlen bei Patienten mit schwerer Sepsis**

<b>Leukozyten</b>	<b>Midazolam</b> (x 10 <sup>3</sup> / $\mu\text{l}$ )	<b>Propofol</b> (x 10 <sup>3</sup> / $\mu\text{l}$ )	<b>p</b>
<b>Tag 1</b>	23,5 $\pm$ 2,0	17,5 $\pm$ 2,2	n.s.
<b>Tag 2</b>	21,1 $\pm$ 1,9	15,7 $\pm$ 1,9	n.s.
<b>Tag 3</b>	21,4 $\pm$ 2,9	13,7 $\pm$ 2,1 *	<b>0,029</b>
<b>Tag 4</b>	20,4 $\pm$ 2,9	13,7 $\pm$ 2,3	n.s.
<b>Tag 8</b>	18,1 $\pm$ 2,4 #	14,0 $\pm$ 2,3	<b>0,021 / n.s.</b>

Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM

n.s. = nicht signifikant

# = **p<0,05** vs. Tag 1

\* = **p<0,05** Propofol vs. Midazolam

## **4.6 Monozytenfunktion bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis**

Im vorliegenden Untersuchungsabschnitt soll eine differenzierte Untersuchung des Funktionszustandes der Monozyten/Makrophagen sowohl bei den gesunden Probanden als auch bei den Patienten mit schwerer Sepsis durchgeführt werden. Insbesondere soll der Einfluss der Anästhetika Midazolam und Propofol auf die Monozyten-/Makrophagenfunktion untersucht werden.

### **4.6.1 HLA-DR-Expression der Monozyten bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis**

Der Anteil HLA-DR-positiver Zellen lag bei gesunden Probanden stets im Normbereich. Im Kontroll-Vollblut ohne Medikamentenzusatz betrug der mittlere Anteil HLA-DR-positiver Zellen 96%. Nach Zugabe der Anästhetika nahm die monozytäre HLA-DR-Expression

geringfügig ab. Signifikante Unterschiede wurden dabei weder im Vergleich zur Kontrolle, noch zwischen den Sedativa verzeichnet (Tabelle 4.10).

Die Patienten mit schwerer Sepsis wiesen dagegen eine starke und im Erkrankungsverlauf lang anhaltende Suppression der monozytären HLA-DR-Expression auf. Im Vergleich zu den gesunden Probanden waren die Werte an jedem Untersuchungstag signifikant supprimiert.

**Tabelle 4.10: Monozytäre HLA-DR-Expression bei gesunden Probanden sowie bei Patienten mit schwerer Sepsis; angegeben als HLA-DR-positive Monozyten in Prozent aller Monozyten.**

HLA-DR		Midazolam (in %)	Propofol (in %)	p
Probanden:	Kontrolle	95,7 ± 1,8		
	Med. Effekt	92,6 ± 2,9	93,8 ± 2,0	n.s.
Sepsis Pat.:	Tag 1	60,2 ± 5,5 $\delta$	57,3 ± 7,3 $\delta$	<0,001 / 0,003
	Tag 2	56,2 ± 4,2 $\delta$	58,8 ± 8,6 $\delta$	<0,001 / 0,010
	Tag 3	52,2 ± 5,7 $\delta$	67,9 ± 6,0 $\delta$	<0,001 / 0,006
	Tag 4	59,0 ± 4,9 $\delta$	68,8 ± 6,2 $\delta$	<0,001 / 0,007
	Tag 8	61,7 ± 5,2 $\delta$	71,0 ± 4,8 $\delta$	<0,001 / 0,002

Alle Angaben als Mittelwerte ± SEM

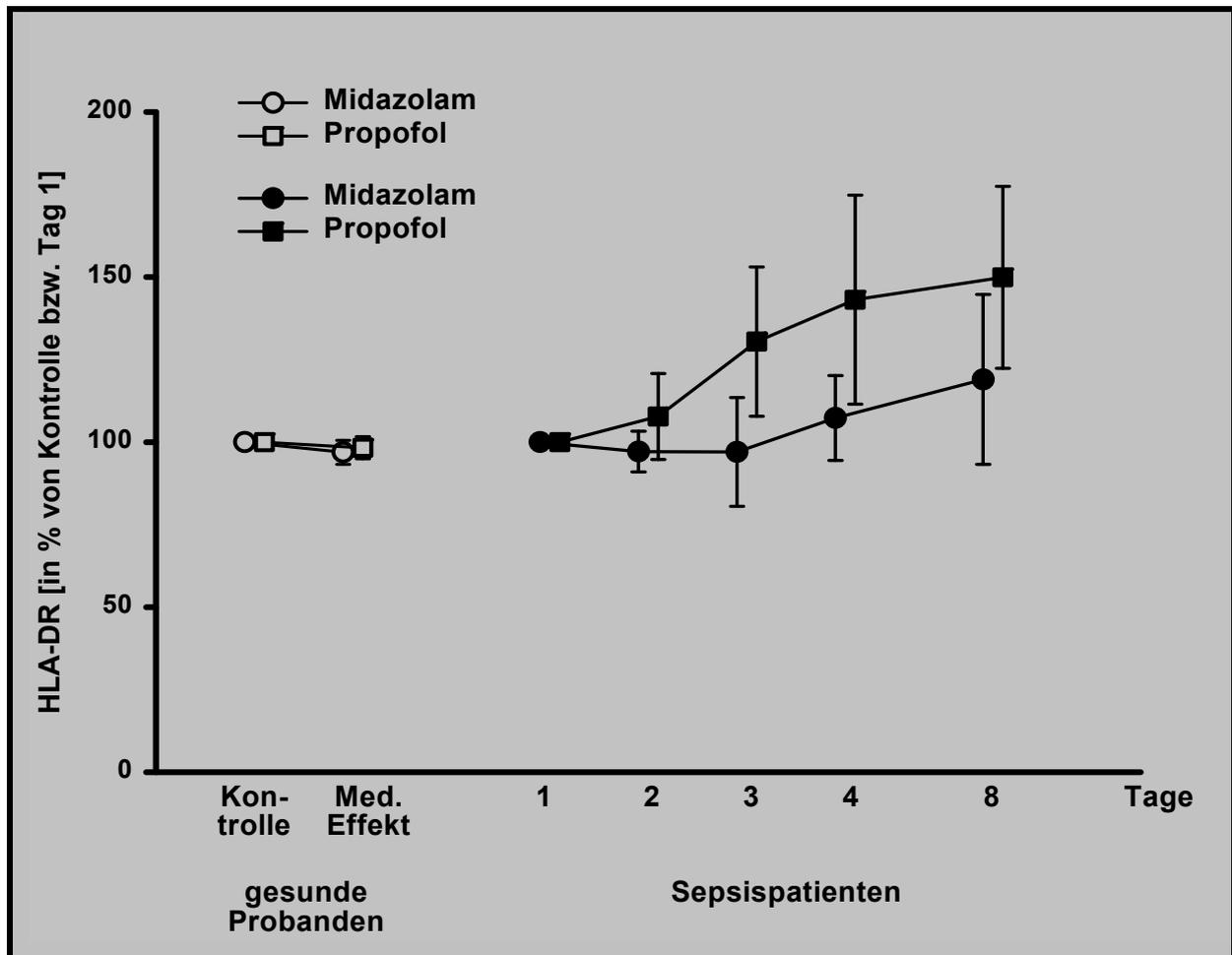
n.s. = nicht signifikant

$\delta$  =  $p < 0,05$  Sepsispatienten vs. Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe

Gemäß dem Analgosedierungsschema erhielten alle in die Studie eingeschlossenen Patienten am Tag der Diagnosestellung (Tag 1) Midazolam als Sedativum, um eine einheitliche Ausgangssituation gewährleisten zu können. Die Randomisierung zu einer der beiden Behandlungsgruppen erfolgte dann an Tag 2. Um nun wiederum den Verlauf hervorzuheben, beginnend vom gemeinsamen Ausgangswert an Tag 1, wurde im Folgenden auf Prozentdarstellungen zurückgegriffen. Hierfür wurden die Ergebnisse für jeden einzelnen Patienten als Prozentwert von Tag 1 berechnet; die Werte an Tag 1 entsprechen 100%.

Bei Patienten mit schwerer Sepsis, die Midazolam erhielten, blieb die monozytäre HLA-DR-Expression im wesentlichen auf gleichbleibend niedrigem Niveau supprimiert. Im Gegensatz dazu konnte in der Propofolgruppe eine kontinuierliche Erholung der HLA-DR-Fraktion über den Erkrankungsverlauf beobachtet werden. Signifikante Unterschiede konnten allerdings nicht nachgewiesen werden (Abbildung 4.5).

Abb. 4.5: Verlauf der Fraktion HLA-DR-positiver Monozyten innerhalb der ersten 8 Tage nach Studieneinschluss; dargestellt sind die Absolutwerte in Prozent von Tag 1



Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  SEM

#### 4.6.2 CD14-Expression der Monozyten bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis: Fraktion der CD14 einfach-positiven Monozyten

Die Fraktion der CD14 einfach-positiven Zellen betrug bei den gesunden Probanden etwa 15%. Die Zugabe von Midazolam hatte keinen Effekt auf die Anzahl CD14+ Zellen. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Zugabe von Propofol eine deutliche Zunahme des Anteils CD14 einfach-positiver Zellen. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied sowohl im Vergleich mit dem Kontroll-Vollblut als auch im Vergleich mit dem Midazolam-Vollblut der gesunden Probanden (Tabelle 4.11).

Die deutlich erhöhten Werte im Propofol-Vollblut der gesunden Probanden konnten in der Propofolgruppe der Patienten mit schwerer Sepsis in diesem Ausmaß nicht erreicht werden.

Es zeigte sich hier eine signifikant niedrigere Fraktion CD14 einfach-positiver Zellen bei septischen Patienten an den Tagen 1, 2 und 8 (Tabelle 4.11).

**Tabelle 4.11: CD14 einfach-positive Monozyten bei gesunden Probanden sowie bei Patienten mit schwerer Sepsis; angegeben als CD14+/HLA-DR-positive Monozyten in Prozent aller Monozyten**

CD14 einfach-pos.		Midazolam (in %)	Propofol (in %)	p
Probanden:	Kontrolle	15,2 ± 5,0		
	Med. Effekt	15,4 ± 4,6	63,6 ± 12,0 # *	n.s. / <b>0,004; 0,004</b>
Sepsis Pat.:	Tag 1	20,5 ± 4,0	21,2 ± 4,0 <b>δ</b>	n.s. / <b>0,001</b>
	Tag 2	18,6 ± 4,0	32,2 ± 8,4 <b>δ</b>	n.s. / <b>0,045</b>
	Tag 3	17,6 ± 3,4	38,0 ± 8,5 #	n.s. / <b>0,023</b>
	Tag 4	19,2 ± 2,7	36,5 ± 7,3 # *	n.s. / <b>0,008; 0,048</b>
	Tag 8	27,6 ± 6,0	22,6 ± 4,4 <b>δ</b>	n.s. / <b>0,004</b>

Alle Angaben als Mittelwert ± SEM

n.s. = nicht signifikant

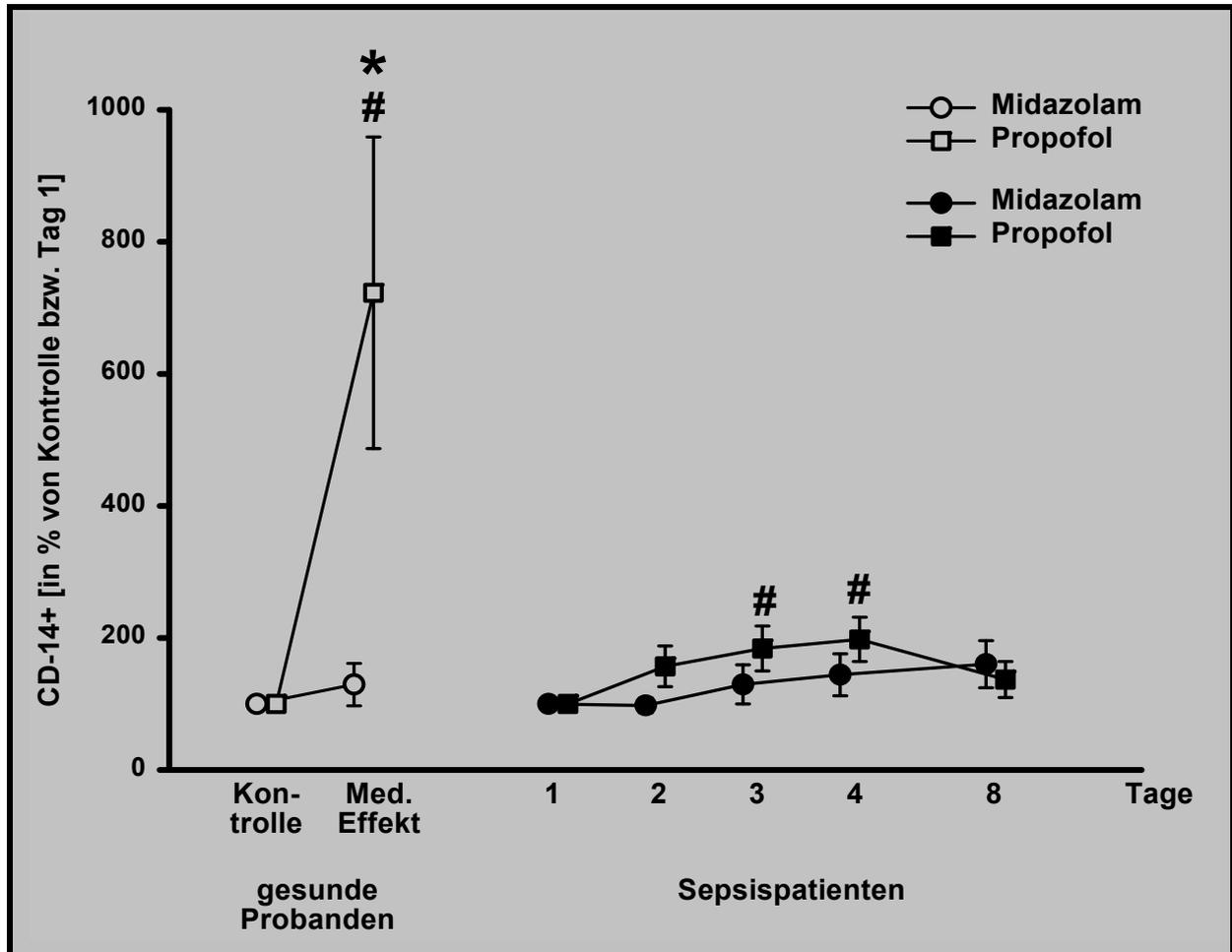
# = **p<0,05** Sepsispatienten vs. Tag 1 bzw. Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe vs. Probanden-Vollblut ohne Medikamente (Kontrolle)

**δ** = **p<0,05** Sepsispatienten vs. Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe

\* = **p<0,05** Propofol vs. Midazolam

Wie im Midazolam-Vollblut bei den gesunden Probanden blieben auch bei den Patienten mit schwerer Sepsis in der Midazolamgruppe die Werte im Untersuchungszeitraum auf einem annähernd gleichbleibend niedrigen Niveau. In der Prozentdarstellung konnte ein leichter, nicht signifikanter Anstieg des Anteils CD14 einfach-positiver Zellen beobachtet werden. Anders stellte sich der Verlauf in der Propofolgruppe dar: Hier konnte ein signifikanter Anstieg der CD14 einfach-positiven Zellen innerhalb der ersten Untersuchungshälfte an den Tagen 3 und 4 beobachtet werden (siehe Abbildung 4.6). An Tag 8 gingen die Werte wiederum annähernd auf das Ausgangsniveau von Tag 1 zurück. In der Darstellung der Absolutwerte konnte ferner ein signifikanter Unterschied zwischen den Medikamentengruppen an Tag 4 verzeichnet werden (Tabelle 4.11).

Abb. 4.6: Verlauf der Fraktion CD14 einfach-positiver Monozyten innerhalb der ersten 8 Tage nach Studieneinschluss; dargestellt sind die Absolutwerte in Prozent von Tag 1



Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM

# =  $p < 0,05$  Sepsispatienten vs. Tag 1 bzw. Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe vs. Probanden-Vollblut ohne Medikamente (Kontrolle)

\* =  $p < 0,05$  Propofol vs. Midazolam

#### 4.6.3 CD14-Expression der Monozyten bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis: Fraktion der CD14 zweifach-positiven Monozyten

Die Fraktion der CD14 zweifach-positiven Zellen betrug im Kontroll-Vollblut der gesunden Probanden im Mittel rund 80%. Während die Zugabe von Midazolam die Fraktionsstärke der CD14 zweifach-positiven Zellen nicht beeinflusste, ergab das Zufügen von Propofol eine deutliche Suppression der Werte. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied sowohl im Vergleich mit dem Kontroll-Vollblut als auch im Vergleich mit dem Midazolam-Vollblut (Tabelle 4.12).

**Tabelle 4.12: CD14 zweifach-positive Monozyten bei gesunden Probanden sowie bei Patienten mit schwerer Sepsis; angegeben als CD14++/HLA-DR-positive Monozyten in Prozentanteil aller Monozyten**

CD14 zweifach-pos.		Midazolam (in %)	Propofol (in %)	p
Probanden:	Kontrolle	80,6 ± 5,2		
	Med. Effekt	77,2 ± 3,8	30,2 ± 12,4 # *	n.s. / <b>0,004; 0,005</b>
Sepsis Pat.:	Tag 1	39,7 ± 3,5 $\delta$	36,1 ± 6,8	<b>&lt;0,001</b> / n.s.
	Tag 2	37,6 ± 2,7 $\delta$	26,6 ± 7,4	<b>&lt;0,001</b> / n.s.
	Tag 3	34,6 ± 6,0 $\delta$	30,0 ± 6,4	<b>&lt;0,001</b> / n.s.
	Tag 4	39,8 ± 5,1 $\delta$	32,3 ± 6,3	<b>&lt;0,001</b> / n.s.
	Tag 8	38,3 ± 7,0 $\delta$	48,4 ± 5,0	<b>&lt;0,001</b> / n.s.

Alle Angaben als Mittelwerte ± SEM

n.s. = nicht signifikant

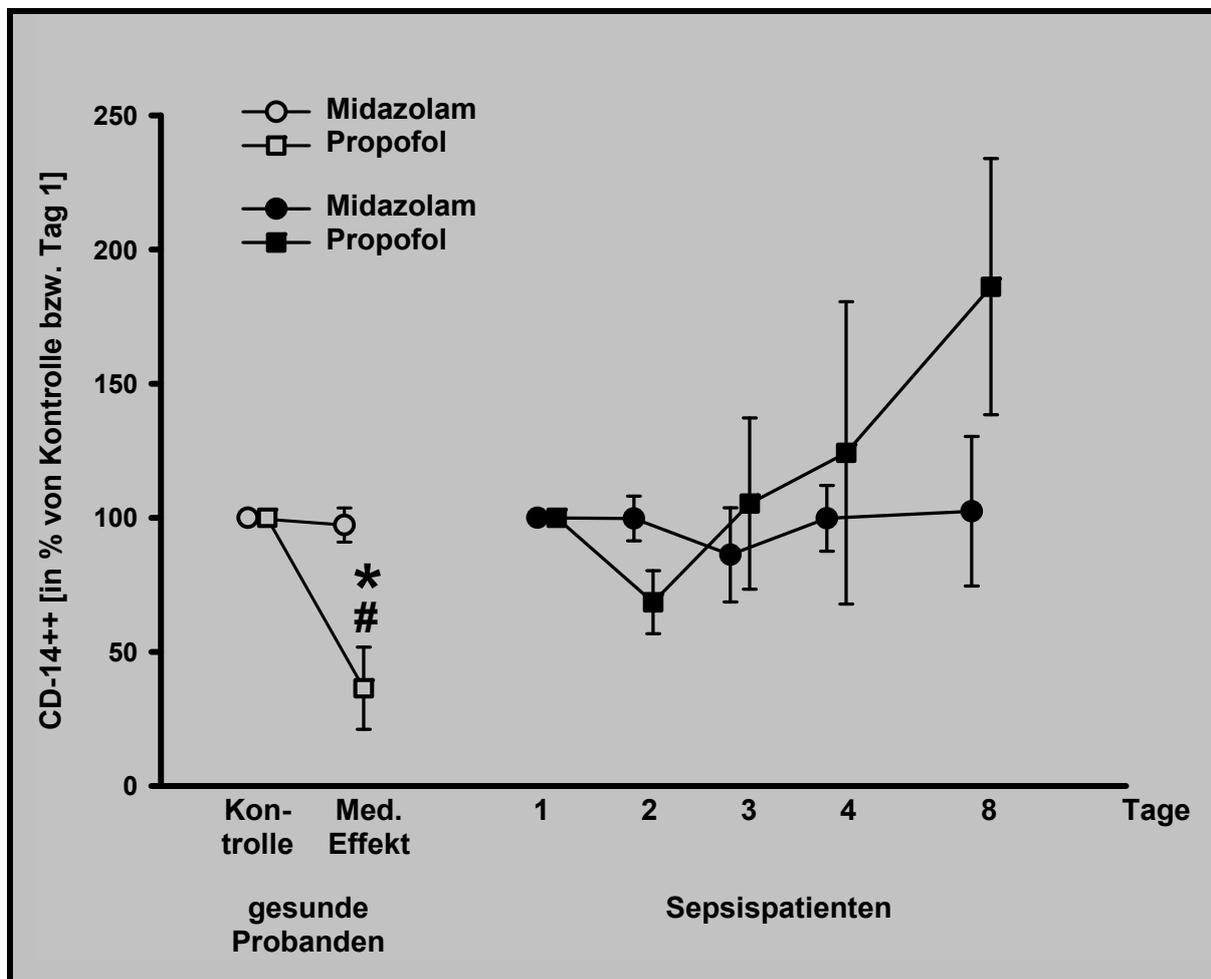
# = **p<0,05** Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe vs. Probanden-Vollblut ohne Medikamente (Kontrolle)

$\delta$  = **p<0,05** Sepsispatienten vs. Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe

\* = **p<0,05** Propofol vs. Midazolam

Im Vergleich zum Midazolam-Vollblut der gesunden Probanden waren die Werte in der Midazolamgruppe der Patienten mit schwerer Sepsis über den gesamten Untersuchungszeitraum deutlich supprimiert (Tabelle 4.12). Wie im Propofol-Vollblut der gesunden Probanden konnte in der Propofolgruppe der Patienten mit schwerer Sepsis zunächst eine weitere Suppression der CD14 zweifach-positiven Zellen an Tag 2 beobachtet werden. Im weiteren Verlauf stiegen die Werte dann kontinuierlich über das Ausgangsniveau hinaus an (Abbildung 4.7). Signifikante Unterschiede in den Kurvenverläufen der Sepsispatienten ergaben sich nicht.

Abb. 4.7: Verlauf der Fraktion CD14 zweifach-positiver Monozyten innerhalb der ersten 8 Tage nach Studieneinschluss; dargestellt sind die Absolutwerte in Prozent von Tag 1



Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM

# =  $p < 0,05$  Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe vs. Probanden-Vollblut ohne Medikamente (Kontrolle)

\* =  $p < 0,05$  Propofol vs. Midazolam

#### 4.7 Spontane Zytokinantwort bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind für die gesunden Probanden und für die Patienten mit schwerer Sepsis dargestellt. Nachfolgend wurde die spontane Zytokinantwort der Patienten mit schwerer Sepsis analysiert und mit der spontanen Zytokinantwort der gesunden Probanden verglichen.

#### 4.7.1 spontane TNF- $\alpha$ -Antwort

Im Vollblut der gesunden Probanden blieben die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen vor und nach Medikamentenzusatz stets unterhalb der Nachweisgrenze. Bei den Patienten mit schwerer Sepsis wurden im Mittel erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen gemessen, allerdings mit z.T. erheblichen interindividuellen und im Erkrankungsverlauf intraindividuellen Schwankungen. Die höchsten Zytokinkonzentrationen wurden mit 22 bzw. 27 pg/ml in der Propofolgruppe an den Tagen 3 und 4 gemessen. An Tag 8 wiederum hatten sich die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in der Propofolgruppe mit 7 pg/ml deutlich erholt. In der Midazolamgruppe dagegen kann über den gesamten Beobachtungszeitraum kein Trend ausgemacht werden. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen oder im zeitlichen Verlauf in den jeweiligen Gruppen wurden nicht festgestellt. Im Vergleich zum Midazolam-Vollblut der gesunden Probanden ergaben sich signifikant erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in der Midazolamgruppe an den Tagen 2 und 8 (Tabelle 4.13).

**Tabelle 4.13: Spontane TNF- $\alpha$ -Konzentrationen bei den gesunden Probanden sowie bei Patienten mit schwerer Sepsis**

TNF- $\alpha$		Midazolam (in pg/ml)	Propofol (in pg/ml)	P
Probanden:	Kontrolle	$\leq 3,0$		
	Med. Effekt	$\leq 3,0$	$\leq 3,0$	n.s.
Sepsis Pat.:	Tag 1	13,1 $\pm$ 3,7	14,7 $\pm$ 4,5	n.s.
	Tag 2	18,1 $\pm$ 4,6 $\delta$	10,1 $\pm$ 3,8	<b>0,038</b> / n.s.
	Tag 3	13,4 $\pm$ 3,8	21,8 $\pm$ 15,6	n.s.
	Tag 4	14,1 $\pm$ 5,1	27,1 $\pm$ 17,7	n.s.
	Tag 8	18,1 $\pm$ 4,3 $\delta$	6,7 $\pm$ 2,2	<b>0,025</b> / n.s.

Alle Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM

n.s. = nicht signifikant

$\delta$  = **p<0,05** Sepsispatienten vs. Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe

#### 4.7.2 spontane IL-10-Antwort

Vergleichbar mit der spontanen TNF- $\alpha$ -Antwort waren die spontanen IL-10-Konzentrationen der gesunden Probanden unterhalb der Nachweisgrenze. Bei den Patienten mit schwerer Sepsis wurden wie bei der spontanen TNF- $\alpha$ -Antwort erhöhte Zytokinkonzentrationen

gemessen. Auch hier zeigten sich erhebliche interindividuelle und im Erkrankungsverlauf intraindividuelle Schwankungen, welche sogar z.T. noch ausgeprägter waren als bei der spontanen TNF- $\alpha$ -Antwort (Tag 1 und 3 in der Midazolamgruppe, sowie Tag 2 in der Propofolgruppe). Während in der Midazolamgruppe die Zytokinkonzentrationen über den gesamten Untersuchungszeitraum auf einem relativ hohen Niveau verblieben, zeigte sich in der Propofolgruppe eine rasche Abnahme der IL-10-Konzentrationen von 29 pg/ml auf 11 pg/ml bereits an Tag 3. Dieses Level blieb über den weiteren Untersuchungszeitraum konstant. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen oder im Zeitverlauf in den jeweiligen Gruppen wurden wiederum nicht festgestellt. Im Vergleich zum Propofol-Vollblut der gesunden Probanden ergaben sich signifikant erhöhte IL-10-Konzentrationen in der Propofolgruppe an Tag 3 (Tabelle 4.14).

**Tabelle 4.14: Spontane IL-10-Konzentrationen bei den gesunden Probanden sowie bei den Patienten mit schwerer Sepsis**

IL-10		Midazolam (in pg/ml)	Propofol (in pg/ml)	p
Probanden:	Kontrolle	$\leq 3,0$		
	Med. Effekt	$\leq 3,0$	$\leq 3,0$	n.s.
Sepsis Pat.:	Tag 1	159,3 $\pm$ 138,2	28,8 $\pm$ 8,9	n.s.
	Tag 2	17,4 $\pm$ 5,4	74,5 $\pm$ 63,7	n.s.
	Tag 3	59,2 $\pm$ 33,9	10,8 $\pm$ 2,1 $\delta$	n.s. / <b>0,017</b>
	Tag 4	15,5 $\pm$ 5,4	12,8 $\pm$ 4,8	n.s.
	Tag 8	18,5 $\pm$ 6,9	10,3 $\pm$ 3,5	n.s.

Alle Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM

n.s. = nicht signifikant

$\delta$  = **p<0,05** Sepsispatienten vs. Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe

#### 4.7.3 spontane IL-6-Antwort

Bei der Untersuchung der spontanen IL-6-Antwort wurden im Kontroll-Vollblut der gesunden Probanden Werte um 15 pg/ml gemessen. Nach Zugabe der Medikamente nahmen die Zytokinkonzentrationen in beiden Gruppen geringfügig ab. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich dabei weder im Vergleich mit dem Kontroll-Vollblut, noch im Vergleich zwischen Midazolam- und Propofol-Vollblut (Tabelle 4.15, Abbildung 4.8).

**Tabelle 4.15: Spontane mittlere IL-6-Konzentrationen bei den gesunden Probanden sowie bei den Patienten mit schwerer Sepsis**

IL-6		Midazolam (in pg/ml)	Propofol (in pg/ml)	p
Probanden:	Kontrolle	14,7 ± 1,9		
	Med. Effekt	12,2 ± 2,3	12,8 ± 3,4	n.s.
Sepsis Pat.:	Tag 1	151,3 ± 33,8 $\bar{\delta}$	273,8 ± 59,0 $\bar{\delta}$	<b>0,01 / 0,007</b>
	Tag 2	140,8 ± 48,7	310,4 ± 81,9 $\bar{\delta}$	n.s. / <b>0,02</b>
	Tag 3	118,7 ± 34,4 $\bar{\delta}$	365,5 ± 113,3 $\bar{\delta}$ *	<b>0,047 / 0,04; 0,004</b>
	Tag 4	72,7 ± 23,3	227,6 ± 103,7	n.s.
	Tag 8	53,8 ± 11,5 $\bar{\delta}$	75,4 ± 22,8 $\bar{\delta}$	<b>0,02 / 0,046</b>

Alle Angaben als Mittelwerte ± SEM

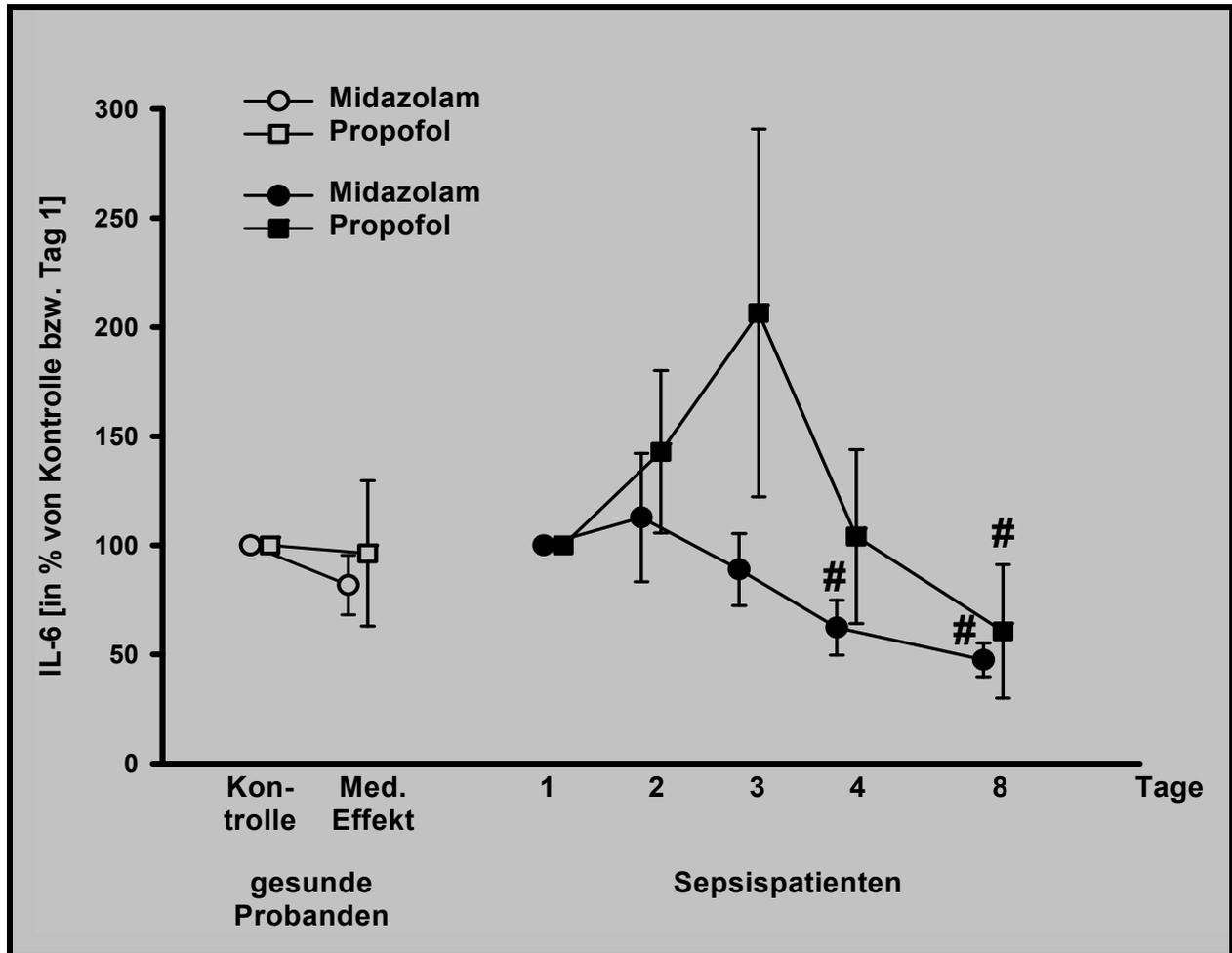
n.s. = nicht signifikant

$\bar{\delta}$  = **p<0,05** Sepsispatienten vs. Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe

\* = **p<0,05** Propofol vs. Midazolam

Die Patienten mit schwerer Sepsis wiesen eine deutlich erhöhte IL-6-Antwort auf. Gegenüber dem Vollblut der gesunden Probanden ergaben sich signifikant erhöhte Zytokinkonzentrationen an den Tagen 1, 3 und 8 für beide Gruppen, sowie an Tag 2 für die Propofolgruppe (Tabelle 4.15). Während in der Midazolamgruppe die IL-6-Konzentrationen kontinuierlich abnahmen, war in der Propofolgruppe zunächst ein weiterer Anstieg der Zytokinantwort mit einem Maximum an Tag 3 zu verzeichnen. In der Darstellung der Absolutwerte ergab sich für diesen Tag ein signifikanter Unterschied zwischen den Medikamentengruppen (Tabelle 4.15). Im weiteren Untersuchungsverlauf konnte dann auch in der Propofolgruppe eine Erholung der IL-6-Konzentrationen beobachtet werden. In der Darstellung der Absolutwerte in % von Tag 1 zeigte sich ein signifikanter Rückgang der erhöhten IL-6-Konzentrationen gegenüber den Ausgangswerten in beiden Gruppen an Tag 8, sowie in der Midazolamgruppe zusätzlich an Tag 4 (Abbildung 4.8).

Abb. 4.8: Verlauf der spontanen mittleren IL-6-Konzentrationen innerhalb der ersten 8 Tage nach Studieneinschluss, dargestellt sind die Absolutwerte in Prozent von Tag 1



Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM

# =  $p < 0,05$  Sepsispatienten vs. Tag 1

#### 4.8 Zytokinantwort nach *ex vivo*-Stimulation mit LPS bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis sowie nach *ex vivo*-Stimulation mit SAC-I bei Patienten mit schwerer Sepsis

Hauptziel des vorliegenden Untersuchungsabschnitts war zum einen, die LPS-stimulierte Zytokinantwort bei Patienten mit schwerer Sepsis mit der gesunder Probanden zu vergleichen. Zum Anderen sollte der Einfluss der Anästhetika Midazolam und Propofol auf die stimulierte Zytokinantwort untersucht werden. Untersucht wurden dabei das Zytokin TNF- $\alpha$  als Vertreter der proinflammatorischen Komponente sowie das Zytokin IL-10 als Vertreter

der antiinflammatorischen Komponente der systemischen Immunantwort. Nachfolgend werden die Ergebnisse zur TNF- $\alpha$ - und IL-10-Freisetzung nach *ex vivo*-Stimulation mit gramnegativem LPS sowie nach *ex vivo*-Stimulation mit grampositivem SAC-I dargestellt.

#### 4.8.1 TNF- $\alpha$ -Antwort nach Stimulation mit LPS

Bei den gesunden Probanden wurden im Kontroll-Vollblut nach LPS-Stimulation mittlere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen um 4000 pg/ml gemessen. Nach Zugabe von Midazolam konnte eine schwache, nicht signifikante Suppression der TNF- $\alpha$ -Antwort beobachtet werden. Dem gegenüber konnte im Propofol-Vollblut eine signifikante Zunahme der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen verzeichnet werden. Auch zeigte sich ein signifikanter Unterschied zum Midazolam-Vollblut. Im Vergleich zu den gesunden Probanden wiesen die Patienten mit schwerer Sepsis eine starke und im Erkrankungsverlauf lang anhaltende Suppression der LPS-stimulierten TNF- $\alpha$ -Antwort auf. Dabei waren die Werte über den gesamten Erkrankungsverlauf signifikant supprimiert (Tabelle 4.16).

**Tabelle 4.16: TNF- $\alpha$ -Konzentrationen nach *ex vivo*-Stimulation mit LPS bei den Probanden sowie bei Patienten mit schwerer Sepsis**

TNF- $\alpha$		Midazolam (in pg/ml)	Propofol (in pg/ml)	p
Probanden:	Kontrolle	3973,3 $\pm$ 463,9		
	Med. Effekt	3385,2 $\pm$ 767,1	5436,2 $\pm$ 349,6 # *	n.s. / 0,030; 0,035
Sepsis Pat.:	Tag 1	879,7 $\pm$ 160,4 $\delta$	356,1 $\pm$ 124,7 $\delta$	<0,001 / <0,001
	Tag 2	769,2 $\pm$ 199,4 $\delta$	351,8 $\pm$ 108,9 $\delta$	<0,001 / <0,001
	Tag 3	865,3 $\pm$ 277,4 $\delta$	285,7 $\pm$ 78,2 $\delta$	0,002 / <0,001
	Tag 4	901,0 $\pm$ 206 $\delta$	681,6 $\pm$ 249,8 $\delta$	0,001 / <0,001
	Tag 8	1390,1 $\pm$ 330,6 $\delta$	1426,6 $\pm$ 342,7 $\delta$ #	0,012 / <0,001

Alle Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM

n.s. = nicht signifikant

# = **p<0,05** Sepsispatienten vs. Tag 1 bzw. Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe vs. Probanden-Vollblut ohne Medikamente (Kontrolle)

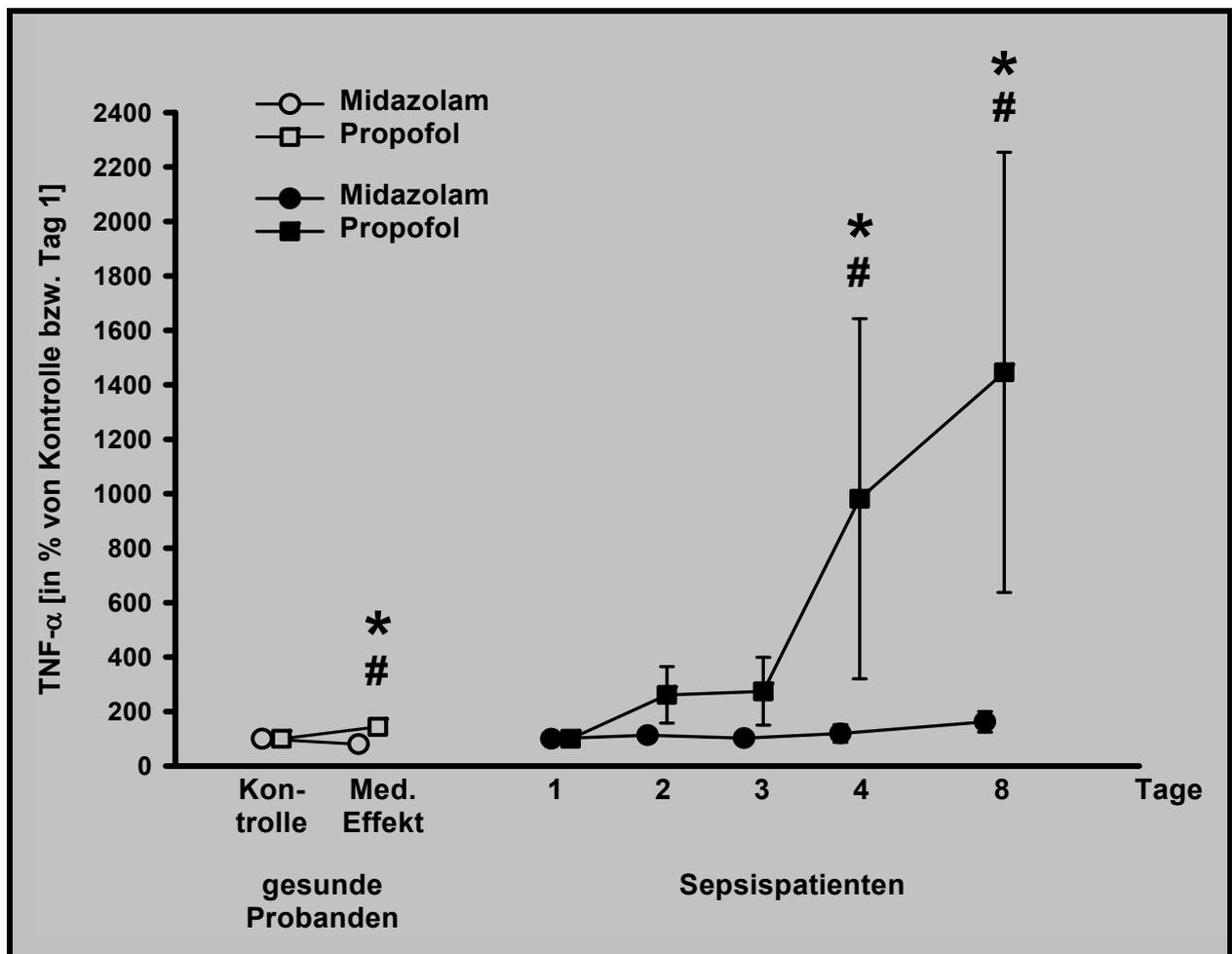
$\delta$  = **p<0,05** Sepsispatienten vs. Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe

\* = **p<0,05** Propofol vs. Midazolam

Wie im Vollblut der gesunden Probanden konnte auch bei Patienten mit schwerer Sepsis in der Propofolgruppe ein Anstieg der Zytokinkonzentrationen beobachtet werden. Während die

TNF- $\alpha$ -Antwort der Patienten in der Midazolamgruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum weiterhin supprimiert blieb, konnte bei den Patienten in der Propofolgruppe eine signifikante Erholung der stimulierbaren Zytokinantwort beobachtet werden. Auch im direkten Vergleich der Midazolam- mit der Propofolgruppe ergab sich ein signifikanter Unterschied (Abbildung 4.9).

Abb. 4.9: Verlauf der LPS-stimulierten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen innerhalb der ersten 8 Tage nach Studieneinschluss; dargestellt sind die Absolutwerte in Prozent von Tag 1



Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM

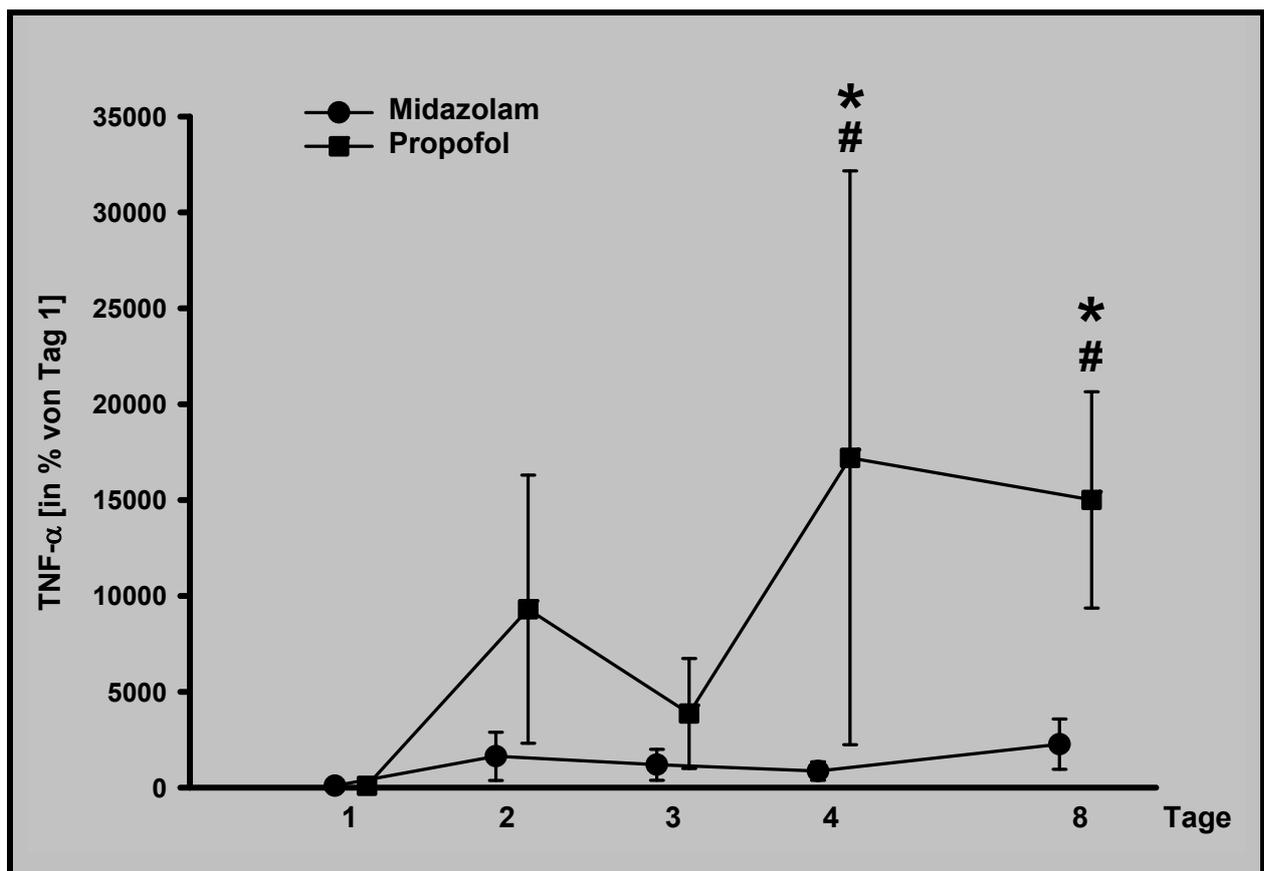
# =  $p < 0,05$  Sepsispatienten vs. Tag 1 Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe vs. Probanden-Vollblut ohne Medikamente (Kontrolle)

\* =  $p < 0,05$  Propofol vs. Midazolam

#### 4.8.2 TNF- $\alpha$ -Antwort nach Stimulation mit SAC-I

Die Ergebnisse zur Freisetzung von TNF- $\alpha$  nach SAC-I-Stimulation sind denen nach LPS-Stimulation sehr ähnlich: Auch hier zeigte sich bei allen Patienten mit schwerer Sepsis eine starke und anhaltende Suppression der SAC-I-stimulierten TNF- $\alpha$ -Antwort. Die Zytokinkonzentrationen blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum in der Midazolamgruppe annähernd unverändert supprimiert. Dagegen konnte in der Propofolgruppe ab Tag 4 eine signifikante Erholung der stimulierbaren TNF- $\alpha$ -Antwort beobachtet werden. Auch der direkte Vergleich mit der Midazolamgruppe ergab hier einen signifikanten Unterschied (Abbildung 4.10).

**Abb. 4.10:** Verlauf der SAC-I-stimulierten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen innerhalb der ersten 8 Tage nach Studieneinschluss; dargestellt sind die Absolutwerte in Prozent von Tag 1



Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM

# =  $p < 0,05$  vs. Tag 1

\* =  $p < 0,05$  Propofol vs. Midazolam

### 4.8.3 IL-10-Antwort nach Stimulation mit LPS

Im Kontroll-Vollblut der gesunden Probanden wurden mit IL-10-Konzentrationen um 50 pg/ml nach LPS-Stimulation deutlich niedrigere Konzentrationen gemessen als für TNF- $\alpha$ . Wie bei der TNF- $\alpha$ -Antwort konnte auch nach Midazolamzugabe eine schwache, nicht signifikante Suppression der IL-10-Konzentrationen beobachtet werden. Propofol wiederum führte zu einer Zunahme der IL-10-Antwort. Es konnte ein signifikanter Unterschied zum Midazolam-Vollblut verzeichnet werden (Tabelle 4.17).

**Tabelle 4.17: IL-10-Konzentrationen nach ex vivo-Stimulation mit LPS bei gesunden Probanden sowie bei Patienten mit schwerer Sepsis**

IL-10		Midazolam (in pg/ml)	Propofol (in pg/ml)	p
Probanden:	Kontrolle	47,8 $\pm$ 19,4		
	Med. Effekt	19,0 $\pm$ 6,2	104,2 $\pm$ 36,8 *	<b>0,046</b>
Sepsis Pat.:	Tag 1	106,2 $\pm$ 43,2	106,4 $\pm$ 59,3 [52 $\pm$ 26]	n.s.
	Tag 2	72,6 $\pm$ 15,2 $\bar{\delta}$	67,6 $\pm$ 31,5 [38 $\pm$ 14]	<b>0,028</b> / n.s.
	Tag 3	72,9 $\pm$ 16,8 $\bar{\delta}$	35,5 $\pm$ 15,0	<b>0,043</b> / n.s. (0,058)
	Tag 4	72,5 $\pm$ 16,8 $\bar{\delta}$	35,5 $\pm$ 8,5 $\bar{\delta}$	<b>0,043</b> / <b>0,031</b>
	Tag 8	83,5 $\pm$ 28,3	84,2 $\pm$ 22,7	n.s.

Alle Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM. In Klammern: Werte ohne Sepsispatient Nr.17

n.s. = nicht signifikant

$\bar{\delta}$  = **p<0,05** Sepsispatienten vs. Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe

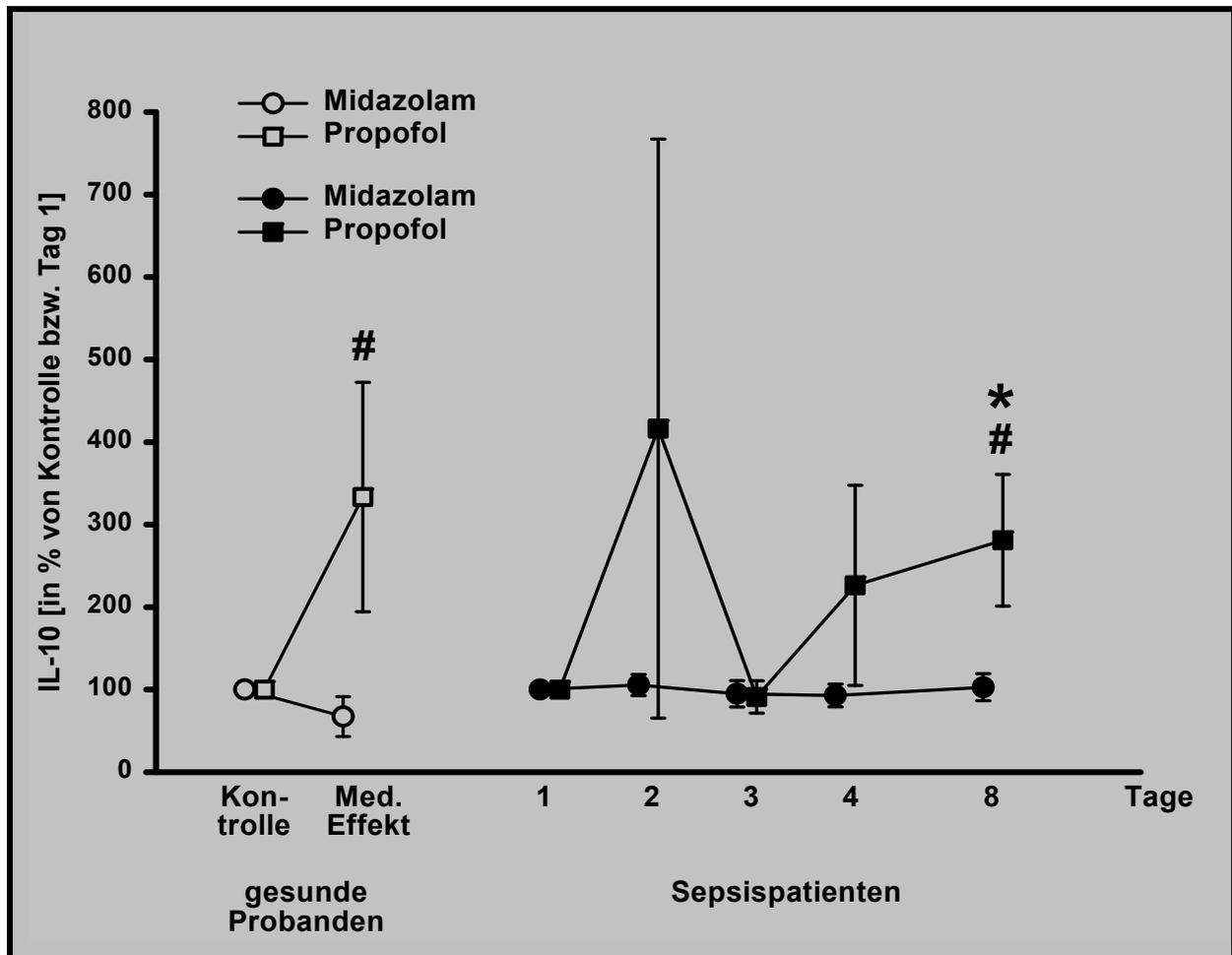
\* = **p<0,05** Propofol vs. Midazolam

Im Gegensatz zur TNF- $\alpha$  Antwort waren die gemessenen IL-10-Konzentrationen der Patienten mit schwerer Sepsis gegenüber dem Kontroll-Vollblut der gesunden Probanden nicht weiter supprimiert. Es zeigten sich an den Tagen 2-4 signifikant höhere Werte bei den Sepsispatienten mit Midazolamsedierung gegenüber dem Midazolam-Vollblut der gesunden Probanden. An Tag 4 wiederum waren die IL-10-Konzentrationen bei den Sepsispatienten mit Propofolsedierung signifikant niedriger gegenüber dem Midazolam-Vollblut der gesunden Probanden. Betrachtet man jedoch die Zytokinkonzentrationen der Sepsispatienten über den Krankheitsverlauf so konnte man in der Midazolamgruppe, entsprechend den Ergebnissen der gesunden Probanden, tendenziell eine verstärkte Suppression der IL-10-Antwort verzeichnen. In der Propofolgruppe führten die deutlich über dem Durchschnitt liegenden

Messwerte einer Patientin mit grampositiver Pneumonie (ID 17), die nach dem zweiten Untersuchungszeitpunkt verstarb, zu einer starken Verzerrung der Mittelwerte an den Tagen 1 und 2. Klammert man die Werte dieser Patientin aus, so ergibt sich für die Propofolgruppe der Sepsispatienten in Übereinstimmung mit der Beobachtung im Vollblut der gesunden Probanden ein Anstieg der supprimierten LPS-stimulierten IL-10-Antwort über den Untersuchungszeitraum. Diese Veränderungen über den Krankheitsverlauf waren jedoch weder in der Midazolam- noch in der Propofolgruppe signifikant (Tabelle 4.17).

In der Prozentdarstellung zeigt sich das bekannte Bild aus der Analyse der LPS-stimulierten TNF- $\alpha$ -Antwort: Wie im Propofol-Vollblut der gesunden Probanden konnte auch in der Propofolgruppe der Sepsispatienten ein Anstieg der Zytokinkonzentrationen beobachtet werden. Während die IL-10-Antwort der Patienten in der Midazolamgruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum weiter supprimiert blieb, konnte bei den Patienten in der Propofolgruppe eine signifikante Erholung der stimulierbaren Zytokinantwort beobachtet werden. Auch im direkten Vergleich der Midazolam- mit der Propofolgruppe ergab sich ein signifikanter Unterschied (Abbildung 4.11).

Abb. 4.11: Verlauf der LPS-stimulierten IL-10-Konzentrationen innerhalb der ersten 8 Tage nach Studieneinschluss; dargestellt sind die Absolutwerte in Prozent von Tag 1



Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM

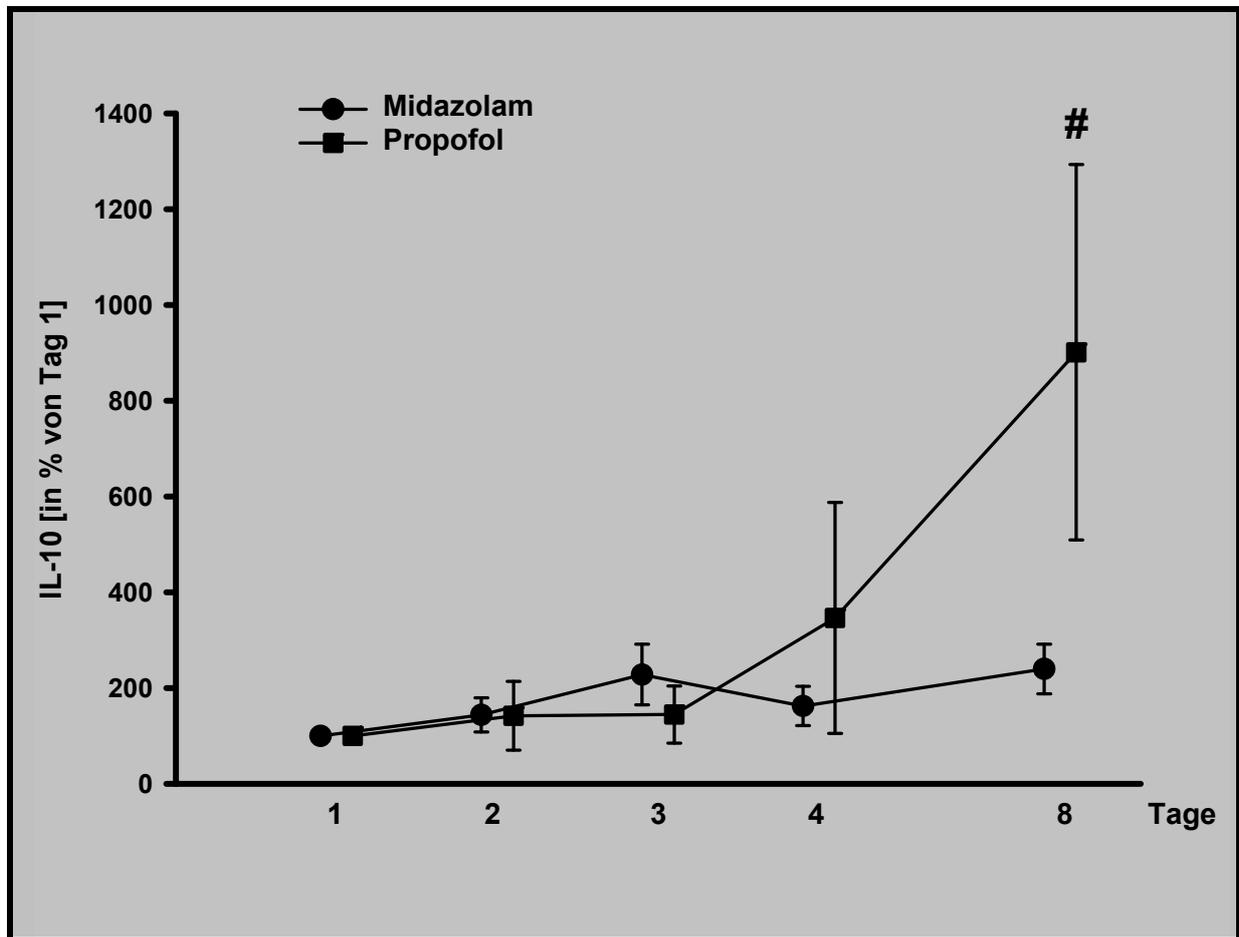
# =  $p < 0,05$  Sepsispatienten vs. Tag 1 bzw. Probanden-Vollblut nach Medikamentenzugabe vs. Probanden-Vollblut ohne Medikamente (Kontrolle)

\* =  $p < 0,05$  Propofol vs. Midazolam

#### 4.8.4 IL-10-Antwort nach Stimulation mit SAC-I

Wie bei der Stimulation mit LPS verblieb die IL-10-Antwort der Patienten mit Midazolamsedierung nach Stimulation mit SAC-I ebenfalls auf einem anhaltend niedrigen Niveau. Dagegen war in der Propofolgruppe ab Tag 4 eine deutliche Zunahme der IL-10-Konzentrationen zu beobachten mit Signifikanz an Tag 8 (Abbildung 4.12).

Abb. 4.12: Verlauf der SAC-I-stimulierten IL-10-Konzentrationen innerhalb der ersten 8 Tage nach Studieneinschluss; dargestellt sind die Absolutwerte in Prozent von Tag 1



Angegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM

# =  $p < 0,05$  Sepsispatienten vs. Tag 1

## 5 DISKUSSION

Die vorliegenden Untersuchungen wurden prospektiv bei insgesamt zwei Gruppen von Patienten bzw. Personen durchgeführt: bei Patienten, die mit der Diagnose schwere Sepsis auf einer vornehmlich operativ ausgerichteten Intensivstation einer Universitätsklinik behandelt wurden, sowie bei gesunden Probanden. Hierbei wurden ausschließlich erwachsene Personen untersucht; die Rekrutierung erfolgte prospektiv gemäß den genannten Ein- und Ausschlusskriterien.

### 5.1 Kritische Wertung der Methodik

#### 5.1.1 Patienten mit schwerer Sepsis

##### Ein- und Ausschlusskriterien

Die Aufnahmekriterien der vorliegenden Studie orientierten sich an der von der Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine publizierten Definition der Diagnose „schwere Sepsis“ [ACCP/SCCM Consensus Conference, 1992]. Grundlage dieser Definition sind vier einfach zu erhebende klinische bzw. laborchemische Parameter einer systemischen Entzündungsreaktion: Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz und Leukozytenzahl. Außerdem muss eine Organdysfunktion, Hypotension oder Hypoperfusion vorliegen. Die infektiöse Ursache der Entzündungsantwort muss klinisch oder mikrobiologisch gesichert sein. Entgegen anfänglich geäußelter Kritik aufgrund der Simplizität der Kriterien der Konsensuskonferenz [GRAMM, 1995; VINCENT, 1992], ist diese Definition des Begriffs „schwere Sepsis“ unterdessen international akzeptiert und hat sich in vielen Studien als Grundlage der Einschlusskriterien bewährt [KREYMANN, 1996; REINHART, 1996; RODRIGUEZ-GASPAR, 2001; TERBORG, 2001; VENT, 2000; ZWEIGNER, 2001].

Kriterien für einen Ausschluss aus der Studie waren Erkrankungen oder Begleitumstände, die einen nachweislichen Einfluss auf die systemische Entzündungsantwort haben. Hierunter fielen z.B. eine medikamentös induzierte Immunsuppression durch Vorbehandlung mit Kortikosteroiden, Zytostatika oder Immunsuppressiva, sowie hämatologische Systemerkrankungen. In vergleichbaren Studien wurden ähnliche Ausschlusskriterien genannt [BÖLKE, 2001; MULLER-KOBOLD, 2000; PASCUAL, 1997; VENET, 2000].

### **Infektionsnachweis**

Entsprechend den Kriterien der Konsensuskonferenz ist die infektiöse Ätiologie der Entzündungsantwort Voraussetzung für die Diagnose „schwere Sepsis“. Die Infektion muss dabei entweder mikrobiologisch gesichert sein oder es muss zumindest der dringende klinische Verdacht auf eine infektiöse Genese bestehen [ACCP/SCCM Consensus Conference, 1992].

Bei allen Patienten der vorliegenden Studie wurde mikrobiologisches Untersuchungsmaterial entweder intraoperativ oder direkt nach Aufnahme auf die Intensivstation entnommen. Sämtliche Befunde wurden in Zusammenarbeit mit dem zuständigen Mikrobiologen auf ihre Plausibilität überprüft. Mit diesen Maßnahmen war ein Erregernachweis bei 21 der 24 Patienten möglich. Lediglich bei 3 Patienten (13%) misslang der mikrobiologische Nachweis. In einer Studie zur Inzidenz von SIRS und Sepsis hatten Pittet und Mitarbeiter das Kriterium „empirische Antibiotikatherapie über 72h“ als Parameter einer infektiösen Ursache herangezogen, wenn kein direkter Erregernachweis möglich war [PITTET, 1995]. Dieses Kriterium wurde in der vorliegenden Untersuchung von allen untersuchten Patienten erfüllt.

### **Demographische Daten und Scores**

Die Patienten mit schwerer Sepsis waren im Mittel rund 60 Jahre alt. Bei Studieneinschluss betragen die Werte für den APACHE II-Score im Mittel 24 Punkte bei den Patienten in der Midazolamgruppe bzw. 27 Punkte bei den Patienten in der Propofolgruppe, für den MOF-Score jeweils knapp 10 Punkte und für den SOFA-Score 11 bzw. 12 Punkte. Die demographischen Daten sowie die erhobenen intensivmedizinischen Scorewerte stimmen dabei mit ähnlichen intensivmedizinischen Patientenkollektiven anderer Studien überein. So berichten etwa Terborg und Mitarbeiter in einer Untersuchung bei Patienten mit schwerer Sepsis über ein mittleres Alter von 60,5 Jahren, der APACHE II-Score lag zwischen 25 und 44 Punkten und der MOF-Score zwischen 7 und 15 Punkten [TERBORG, 2001]. In einer anderen Studie betrug das mittlere Patientenalter 58,4 Jahre, der mittlere SOFA-Scorewert lag bei 12 Punkten [ZWEIGNER, 2001].

Dabei ergibt sich bei allen drei o.g. Scores das Problem der Punktwertvergabe anhand der Glasgow-Koma-Skala bei analgosedierten Patienten [UNERTL, 1997]. Bei der Erarbeitung des SOFA-Scores wurde dieses Problem nachdrücklich erwähnt. Nach belieben des Anwenders ist es nämlich möglich, entweder den aktuellen Zustand des analgosedierten Patienten zu bewerten, was eine direkte Beeinflussung der Scoreberechnung durch Analgetika und Sedativa zur Folge hat, oder aber den vermuteten Bewusstseinszustand ohne Analgosedierung abzuschätzen [VINCENT, 1996]. Für den APACHE II-Score wurde diskutiert, bei sedierten Patienten immer einen Glasgow-Koma-Index von 15 oder alternativ

den Wert vor Beginn der Sedierung zu verwenden [LIVINGSTON, 2000]. Unter Inkaufnahme einer Scorewertsteigerung wurde in der vorliegenden Studie bei allen Score-Berechnungen ausnahmslos der aktuelle Zustand der Patienten beurteilt, unabhängig von einer möglichen Analgosedierung. Dieses Vorgehen ermöglichte innerhalb der Untersuchung einen exakten Vergleich der beiden Patientengruppen; ein Vergleich mit Scorewerten anderer, fremder Untersuchungen war nicht das Hauptziel der vorliegenden Studie. Über eine ähnliche Herangehensweise wurde auch von anderen Autoren berichtet [PASCUAL, 1997].

### **Letalität**

Insgesamt verstarben in der vorliegenden Untersuchung 9 von 24 Patienten ausgehend von einem Beobachtungszeitraum von 28 Tagen. Dies entspricht einer Letalitätsrate von 37,5%. Diese Daten entsprechen den Ergebnissen aus anderen Untersuchungen: Bei chirurgischen Intensivpatienten mit schwerer Sepsis berichteten Pittet und Mitarbeiter über eine 28-Tage-Letalität von 35% [PITTET, 1995]. Aus der gleichen Arbeitsgruppe ergab sich in einer größeren Untersuchung mit gemischtem Patientengut eine Letalitätsrate von 20% bei schwerer Sepsis [RANGEL-FRAUSTO, 1995]. Andere Autoren beschrieben bei schwerer Sepsis auch höhere Letalitätsraten: So wurde beispielsweise in einer Arbeit aus Italien über eine Letalität von 52% und aus Mexiko von 45,7% berichtet [PONCE DE LEON-ROSALES, 2000; SALVO, 1995].

### **Intensivtherapie**

Aus verschiedenen Untersuchungen geht hervor, dass diverse in der Intensivtherapie zur Anwendung kommende Medikamente die Immunantwort beeinflussen können. Beispielsweise wurde für Dopamin nachgewiesen, dass es die Ausschüttung verschiedener Hypophysenhormone beeinträchtigen und durch eine Hypoprolaktinämie die Lymphozyten- und Makrophagenaktivität vermindern kann [MEIER-HELLMANN, 2000; VAN DEN BERGHE, 1996]. Metoclopramid, ein zentraler Dopaminantagonist, kann dagegen eine Erholung der nach Blutungsschock supprimierten Makrophagenfunktion induzieren [ZELLWEGGER, 1998]. Auch für verschiedene andere Substanzen wie Noradrenalin und Adrenalin sowie für bestimmte Zusatzstoffe zur enteralen und parenteralen Ernährung werden immunmodulatorische Wirkungen beschrieben [FAIST, 1991; GALLEY, 2000; GRUNDMANN, 2000; HACKL, 1998; JOLLIET, 1998; VAN DER POLL, 1994 und 1996].

Damit in der vorliegenden Arbeit die zu untersuchenden immunmodulatorischen Effekte der Sedativa Midazolam und Propofol möglichst nicht durch die immunmodulatorischen Eigenschaften der Zusatzmedikation verfälscht werden, wurde, sofern dies therapeutisch vertretbar erschien, auf Medikamente wie Dopamin und Metoclopramid gänzlich verzichtet.

Nicht möglich war der Verzicht auf Noradrenalin [MARTIN, 2000]. Wie unter 4.3 dargelegt kam es jedoch im Vergleich der Midazolam- mit der Propofolgruppe seitens der Noradrenalintherapie zu keinem Zeitpunkt zu einem signifikanten Unterschied. Im Übrigen erfolgte die Intensivtherapie der Patienten nach den für unsere Intensivstation üblichen Behandlungsstandards und Therapieprotokollen [WILHELM, 1999].

### 5.1.2 Analgosedierung

Um auch im Hinblick auf die Anwendung von Analgetika und Sedativa eine möglichst homogene Ausgangssituation innerhalb der Patientenpopulation zu gewährleisten, wurde in der vorliegenden Untersuchung die Analgosedierung bei allen Patienten an Tag 1 ausschließlich mit Fentanyl und Midazolam durchgeführt. Ab Tag 2 wurde dann wie unter 3.1.2 beschrieben das Patientenkollektiv in die Analgosedierungsregime Midazolam/Fentanyl bzw. Propofol/Fentanyl randomisiert. Schließlich wurden lediglich Patienten in die Untersuchung aufgenommen, die bei Diagnosestellung „schwere Sepsis“ maschinell beatmet wurden und bei denen die Beatmungstherapie aufgrund der klinischen Gesamteinschätzung für voraussichtlich mindestens 3 weitere Tage erforderlich war.

Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe hatten zeigen können, dass das in der vorliegenden Studie als Hintergrundanalgetikum eingesetzte Fentanyl keinen Einfluss auf die im Vollblutansatz stimulierbare Zytokinantwort aufweist, weder in klinischer noch in supraklinischer Dosierung [LARSEN, 1998]. Andere Arbeitsgruppen hatten *in vitro* die Funktion neutrophiler Granulozyten untersucht mit dem Ergebnis, dass auch hier Fentanyl keinen Einfluss auf den „respiratory burst“, die Freisetzung von Superoxidanionen oder die Phagozytosefähigkeit dieser Zelllinie zeigte [JAEGER, 1998; KRUMHOLZ, 1993 und 1995]. Auch blieb die IL-6-Antwort bei Patienten, die sich einer Hüftoperation unterzogen, unter dem Einfluss von Fentanyl unbeeinflusst [TAYLOR, 1997]. Somit war nicht mit einer wesentlichen Beeinträchtigung der Immunantwort durch das Hintergrundanalgetikum Fentanyl zu rechnen.

Ein Problem beim Vergleich unterschiedlicher Modelle (*in vitro* vs. *in vivo* Studien bzw. Intensivpatienten mit schwerer Sepsis vs. gesunde Probanden) ist die Höhe der Dosierung der einzelnen Anästhetika. So ist beim Intensivpatienten die benötigte Dosierung der Substanzen und insbesondere deren Wirkdauer individuell oft sehr verschieden und schwer abzuschätzen. Dies wird u.a. dadurch bedingt, dass die üblicherweise zur Abschätzung von Wirkdauer und -effekt herangezogenen Pharmakokinetik- und Pharmakodynamikdaten der verschiedenen Medikamente in der Regel bei gesunden Freiwilligen bzw. ansonsten gesunden Patienten ermittelt wurden und auf die Verhältnisse beim Intensivpatienten nur

sehr eingeschränkt anwendbar sind. Anders als im *in vitro* Versuch, wo die Konzentrationen annähernd konstant bleiben, unterliegen die Substanzen *in vivo* einer ständigen Metabolisierung und Umverteilung. Im Gegensatz zum „Normalpatienten“, oder gar zum gesunden Probanden im *in vitro* Versuch, muss beim Intensivpatienten mit rasch wechselnden Organinsuffizienzen gerechnet werden. Verteilungsräume können sich z.B. durch Kapillarleck oder Kreislaufinsuffizienz rasch ändern, Proteine fehlen für die Plasmaeiweißbindung, Fieber oder Hypothermie beeinflussen die temperaturabhängige Regulation von Enzymsystemen [MURDOCH, 2000; REINHART, 2001]. So benötigen Intensivpatienten für eine effektive Sedierung häufig erheblich höhere Dosen als Patienten die Sedativa wie etwa Midazolam im Rahmen diagnostischer und therapeutischer Eingriffe erhalten [DIRKSEN, 1987; DRIESSEN, 1991; OLDENHOF, 1988; SHAFER, 1990]. In Anbetracht dessen wurde in der vorliegenden Arbeit bei gesunden Probanden die *in vitro* Stimulation mit Midazolam und Propofol mit Konzentrationen durchgeführt, die um eine Zehnerpotenz höher lagen als die errechneten klinischen Konzentrationen.

### **5.1.3 Gesunde Probanden**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zum einen, den Einfluss der Sedativa Midazolam und Propofol auf die Monozyten/Makrophagenfunktion bzw. die Zytokinproduktion bei Patienten mit schwerer Sepsis zu untersuchen. Zum Vergleich sollte darüber hinaus der Einfluss von Midazolam und Propofol auf die Immunantwort bei gesunden Probanden analysiert werden. Hierfür wurde Vollblut bei 6 freiwilligen Probanden entnommen (jeweils 3 Frauen und 3 Männer). Das mittlere Alter der gesunden Probanden lag bei 49 Jahren.

### **5.1.4 Messzeitpunkte**

In der vorliegenden Studie sollte ein vergleichsweise großes Kollektiv an Patienten mit schwerer Sepsis untersucht werden. Der Auswahl der Messzeitpunkte kam erhebliche Bedeutung zu, da die immunologischen Analysen wegen des methodischen und insbesondere finanziellen Aufwands nur in begrenzter Anzahl möglich waren.

### **Patienten mit schwerer Sepsis**

Die Probenentnahme erfolgte jeweils morgens um 8:00 Uhr an Tag 1 nach Diagnosestellung sowie im Verlauf an Tag 2, 3, 4 und 8. Mit dem Messzeitpunkt an Tag 1 konnten die initialen Veränderungen der spontanen sowie der stimulierbaren Zytokinantwort bei schwerer Sepsis erfasst und mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen verglichen werden. Die weiteren Messzeitpunkte erlaubten eine Verlaufsbeobachtung der individuellen Zytokinantwort bzw.

der Monozytenfunktion. Ein erneuter Messzeitpunkt an Tag 8 wurde gewählt, um auch späte Veränderungen nach einer Woche beschreiben zu können. Dieser im Vergleich zu anderen Studien relativ lange Beobachtungszeitraum wurde gewählt, um neben der frühen proinflammatorisch ausgerichteten Entzündungsantwort (im Sinne von SIRS) auch mögliche Effekte einer überschießenden antiinflammatorischen Zytokinantwort (im Sinne von Immunparalyse/CARS) erfassen zu können [HEAGY, 2000; MULLER-KOBOLD, 2000; PINSKY, 1993].

### **Gesunde Probanden**

Die Blutentnahme bei den gesunden Probanden war ebenfalls standardisiert und erfolgte morgens in der Zeit zwischen 7:30 und 10:00 Uhr, um mögliche Effekte der zirkadianen Rhythmik ausschließen zu können.

### **Limitationen**

Vor allem für das Patientenkollektiv muss einschränkend angemerkt werden, dass trotz der Auswahl mehrerer repräsentativer Messzeitpunkte Veränderungen der Zytokinantwort oder anderer Laborparameter zu anderen Zeitpunkten nicht ausgeschlossen werden können. Insbesondere gilt dies, aufgrund ihrer relativ kurzen biologischen Halbwertszeit, für die Konzentrationsmessung der spontan freigesetzten Zytokine.

## **5.1.5 Messmethodik**

### **Probenentnahme, -transport und -lagerung**

Das für die Untersuchungen erforderliche Vollblut wurde in pyrogenfreie Laborröhrchen abgenommen, in Eis gelagert und sofort ins Forschungslabor transportiert. Dort wurden die Proben sofort weiterverarbeitet, je nach Experiment bei 4°C zentrifugiert und nach Abschluss aller Laborexperimente bei -80 °C für maximal 3 Monate gelagert. Mögliche Beeinflussungen der Messergebnisse durch Lagerung oder Probengefäße können daher weitestgehend ausgeschlossen werden.

### **Gewinnung der PBMC-Fraktion**

Für die Experimente zur durchflusszytometrischen Analyse der Monozyten/Makrophagenfunktion wurden monozytäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) durch Dichtegradient-Sedimentation gewonnen. Entwickelt wurde dieses Verfahren bereits Ende der 60er Jahre von Böyum und Mitarbeitern und hat sich unter geringen Modifikationen zu einem Standardverfahren der PBMC Gewinnung etabliert [BÖYUM, 1968; DE WERRA, 2001; FRANKENBERGER, 1996; PASSLICK, 1989; ZIEGLER-HEITBROCK, 1988].

### **Antikörper**

Aktive Monozyten zeichnen sich im Rahmen des durchflusszytometrischen Sepsismonitorings als CD14-/HLA-DR-positive Zellen aus. Die Effizienz der Antigenpräsentation ist u.a. abhängig vom Anteil HLA-DR-positiver Monozyten und der Dichte von HLA-DR an der Zelloberfläche [LUN, 2002; SIEGERT, 2002]. Eine verminderte HLA-DR-Expression gilt als Marker für die Deaktivierung der Monozyten/Makrophagen und korreliert mit einem erhöhten Infektionsrisiko [AYALA, 1996; CHEADLE, 1993; VOLK, 1996]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fluoreszenz-Antikörper CD14-FITC und HLA-DR-PE sind in der durchflusszytometrischen Analyse allgemein etabliert [DE WERRA, 2001; DÖCKE, 1994; LARSEN, 1998].

### **Monozyten/Makrophagen**

Die PBMCs wurden mittels FACScan-Durchflusszytometer analysiert [DE WERRA, 2001; DINGERLE, 1993]. Dabei wurde die HLA-DR-Expression auf Monozyten, die als CD14 positive Zellen innerhalb des Monozytengates im Vorwärts- und Seitstreulicht definiert wurden, bestimmt [DÖCKE, 1994]. Zur Identifikation der Subtypen CD14+ bzw. CD14++ wurde nach eigenen Voruntersuchungen sowie in Anlehnung an Ziegler-Heitbrock die Grenze zwischen beiden Populationen bei einer mittleren Fluoreszenzintensität von  $468 \cdot 10^{-2}$  V angenommen [ZIEGLER-HEITBROCK, 1988].

### **Vollblutansatz**

Die Versuche zur stimulierbaren Zytokinantwort wurden in Vollblutkulturen durchgeführt; ein Verfahren, das erstmals von Wilson und Mitarbeitern beschrieben wurde [WILSON, 1991]. Die Entwicklung von Vollblutkulturen beruhte auf der Beobachtung, dass mononukleäre Zellen nach Verdünnung von Vollblut mit Zellkulturmedium über mindestens 72 h lebensfähig und funktionstüchtig bleiben. So betrug die mittels Trypanblau-Exklusion bestimmte Überlebensrate von mononukleären Zellen nach 24h über 95% und nach 72h noch über 82% der Zellen [DE GROOTE, 1992; ERTEL, 1995]. In einer Versuchsreihe über die Stimulationsergebnisse verschiedener Zytokine sowohl in durch Verdünnung mit RPMI-Medium hergestellten Vollblutkulturen wie auch in isolierten Zellkulturen stellte sich heraus, dass Vollblutkulturen für derartige Untersuchungen am besten geeignet sind, insbesondere im Hinblick auf die LPS-stimulierte TNF- $\alpha$ -Antwort [DE GROOTE, 1992]. Auch zeigte sich in einer anderen Studie, dass die Anwesenheit von Serum ein wesentlichen Kofaktor für die stimulierbare Zytokinantwort darstellt, da etwa die TNF- $\alpha$ -Antwort bei entsprechenden Untersuchungen ohne Serum wesentlich niedriger ausfiel als mit Serum [KREUTZ, 1997]. Bei der Durchführung der Untersuchungen der eigenen Studie in Vollblutkulturen war somit, ähnlich der klinischen Realität, von der Anwesenheit entsprechender „Serumfaktoren“

auszugehen. Vollblutkulturen bieten mehrere methodische Vorteile: Da die Zellen sich weiterhin in einem physiologischen Milieu befinden und sich das Verhältnis der verschiedenen Blutzellen untereinander nicht verändert, bleiben gegenseitige Regulationsmechanismen erhalten und Aktivierungsphänomene, die bei Zellisolationen auftreten, können ausgeschlossen werden [DE GROOTE, 1992; HASKILL, 1988]. Nicht erfasst bei diesem Verfahren werden allerdings die Zell-Zell-Interaktionen mit der Gefäßwand. Vollblutkulturen kommen in einer Vielzahl von Studien zu Funktionsuntersuchungen bei mononukleären Zellen zum Einsatz [GRUNDMANN, 2000; KLEINSCHMIDT, 1998; LARSEN, 1998; MELLOR, 1998; ZIEGENFUSS, 1999].

### **Bakterientoxine**

Zur Stimulation der Zytokinantwort dienten in der vorliegenden Arbeit als gramnegativer Stimulus das Lipopolysaccharid aus *Escherichia coli* O111:B4 sowie als grampositiver Stimulus eine Suspension aus *Staphylococcus aureus* Cowan strain-I-Lysat. Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, dass eine Dosierung von 1 µg/ml LPS bzw. 5 µl/ml der SAC-I-Suspension jeweils zu einer für das entsprechende Toxin maximalen Zytokinstimulation führen. Andere Arbeitsgruppen kamen zu entsprechenden Ergebnissen [ERTEL, 1995; KREUTZ, 1997; MITOV, 1997]. Problematisch bei LPS-Präparationen ist die mögliche Kontamination mit anderen Bakterienprodukten [REDL, 2001]. So konnte in einer Studie zur Signaltransduktion bei „Toll-like“-Rezeptoren (TLR) gezeigt werden, dass eine Purifikation von LPS erforderlich war, um eine Kreuzreaktion mit einem für grampositive Bakterienbestandteile verantwortlichen Rezeptortyp (TLR2) zu vermeiden [HIRSCHFELD, 2000]. Die o.g. Kontaminationen konnten auch in der vorliegenden Studie nicht ausgeschlossen werden, obwohl die LPS-Präparation von der höchsten erhältlichen Reinheit war. Zu berücksichtigen ist dies insbesondere beim Vergleich von gramnegativ stimulierter mit grampositiv stimulierter Zytokinantwort.

### **Zytokine**

Die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 erfolgte ausschließlich mit kommerziell erhältlichen, jeweils spezifischen ELISA-Kits. Das Testprinzip beruht dabei auf einem quantitativen „Sandwich“-Enzymimmunoassay und gehört zu den Standardverfahren der Zytokinanalyse. Diese Technik hat gegenüber biologischen Assays den Vorteil einer sehr hohen Spezifität. Die Kreuzreaktionsrate wird hierbei mit unter 0,01% angegeben, während im biologischen Assay bestimmte Zellreaktionen auch von anderen Zytokinen ausgelöst werden können [ROCHE, 1999]. Dagegen wird mit der ELISA-Technik die biologische Aktivität der Zytokine nicht erfasst. Um bei der Messung der Zytokinkonzentrationen die Werte im linearen Bereich der Standardkurve durchführen zu

können, mussten stimulierte TNF- $\alpha$ -Proben verdünnt werden. Bei der anschließenden Konzentrationsberechnung wurde der Verdünnungsfaktor berücksichtigt.

### **Weitere Laborparameter**

Die weiteren im Rahmen der Routinelaboranalyse bestimmten Laborparameter wurden den im Klinisch-Chemischen Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes üblichen Qualitätskontrollen unterzogen.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Einfluss der Sedativa Midazolam und Propofol auf die Monozytenfunktion bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis**

#### **Untersuchung der monozytären HLA-DR-Expression**

Die Effizienz der Antigenpräsentation ist u.a. abhängig vom Anteil HLA-DR positiver Monozyten und der Dichte von HLA-DR an der Zelloberfläche. Eine verminderte monozytäre Expression korreliert mit einem erhöhten Infektionsrisiko [CHEADLE, 1993; MONNERET, 2002]. Im Vergleich zu gesunden Personen wird HLA-DR bei Patienten im septischen Schock auf Monozyten vermindert exprimiert [ASTIZ, 1996; HYNNINEN, 2003; LIN, 1993; WAKEFIELD, 1993]. Im Verlauf der Sepsis können neben proinflammatorischen auch antiinflammatorische Mediatoren in Erscheinung treten und letztendlich zu einer massiven proinflammatorischen (SIRS) als auch zu einer antiinflammatorischen Reaktion (CARS) führen. Fällt die monozytäre HLA-DR-Expression auf unter 30% der bei gesunden Kontrollen erzielten Werte ab, so liegt per Definitionem der Status eines „compensatory anti-inflammatory response syndrom“ (CARS) vor [BONE, 1996; DÖCKE, 1997; KOX, 1997]. Eine Expression unter 30% über einen Zeitraum von 4 Tagen korreliert bei Sepsispatienten stark mit einer infausten Prognose, so dass die monozytäre Expression von HLA-DR von vielen Autoren als prognostischer Marker für die Evolution der Sepsis angesehen wird [DÖCKE, 1994; MONNERET, 2006; VOLK, 1990].

In der vorliegenden Arbeit lag die durchschnittliche monozytäre HLA-DR-Expression im Vollblut der gesunden Probanden bei 96%. Die Patienten mit schwerer Sepsis wiesen eine deutliche und anhaltende Suppression der monozytären HLA-DR-Expression auf mit Werten unter 60%. Die Suppression war für alle Zeitpunkte signifikant. Dabei konnten bei 5 Sepsispatienten eine Suppression auf unter 30% der bei den gesunden Probanden erzielten Werte verzeichnet werden. Somit konnte bei 23% der Sepsispatienten im

Untersuchungszeitraum ein CARS nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse wurden in der Literatur beschrieben [LIN, 1993; WAKEFIELD, 1993]. Astiz und Mitarbeiter untersuchten die monozytäre HLA-DR-Expression an 12 gesunden Probanden sowie an 10 Patienten mit schwerer Sepsis und 9 Patienten mit septischem Schock. Gegenüber den Monozyten der gesunden Probanden, die eine mittlere Fluoreszenzintensität (FLI) von 102 aufwiesen, wurde bei den Patienten mit schwerer Sepsis eine Suppression der monozytären HLA-DR-Expression auf mittlere Werte um 75 FLI verzeichnet. Die Suppression war bei Patienten im septischen Schock noch ausgeprägter mit signifikantem Abfall auf 58 FLI [ASTIZ, 1996]. Die Monozytendeaktivierung, gekennzeichnet durch eine verminderte Expression von HLA-DR, führt neben einer insuffizienten Antigenpräsentation zu einer herabgesetzten TNF- $\alpha$ -Freisetzung auf exogene Stimuli wie LPS [KLAVA, 1997].

Auf die monozytäre HLA-DR-Expression im Vollblut der gesunden Probanden hatten die Anästhetika Midazolam und Propofol kaum Auswirkungen. Bei den Patienten mit schwerer Sepsis blieb in der Midazolamgruppe die monozytäre HLA-DR-Expression im Zeitverlauf supprimiert bei Werten um 60% und wies auch in der Prozent-Darstellung nur einen geringen Erholungstrend auf. In der Propofolgruppe erfolgte im Verlauf eine Erholung der monozytären HLA-DR-Expression von 57% an Tag 1 auf 71% an Tag 8, was in der Prozent-Darstellung einer Erholung auf 150% entspricht. Ein signifikanter Unterschied im direkten Vergleich der Sedativa Midazolam und Propofol in ihrem Einfluss auf die monozytäre HLA-DR-Expression ergab sich in der vorliegenden Studie nicht.

### **Untersuchung der monozytären CD14-Expression**

Nach ihrer Expressionsdichte von CD14 werden zwei monozytäre Subpopulationen unterschieden: Zellen mit starker Expression von CD14 (CD14<sup>++</sup> Zellen), die den Hauptteil aller Zellen ausmachen und Zellen mit schwacher Expression von CD14 (CD14<sup>+</sup> Zellen) [PASSLICK, 1989]. CD14<sup>+</sup> Zellen produzieren vornehmlich proinflammatorische Zytokine, während das antiinflammatorische Zytokin IL-10 zwar von CD14<sup>++</sup> Zellen, nicht aber oder zumindest nur in sehr geringer Dosis von CD14<sup>+</sup> Zellen produziert wird. Antiinflammatorische Zytokine wiederum hemmen die monozytäre CD14-Expression [DE WAAL, 1993].

Der Anteil der CD14<sup>+</sup> Zellen kann bei Patienten mit schwerer Sepsis deutlich ansteigen und sogar den Hauptzelltyp ausmachen [FINGERLE, 1993; TSUJIMOTO, 2004]. In einer Studie von Fingerle und Mitarbeitern wurden bei gesunden Probanden (n=35) Werte von 9%  $\pm$  5% gemessen, während von 18 Sepsispatienten drei einen Gesamtanteil CD14<sup>+</sup> Zellen von über 50% und sechs einen Anteil von über 30% aufwiesen. Bei 72% der Sepsispatienten lag der

Anteil der CD14+ Zellen oberhalb der Kontrollwerte gesunder Probanden, also größer als 14% [FINGERLE, 1993]. Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch die Auswertungen der vorliegenden Arbeit. Hier lag die Fraktion der CD14+ Zellen bei gesunden Probanden bei 15%. Bei den Patienten mit schwerer Sepsis war die Fraktion der CD14+ Zellen bei Diagnosestellung auf mittlere Werte um 20% erhöht. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Über den gesamten Beobachtungszeitraum wiesen 5 Sepsispatienten Werte von über 50%, und 12 von über 30% auf.

Die Anzahl der CD14++ Zellen lag bei den gesunden Probanden bei 80%. Signifikant erniedrigt war die Fraktion der CD14++ Zellen bei den Sepsispatienten an Tag 1 mit Werten um 38%. Eine Abnahme der CD14++ Zellen bei Sepsispatienten wurde mehrfach beschrieben [FINGERLE, 1993; LIN, 1993 und 1994]. De Werra und Mitarbeiter wiesen bei 8 von 10 Patienten mit schwerer Sepsis einen Abfall der CD14++ Zellen nach. Der mittlere Prozentsatz der CD14++ Zellen lag bei 35% im Vergleich zu 84% bei gesunden Probanden [DE WERRA, 2001].

Während in der vorliegenden Arbeit Midazolam keinen Einfluss auf die Anzahl der CD14+ Zellen gesunder Probanden hatte, führte der Zusatz von Propofol zu einer deutlichen, signifikanten Zunahme der CD14+ Zellen auf Werte um 64%. Dementsprechend wurde im Propofol-Vollblut eine signifikante Abnahme der CD14++ Zellen von 80% auf 30% verzeichnet.

Bei den Sepsispatienten blieben die Werte in der Midazolamgruppe im Zeitverlauf ebenfalls nahezu unverändert zwischen 20% und 28% für die Fraktion der CD14+ Zellen und bei Werten um 40% für die Fraktion der CD14++ Zellen. Ähnlich wie im Vollblut der gesunden Probanden führt Propofol bei den Sepsispatienten zu einer Zunahme der CD14+ Zellen. Ausgehend von Werten um 20% an Tag 1 findet eine signifikante Zunahme über die ersten 4 Untersuchungstage bis auf 38% statt, was in der Prozent-Darstellung einem Anstieg auf über 190% entspricht. Für Tag 4 ergibt sich darüber hinaus ein signifikanter Unterschied im direkten Vergleich mit der Midazolamgruppe. Am Ende des Untersuchungszeitraums (Tag 8) erholten sich die Werte deutlich, ausgedrückt in einem Rückgang der CD14+ Zellen auf das Ausgangsniveau. Entsprechend führte Propofol in der Betrachtung der CD14++ Zellen zu einem Rückgang um 10%-Punkte auf 26% mit anschließender Erholung auf etwa 50%. Die Beobachtungen blieben allerdings ohne Signifikanz.

## 5.2.2 Einfluss der Sedativa Midazolam und Propofol auf die Zytokinantwort bei gesunden Probanden und bei Patienten mit schwerer Sepsis

### Spontane Zytokinantwort

**TNF- $\alpha$ .** Im Rahmen der Inflammationsreaktion, z.B. nach bakterieller Antigenpräsentation, übernimmt TNF- $\alpha$  die Rolle eines zentralen Mediators. So ist die Frühphase der systemischen Entzündungsantwort gekennzeichnet durch eine exzessive Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1. Als sogenanntes "proximales" oder "Alarmzytokin" wird TNF- $\alpha$  innerhalb der ersten Stunde nach LPS-Kontakt von Monozyten/Makrophagen ausgeschüttet und stimuliert in der Folge die Freisetzung weiterer "distaler" Zytokine wie IL-6 [LIN, 1999; REDL, 1993; RENSING, 2001]. Unter physiologischen Bedingungen sind Zytokine allerdings nicht oder nur in sehr niedrigen Konzentrationen im Blut nachweisbar [BENDTZEN, 1991].

In der Analyse der spontanen TNF- $\alpha$ -Antwort der vorliegenden Arbeit lagen bei den gesunden Probanden sämtliche Werte unterhalb der methodischen Nachweisgrenze des verwendeten ELISA-Tests. Dagegen zeigte sich bei den Patienten mit schwerer Sepsis eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration von 13,9 pg/ml an Tag 1. Die Kurvenverläufe der Sepsispatienten wiesen über den Untersuchungszeitraum keine signifikanten Unterschiede zwischen der Midazolam- und der Propofolgruppe auf. Allenfalls lässt sich ein leichter Trend zu höheren TNF- $\alpha$ -Konzentrationen in der Propofolgruppe an den Tagen 3 und 4 nachweisen mit Werten um 22 bzw. 27 pg/ml. Insgesamt sind die Kurvenverläufe jedoch geprägt von z.T. erheblichen interindividuellen und im Erkrankungsverlauf intraindividuellen Schwankungen. Während bei einigen der Patienten mit schwerer Sepsis an verschiedenen Tagen deutlich erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen bis 200 pg/ml gemessen werden konnten, lagen die Werte bei anderen Patienten deutlich niedriger und nicht selten, über den gesamten Beobachtungszeitraum betrachtet, sogar mehrfach unter der methodischen Nachweisgrenze.

Andere Arbeitsgruppen konnten bei Patienten mit septischem Schock bzw. Sepsis höhere TNF- $\alpha$ -Konzentrationen nachweisen als bei Patienten mit nicht-septischem Schock [ENDO, 1992] bzw. ohne Sepsis [CASEY, 1993]. Diese Ergebnisse scheinen zunächst widersprüchlich zu den eigenen Untersuchungen zu sein. Allerdings zeigt sich bei genauer Analyse dieser Arbeiten, dass z.B. auch Casey und Mitarbeiter nur bei 54% der septischen Patienten überhaupt TNF- $\alpha$  nachweisen konnten. Der Mittelwert bei Sepsispatienten lag hier mit 92 pg/ml deutlich höher als in der vorliegenden Arbeit, allerdings wurden hier auch in einer Kontrollgruppe gesunder Probanden mittlere Werte um 30 pg/ml gemessen im

Vergleich zu Werten kleiner 3 pg/ml in der eigenen Arbeit. Auch Casey berichtete über erhebliche Schwankungen der Zytokinkonzentrationen von nicht nachweisbar bis über 1000 pg/ml [CASEY, 1993].

Bezüglich des Einflusses einer Langzeitsedierung mit Propofol bzw. Midazolam beobachteten Helmy und Mitarbeiter einen signifikanten Anstieg der TNF- $\alpha$ -Freisetzung in der Propofolgruppe nach 48 stündlicher Dauerinfusion an chirurgischen Intensivpatienten. Midazolam dagegen führte zu einem signifikanten Abfall der TNF- $\alpha$ -Konzentration [HELMY, 2001]. In einer anderen Studie von McLeod und Mitarbeiter an intubationspflichtigen Intensivpatienten zeigten sich unter einer 50-stündigen Propofol-Dauerinfusion bei 22 von 30 Patienten eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentration [McLEOD, 1997]. In einer *in vitro* Studie von Rossano und Mitarbeitern führte Propofol zu einer 4 bis 5-fach gesteigerten monozytären TNF- $\alpha$ -Produktion, während in einer weiteren Studie Propofol und Midazolam als Komponenten einer TIVA im Rahmen kardiopulmonaler Bypass-Operationen scheinbar keinen Einfluss auf die TNF- $\alpha$ -Freisetzung hatten [EL AZAB, 2002; ROSSANO, 1992].

**IL-10.** Im Gegensatz zu TNF- $\alpha$  gehört IL-10 zu der Gruppe der antiinflammatorischen Zytokine. IL-10 kann wirkungsvoll die Effektorfunktion der Monozyten/Makrophagen inhibieren, u.a. durch Hemmung der Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-8 [BLACKWELL, 1996; FIORENTINO, 1991; KLAVA, 1997]. Gleichzeitig wird die Produktion anderer antiinflammatorischer Moleküle wie IL-1-Rezeptorantagonist stimuliert [CASSATELLA, 1994], sodass daraus in der Summe eine ausgeprägte antiinflammatorische Aktivität resultiert. Somit kann IL-10 als potenzieller Indikator für die Einleitung eines CARS dienen, da es die HLA-DR-Expression der Monozyten hemmt und somit zu einer reduzierten Produktion proinflammatorischer Zytokine mit konsekutiv gesteigerter Infektanfälligkeit des Organismus führt. [ERTEL, 1995; SPITTLER, 1995]. In verschiedenen klinischen Untersuchungen konnte IL-10 im Blut von Patienten mit Sepsis bzw. mit septischem Schock nachgewiesen werden [DERKX, 1995; GOMEZ-JIMENEZ, 1995; MARCHANT, 1994].

Bei der Analyse der spontanen IL-10-Freisetzung der vorliegenden Arbeit lagen bei den gesunden Probanden, wie bei der TNF- $\alpha$ -Antwort auch, sämtliche Werte unterhalb der methodischen Nachweisgrenze. Bei den Patienten mit schwerer Sepsis wurden wie schon bei der spontanen TNF- $\alpha$ -Antwort, erhöhte Konzentrationen gemessen. Mit Werten um 17 pg/ml wurden im Verlauf höhere IL-10-Konzentrationen in der Midazolamgruppe gemessen gegenüber Werten um 11 pg/ml in der Propofolgruppe. Bei wiederum teilweise erheblichen interindividuellen und intraindividuellen Schwankungen kann diese Entwicklung allerdings nur als Trend gewertet werden, signifikante Unterschiede waren nicht zu verzeichnen.

Astiz und Mitarbeiter wiesen in einer Studie signifikant erhöhte IL-10-Serumspiegel bei Patienten mit schwerer Sepsis ( $16 \pm 4$  pg/ml) und Patienten mit septischem Schock ( $42 \pm 15$  pg/ml) im Vergleich zu gesunden Probanden nach [ASTIZ, 1996]. In der Literatur sind zum Teil deutlich höhere IL-10-Konzentrationen bei Sepsispatienten beschrieben worden. So wurde in einer Arbeit von Rodríguez-Gaspar und Mitarbeitern bei insgesamt 21 Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock eine mittlere IL-10-Konzentration von 167 pg/ml gemessen [RODRIGUEZ-GASPAR, 2001]. Ähnlich hohe IL-10-Konzentrationen mit Werten um 143 pg/ml wurden auch bei Patienten mit schwerem orthopädischem Trauma beschrieben, die in der Folge eine Sepsis entwickelten [GIANNOUDIS, 2000]. Giannoudis und Mitarbeiter wiesen darüber hinaus bei Patienten mit niedriger monozytärer HLA-DR-Expression signifikant höhere IL-10-Konzentrationen auf im Vergleich zu Patienten deren monozytäre HLA-DR-Expression über 30% blieb. In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

In verschiedenen Studien wurden z.T. erhebliche Unterschiede im Ausmaß der TNF- $\alpha$ - und IL-10-Produktion beschrieben. Hierbei könnte der Zeitpunkt der Messung der Zytokinausschüttung eine wichtige Rolle spielen. So stellten Lin und Lowry aus Untersuchungen an gesunden Probanden fest, dass die im Blut nachweisbare TNF- $\alpha$ -Konzentration 60 min nach Injektion einer standardisierten LPS-Menge ihren Maximalwert mit bis zu 1000 pg/ml erreicht, danach steil abfällt und nach weiteren 120 min kaum mehr nachweisbar ist. Zu diesem Zeitpunkt erreicht die IL-10-Konzentration ihren Maximalwert um 200 pg/ml [LIN, 1999]. Eine Halbwertszeit von unter 20 min für TNF- $\alpha$  erschwert die Messung dieses Zytokins zusätzlich [BAIGRIE, 1992; LIN, 1998]. Pinsky und Mitarbeiter berichteten über ähnliche Befunde bei Patienten mit septischem Schock. So konnte mit zunehmender Beobachtungsdauer eine deutliche Abnahme der spontanen TNF- $\alpha$ -Konzentration nachgewiesen werden: Schon nach 2 h sanken die Messwerte im Mittel auf rund 40% der Ausgangswerte ab [PINSKY, 1993]. Dieses Konzept erklärt auch die Tatsache, dass bei einzelnen Patienten mit schwerer Sepsis zu verschiedenen Zeitpunkten sehr hohe TNF- $\alpha$ -Konzentrationen nachgewiesen werden konnten: Im Rahmen der Grunderkrankung, z.B. bei Peritonitis oder Abszessen, muss davon ausgegangen werden, dass es zu wiederholtem Einschweben bakteriellen Materials in den Systemkreislauf kommt. Folglich kommt es zu den jeweiligen Messzeitpunkten der einzelnen Studien zu den beschriebenen stark voneinander abweichenden Ergebnissen der Zytokinkonzentrationen [ASTIZ, 1996; BUTLER, 1992; CREMER, 1996; GIANNOUDIS, 2000; HENNEIN, 1994; LAHAT, 1992; RODRIGUEZ-GASPAR, 2001; STEINBERG, 1995; WEERWIND, 1995].

**IL-6.** Wie Eingangs beschrieben zählt IL-6 im Rahmen der systemischen Entzündungsantwort zu den sog. "distalen" Zytokinen, hauptsächlich freigesetzt durch TNF- $\alpha$  und IL-1 [REDL, 1993; RENSING, 2001]. IL-6 ist im Rahmen der Entzündungsantwort über einen vergleichbar langen Zeitraum von ca. 6h im Serum nachzuweisen, ab wenige Minuten nach Stimulation mit maximalen Plasmakonzentrationen von über 1400 pg/ml nach ca. 2h [LIN, 1999]. Dieses vergleichbar breite Spektrum erklärt den verhältnismäßig einfachen Nachweis von IL-6 im Serum von Intensivpatienten im Vergleich zur Bestimmung der TNF- $\alpha$ - oder IL-10-Konzentration. Schließlich scheint IL-6 bei Sepsis am besten von allen Zytokinen mit Schweregrad und Prognose der Erkrankung zu korrelieren [BIFFL, 1996; FRIELING, 1995; GARDLUND, 1995; SULLIVAN, 1992].

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich bei den gesunden Probanden mittlere Werte um 15 pg/ml. Sowohl Midazolam als auch Propofol führten zu keiner wesentlichen Änderung der IL-6-Konzentrationen. Bei den Patienten mit schwerer Sepsis lag die mittlere IL-6-Konzentration mit über 210 pg/ml deutlich über den Werten der gesunden Probanden. Signifikant erhöht waren die Messungen an den Tagen 1, 3 und 8 in beiden Gruppen, sowie zusätzlich an Tag 2 für die Propofolgruppe.

Während bei den Sepsispatienten in der Midazolamgruppe die mittleren IL-6-Konzentrationen kontinuierlich abnahmen, von über 150 pg/ml an Tag 1 auf rund 50 pg/ml an Tag 8, konnte in der Propofolgruppe zunächst ein Anstieg verzeichnet werden mit einem Maximum an Tag 3 (365 pg/ml). Dabei ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich der beiden Gruppen untereinander. Im weiteren Verlauf fielen dann auch die IL-6-Konzentrationen der Propofolgruppe wieder ab. Für Tag 8 wurde ein signifikanter Rückgang der IL-6-Konzentrationen auf ca. 30% des jeweiligen Ausgangswerts sowohl in der Midazolam- wie auch in der Propofolgruppe verzeichnet.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Helmy und Mitarbeiter in einer Studie an langzeitsedierten Intensivpatienten. Nach 48h Dauerinfusion (entspricht dem Messzeitpunkt Tag 3 der vorliegenden Arbeit) führte Propofol zu einer signifikant erhöhten IL-6-Konzentration um 23% von 142 pg/ml auf 174 pg/ml. Midazolam dagegen führte im gleichen Zeitraum zu einer signifikanten Abnahme um 21% von 139 pg/ml auf 110 pg/ml [HELMY, 2001]. Auch McLeod und Mitarbeiter beobachteten unter einer 50-stündigen Langzeitsedierung mit Propofol bei intubationspflichtigen Intensivpatienten deutlich erhöhte IL-6-Konzentrationen von über 1000 pg/ml [McLEOD, 1997].

An einem Rattenmodell konnten Taniguchi und Mitarbeiter bei Endotoxin-induziertem septischen Schock einen protektiven Effekt von Propofol feststellen. Bei Tieren, denen eine Stunde nach intravenöser Endotoxin-Injektion Propofol infundiert wurde, konnte eine drastische Reduktion der Mortalitätsrate (9% gegenüber 73% bei Tieren ohne Propofolinfusion) verzeichnet werden. Gleichzeitig fiel der Anstieg der spontanen Zytokinantwort (TNF- $\alpha$ , IL-10 und IL-6) deutlich geringer aus [TANIGUCHI, 2002].

### **Stimulierte Zytokinantwort**

In der Vergangenheit wurde in Untersuchungen bei schwerer Sepsis vielfach lediglich die spontane Zytokinfreisetzung analysiert. Dabei wurden die gemessenen Zytokinkonzentrationen als Ausdruck einer allgemeinen Aktivitätssteigerung der mononukleären Zellen interpretiert. Neuere Studien konnten dagegen zeigen, dass es im Rahmen verschiedener Stressereignisse vielmehr zu einer regelrechten Deaktivierung der Monozytenfunktion kommen kann: Die Fähigkeit der mononukleären Zellen des peripheren Blutes bei Endotoxinstimulation mit einer ausreichenden Zytokinfreisetzung zu reagieren war in *ex vivo* Experimenten erheblich beeinträchtigt [DÖCKE, 1997; ERTEL, 1995; GRUNDMANN, 2000; HEAGY, 2000; KLEINSCHMIDT, 1998; MAJETSCHAK, 1999; WILSON, 1997; ZIEGENFUSS, 1999]. Ausgehend von diesen Beobachtungen erschien es daher sinnvoll, den Aktivitätszustand der mononukleären Zellen des peripheren Blutes genauer zu analysieren. Um zusätzlich den Einfluss des stimulierenden Bakterientoxins darstellen zu können, wurde für die Stimulation der Zytokinantwort sowohl gramnegatives LPS als auch grampositives SAC-I verwendet.

Bei der Analyse der stimulierbaren Zytokinantwort zeigte sich folgendes Bild: im Vergleich zum Vollblut der gesunden Probanden wiesen alle Patienten mit schwerer Sepsis unter Stimulation mit LPS eine starke und im Verlauf der ersten Tage anhaltende Suppression der TNF- $\alpha$ -Antwort auf. Mit Werten auf unter 1000 pg/ml gegenüber 4000 pg/ml im Probanden-Vollblut war die TNF- $\alpha$ -Antwort der Sepsispatienten zu allen Zeitpunkten signifikant erniedrigt. In der Betrachtung der LPS-stimulierten IL-10-Antwort zeigte sich dagegen kein Unterschied in der Höhe der gemessenen Konzentrationen im Probanden-Vollblut verglichen mit den Sepsispatienten.

In der Literatur war bisher nur vereinzelt über Ausmaß und insbesondere Verlauf der stimulierbaren Zytokinantwort mononukleärer Zellen des peripheren Blutes bei Patienten mit schwerer Sepsis berichtet worden. Ertel und Mitarbeiter [ERTEL, 1995] hatten die LPS-stimulierte Zytokinfreisetzung im Vollblut von 15 Patienten mit schwerer Sepsis analysiert und konnten, ähnlich wie in der vorliegenden Untersuchung, eine ausgeprägte und lang

anhaltende Suppression der TNF- $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ - und IL-6-Freisetzung beobachten, wohingegen die Zytokinantwort bei 20 nicht septischen Patienten maximale Stimulationsergebnisse zeigte. Bei den Sepsispatienten war außerdem die mRNA-Expression für TNF- $\alpha$  und IL-6 stark reduziert. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch andere Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine Suppression der LPS-stimulierten TNF- $\alpha$ -Antwort bei Patienten mit Sepsis nachweisen konnten [DE WERRA, 2001; MUNOZ, 1991; TSUJIMOTO, 2004; WILSON, 1997].

Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die IL-10-Antwort nach LPS-Stimulation beschrieben [RANDOW, 1995; VAN DER POLL, 1996]. Zwar wiesen in der vorliegenden Arbeit die IL-10-Konzentrationen der Sepsispatienten vergleichbar niedrige Werte wie im Vollblut der gesunden Probanden auf. Jedoch zeigte sich in einer anderen Studie unserer Arbeitsgruppe, bei der die Zytokinantwort der Sepsispatienten mit der von Patienten nach kardiochirurgischen Eingriffen verglichen wurde, eine supprimierte IL-10-Antwort nach LPS- und SAC-Stimulation [WILHELM, 2002].

Die Sedativa Midazolam und Propofol hatten in der vorliegenden Arbeit folgenden Einfluss auf die stimulierte Zytokinantwort: Midazolam führte im Vollblut der gesunden Probanden gegenüber dem Kontroll-Vollblut zu einer Abnahme der LPS-stimulierten Zytokinkonzentration, während Propofol zu einem Anstieg der LPS-stimulierten Zytokinkonzentration führte. Diese Beobachtungen waren sowohl für die TNF- $\alpha$ -Antwort, als auch für die IL-10-Antwort signifikant. Auch bei den Patienten mit schwerer Sepsis führte Propofol im weiteren Verlauf zu einer deutlichen Erholung der stimulierbaren Zytokinantwort, sowohl unter Stimulation mit LPS als auch unter Stimulation mit SAC-I. Signifikant war dieser Anstieg der Zytokinkonzentrationen in der zweiten Hälfte des Untersuchungszeitraums: bezüglich der TNF- $\alpha$ -Freisetzung an den Tagen 4 und 8 und bezüglich der IL-10-Freisetzung an Tag 8 (jeweils in der Prozent-Darstellung). In der Midazolamgruppe blieb dieser Anstieg der Zytokinkonzentrationen aus. Hier blieben die Werte über den gesamten Untersuchungszeitraum auf einem den Ausgangswerten entsprechenden niedrigen Niveau.

Wie Eingangs beschrieben wurde in der vorliegenden Arbeit für die Stimulation der Zytokinantwort sowohl gramnegatives LPS als auch grampositives SAC-I verwendet, um zusätzlich den Einfluss des stimulierenden Bakterientoxins darstellen zu können. LPS erwies sich an Tag 1 als der eindeutig stärkere Stimulus der TNF- $\alpha$ -Antwort und der etwas stärkere Stimulus der IL-10-Antwort. Im weiteren Untersuchungszeitraum verliefen die Kurven der gramnegativ (LPS) und der grampositiv (SAC-I) stimulierten TNF- $\alpha$ - bzw. IL-10-Antwort annähernd deckungsgleich (Daten nicht gezeigt). Signifikante Unterschiede konnten nicht beobachtet werden.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch in der Literatur beschrieben. Astiz und Mitarbeiter beobachteten eine signifikante Suppression der TNF- $\alpha$ -Antwort bei Patienten mit septischem Schock nicht nur nach LPS-Stimulation, sondern auch nach Stimulation mit dem grampositiven Staphylokokken Enterotoxin B (SEB). Die Suppression der TNF- $\alpha$ -Freisetzung war unter SEB Stimulation sogar noch ausgeprägter als unter Stimulation mit LPS [ASTIZ, 1996]. Dies entspricht den Beobachtungen der vorliegenden Studie an Tag 1. Kreutz und Mitarbeiter untersuchten die Zytokinantwort isolierter und in Serum resuspendierter humaner Monozyten und stellten fest, dass sowohl der Zusatz von LPS als auch von SAC-I dosisabhängig zu einer ausgeprägten Zytokinfreisetzung führte. Während in der Analyse der IL-6- und IL-8-Antwort LPS der deutlich stärkere Stimulus war, führte SAC-I bei maximaler Stimulation zu einer zwei- bis dreifach höheren TNF- $\alpha$ -Freisetzung gegenüber einer entsprechenden Stimulation mit LPS [KREUTZ, 1997].

Einschränkend muss festgehalten werden, dass auf der Ebene der Entzündungsantwort die im klinischen Alltag übliche Unterscheidung zwischen „grampositiver“ und „gramnegativer Sepsis“ nicht mehr so scharf vollzogen werden kann: Unabhängig vom primär verantwortlichen Erreger kann es bei schwerer Sepsis zu einer Translokation von Bakterien und Endotoxin aus dem Darm in die Zirkulation kommen [DANNER, 1991]. Endotoxin selbst wiederum führt zu einer Schädigung der Mukosabarriere mit konsekutiver Translokation von Bakterien [DEITCH, 1987; O'DWYER, 1988]. In der vorliegenden Untersuchung war bei einigen Patienten kein Erregernachweis möglich, bei anderen Patienten lag offensichtlich eine grampositive/gramnegative Mischinfektion vor und in wenigen Fällen konnten zwar ausschließlich grampositive Enterokokken nachgewiesen werden, jedoch musste hier aufgrund der Erkrankungslokalisation (Darm) von einer Mitbeteiligung gramnegativer Erreger ausgegangen werden.

Ursachen für die bei der Analyse der stimulierbaren TNF- $\alpha$ - und IL-10-Freisetzung beobachtete und teilweise deutlich ausgeprägte interindividuelle Variabilität der Zytokinantwort könnten neben unterschiedlichen zeitlichen Verläufen der Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine möglicherweise auch Genpolymorphismen sein, wie sie z.B. für TNF- $\alpha$  [LOUIS, 1998; STÜBER, 1996], aber auch für andere Zytokine [FANG, 1999; GALLEY, 2000; HOLMES, 2003; SIPAHI, 2006; ZIEGELER, 2004] nachgewiesen werden konnten.

### 5.2.3 Schlussfolgerung

Bei den gesunden Probanden der vorliegenden Studie machten die vornehmlich antiinflammatorische Zytokine produzierenden CD14<sup>++</sup> Zellen den Hauptteil aller HLA-DR positiver Monozyten aus. Demgegenüber war bei allen Patienten mit schwerer Sepsis die Fraktion der CD14<sup>++</sup> Zellen signifikant erniedrigt. Diese Beobachtungen stimmen mit den in der Literatur veröffentlichten Ergebnissen überein [FINGERLE, 1993; PASSLICK, 1989; TSUJIMOTO, 2004].

Propofol, nicht jedoch Midazolam, führte im Vollblut gesunder Probanden zu einer signifikanten Abnahme der CD14<sup>++</sup> Zellen und zu einer signifikanten Zunahme der vornehmlich proinflammatorische Zytokine produzierenden CD14<sup>+</sup> Zellen. Bei den Patienten mit schwerer Sepsis führte Propofol, nicht aber Midazolam zu einem signifikanten Anstieg der Fraktion CD14<sup>+</sup> Zellen in der ersten Hälfte des Untersuchungszeitraums. Somit wäre zu erwarten, dass Propofol einen Anstieg proinflammatorischer Zytokine bewirkt.

Tatsächlich ergab die Analyse der spontanen IL-6-Antwort eine Korrelation mit der gemessenen Fraktion CD14<sup>+</sup> Zellen: Propofol, nicht aber Midazolam, führte in der ersten Hälfte des Untersuchungszeitraums zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration. Gegen Ende des Untersuchungszeitraums fielen die Werte, entsprechend dem Rückgang der CD14<sup>+</sup> Zellen, wieder deutlich ab. Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Studien [HELMY, 2001; McLEOD, 1997] führte Propofol zu keinem signifikanten Anstieg der spontanen TNF- $\alpha$ -Freisetzung. In der vorliegenden Studie konnte lediglich ein leichter Trend zu erhöhten TNF- $\alpha$ -Werten in der Propofolgruppe gesehen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie legen nahe, dass Midazolam und Propofol im Rahmen der Langzeitsedierung bei Patienten mit schwerer Sepsis einen unterschiedlichen, teils konträren Einfluss auf die spontane Produktion proinflammatorischer und antiinflammatorischer Zytokine haben. Dies gilt insbesondere für die IL-6-Antwort. Bekanntlich können im Verlauf der Sepsis sowohl hohe Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen [DOFFERHOFF, 1992; FISHER, 1993; LESER, 1991; PINSKY, 1993] als auch hohe Konzentrationen von antiinflammatorischen Zytokinen [DÖCKE, 1994 und 1997; VAN DISSEL, 1998; VOLK, 1990] zu einer vitalen Bedrohung mit erhöhtem Letalitätsrisiko führen. Die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen ist entscheidend sowohl für den Verlauf einer Sepsis mit ihren unterschiedlichen Manifestationen SIRS oder CARS, als auch für mögliche Therapieansätze. Vor diesem Hintergrund, insbesondere bei einer möglichst individuell abgestimmten Therapie der

schweren Sepsis intensivpflichtiger Patienten, könnte die Wahl des geeigneten Sedativums durchaus klinische Bedeutung haben.

Im Vergleich zu den gesunden Probanden wurde bei den Patienten mit schwerer Sepsis eine signifikant verminderte monozytäre HLA-DR-Expression über den gesamten Untersuchungszeitraum verzeichnet. Langzeitsedierung mit Propofol nicht aber mit Midazolam führte über den Untersuchungszeitraum zu einem deutlichen Anstieg HLA-DR positiver Monozyten. In der Literatur wurde bei anhaltend niedriger monozytärer HLA-DR-Expression eine signifikant erhöhte IL-10-Freisetzung beschrieben [GIANNOUDIS, 2000]. In der vorliegenden Studie wiesen die Patienten mit schwerer Sepsis in der Midazolamgruppe zwar höhere spontane IL-10-Konzentrationen auf als in der Propofolgruppe. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich hierbei allerdings nicht.

Es gibt Hinweise darauf, dass die monozytäre Deaktivierung oder Immunparalyse, die charakterisiert ist durch eine verminderte HLA-DR-Expression, mit einer reduzierten TNF- $\alpha$ -Antwort nach Stimulation mit LPS einher geht [KLAVA, 1997; ASTIZ, 1996]. So zeigte sich in der vorliegenden Studie erwartungsgemäß eine deutlich ausgeprägte Suppression der TNF- $\alpha$ -Antwort der Patienten mit schwerer Sepsis nach LPS-Stimulation im Vergleich zu den gesunden Probanden. Der Zusatz von Propofol führte im Vollblut der gesunden Probanden zu einer signifikanten Zunahme der LPS-stimulierten TNF- $\alpha$ - und IL-10-Freisetzung, während Midazolam eine Abnahme der TNF- $\alpha$ - und IL-10-Konzentrationen bewirkte. Ähnlich zeigte sich der Verlauf bei den Sepsispatienten: Während Propofol in der zweiten Hälfte des Untersuchungszeitraums, entsprechend dem verzeichneten Anstieg der Fraktion HLA-DR positiver Monozyten, zu einer signifikanten Erholung der LPS-stimulierten TNF- $\alpha$ - und IL-10-Freisetzung führte, blieben die Zytokinkonzentrationen in der Midazolamgruppe über den gesamten Untersuchungszeitraum auf einem konstant niedrigen Niveau.

Es zeigte sich ferner, dass die Erholung der TNF- $\alpha$ - und IL-10-Freisetzung in der Propofolgruppe keineswegs für gramnegatives LPS spezifisch war. Auch unter Stimulation mit dem grampositiven Toxin SAC-I war ein signifikanter Anstieg der TNF- $\alpha$ - und IL-10-Freisetzung in der Propofol-, nicht aber in der Midazolamgruppe zu beobachten. Das Gram-Verhalten des stimulierenden Bakterientoxins hatte in der vorliegenden Studie folglich keinen Einfluss auf die Zytokinantwort der Sepsispatienten.

Mehrere Autoren beschrieben eine erhöhte Morbiditäts- und Letalitätsrate bei Patienten mit anhaltend niedriger monozytärer HLA-DR-Expression, einhergehend mit einer herabgesetzten TNF- $\alpha$ -Freisetzung der Monozyten/Makrophagen auf eine Stimulation mit

LPS [APPEL, 1989; HERSHMAN, 1990; HEAGY, 2000; MONNERET, 2006; MUNOZ, 1991]. Munoz und Mitarbeiter untersuchten die LPS-stimulierte TNF- $\alpha$ -Antwort bei Intensivpatienten, die an einer Sepsis erkrankten. Dabei zeigte sich bei den überlebenden Patienten eine Erholung der LPS-stimulierten TNF- $\alpha$ -Freisetzung, während diese bei den später versterbenden Patienten dauerhaft supprimiert blieb [MUNOZ, 1991]. Heagy und Mitarbeiter zeigten, dass Intensivpatienten mit den niedrigsten LPS-stimulierten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen signifikant länger beatmet waren, häufiger an Begleitinfektionen erkrankten und auch länger auf der Intensivstation behandelt werden mussten als Patienten, bei denen eine höhere LPS-stimulierte TNF- $\alpha$ -Antwort festgestellt wurde [HEAGY, 2000]. Ploder und Mitarbeiter untersuchten die Zytokinantwort und die Monozytenaktivität bei chirurgischen Sepsispatienten und kamen zu dem Ergebnis, dass die *ex vivo* LPS-stimulierte TNF- $\alpha$ -Antwort noch vor der monozytären HLA-DR-Expression oder der spontanen IL-6-Antwort mit einer schlechteren Prognose korrelierte [PLODER, 2006]. Fasst man die Ergebnisse dieser Studien zusammen, so wäre zu vermuten, dass eine anhaltend supprimierte LPS-stimulierte TNF- $\alpha$ -Antwort als Marker für eine schlechte Prognose bei Intensivpatienten gewertet werden kann. Die jüngsten Ergebnisse der eigenen Arbeitsgruppe zeigten diesbezüglich jedoch einen erheblichen geschlechtsspezifischen Unterschied: Bei den nichtüberlebenden Frauen konnte eine Erholung der Zytokinantwort beobachtet werden, während sich bei den nichtüberlebenden Männern eine fortbestehende Suppression der stimulierbaren TNF- $\alpha$ -Antwort zeigte, die im Vergleich zu der Antwort bei nichtüberlebenden Frauen signifikant unterschiedlich war. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass eine anhaltende Suppression der LPS-stimulierten TNF- $\alpha$ -Antwort bei männlichen Patienten mit schwerer Sepsis als Marker für eine schlechtere Prognose dienen kann, nicht aber bei weiblichen Patienten [BAUER, 2006].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bezüglich der 28-Tage-Letalität keine Korrelation mit der Toxin-stimulierten Zytokinantwort in der Propofol- oder Midazolamgruppe. Allerdings erbrachte die Analyse der intensivmedizinischen Scorewerte der Sepsispatienten eine Übereinstimmung mit der sich erholenden Stimulierbarkeit der Zytokinantwort. So führte Propofol sowohl im MOF-, SOFA- als auch im APACHE II Score zu einer signifikant schnelleren Erholung der Scorewerte gegenüber der Sedierung mit Midazolam.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen somit eine raschere Genesung bei Langzeitsedierung mit Propofol gegenüber einer Sedierung mit Midazolam vermuten. Einschränkend zu berücksichtigen ist hierbei die relativ niedrige Fallzahl. Daher sollten in weiteren prospektiven klinischen Studien mit größerer Fallzahl die genannten Effekte der

Sedativa Midazolam und Propofol auf die Monozytenfunktion in der Langzeittherapie von intensivpflichtigen Patienten mit schwerer Sepsis überprüft werden.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 **A**derem A. Role of Toll-like receptors in inflammatory response in macrophages. Crit Care Med 2001;29 Suppl:S16-18
- 2 American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992;20:864-874
- 3 Appel SH, Wellhausen SR, Montgomery R, DeWeese RC, Polk HC Jr. Experimental and clinical significance of endotoxin-dependent HLA-DR expression on monocytes. J Surg Res 1989;47:39-44
- 4 Astiz M, Saha D, Lustbader D, Lin R, Rackow E. Monocyte response to bacterial toxins, expression of cell surface receptors, and release of anti-inflammatory cytokines during sepsis. J Lab Clin Med 1996;128:594-600
- 5 Ayala A, Ertel W, Chaudry IH. Trauma-induced suppression of antigen presentation and expression of major histocompatibility class II antigen complex in leukocytes. Shock 1996;5:79-90
- 6 **B**aeuerle PA, Baltimore D. I $\kappa$ B: a specific inhibitor of the NF- $\kappa$ B transcription factor. Science 1998;242:540-546
- 7 Baigrie RJ, Lamont PM, Kwiatkowski D, Dallman MJ, Morris PJ. Systemic cytokine response after major surgery. Br J Surg 1992;72:757-760
- 8 Bailie GR, Cockshott ID, Douglas EJ, Bowles BJ. Pharmacokinetics of propofol during and after long-term continuous infusion for maintenance of sedation in ICU patients. Br J Anaesth 1992;68:486-491
- 9 Bakker J, Gris P, Coffernils M, Kahn RJ, Vincent JL. Serial blood lactate levels can predict the development of multiple organ failure following septic shock. Am J Surg 1996;171:221-226
- 10 Bauer I, Bauer M, Raddatz A, Luedtke C, Werth M, Silomon M, Rensing H, Wilhelm W. Einfluss des Geschlechts auf die stimulierbare Zytokinantwort bei Patienten mit schwerer Sepsis. Anaesthesist 2006;55:515-527
- 11 Bauer M. Pathophysiologie der Sepsis: Aktuelle Konzepte. Anaesthesist 1996;45:312-322
- 12 Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K. Sepsis: Aktuelle Aspekte zu Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie. Anaesthesist 2006;55:835-845
- 13 Behne M, Asskali F, Steuer A, Forster H. Midazolam-Dauerinfusion zur Sedierung von Beatmungspatienten. Anaesthesist 1987;36:228-232
- 14 Bendtzen K. Clinical significance of cytokines. Natural and therapeutic regulation. Seminars in Clinical Immunology 1991;3:5-13

- 15 Beutler BA, Milsark IW, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution, and metabolic fate in vivo. *J Immunol* 1985;135:3972-3977
- 16 Beutler B, Poltorak A. Sepsis and evolution of the innate immune response. *Crit Care Med* 2001;29 Suppl:S2-7
- 17 Bidri M, Royer B, Averlant G, Bismuth G, Guillosson JJ, Arock M. Inhibition of mouse mast cell proliferation and proinflammatory mediator release by benzodiazepines. *Immunopharmacology* 1999;43:75-86
- 18 Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient: marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 1996;224:647-664
- 19 Blackwell TS, Christman JW. Sepsis and cytokines: current status. *Br J Anaesth* 1996;77:110-117
- 20 Bölke E, Jehle PM, Graf M, Baier A, Wiedeck H, Steinbach G, Storck M, Orth K. Inflammatory response during abdominal and thyroid surgery: a prospective clinical trial on mediator release. *Shock* 2001;16:334-339
- 21 Böyum A. Separation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scan J Clin Lab Invest* 1968;21:77
- 22 Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS and CARS. *Crit Care Med* 1996;24:1125-1128
- 23 Bone RC, Fisher CJJ, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. The methylprednisolone severe sepsis study group. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 1987;317:653-658
- 24 Borden EC, Chin P. Interleukin-6: a cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. *J Lab Clin Med* 1994;123:824-829
- 25 Butler J, Chong GL, Baigrie RJ, Pillai R, Westaby S, Rocker GM. Cytokine responses to cardiopulmonary bypass with membrane and bubble oxygenation. *Ann Thorac Surg* 1992;53: 833-838
- 26 Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975;72:3666-3670
- 27 Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993;119:771-778
- 28 Cassatella MA, Meda L, Gasperini S, Calzetti F, Bonora S. Interleukin 10 (IL-10) upregulates IL-1 receptor antagonist production from lipopolysaccharide-stimulated human polymorphonuclear leukocytes by delaying mRNA degradation. *J Exp Med* 1994;179:1695-1699
- 29 Chadbourne TL. Ether leukocytosis. *Philadelphia Med J* 1899;3:390-395
- 30 Chapman PB, Lester TJ, Casper ES, Gabrilove JL, Wong GY, Kempin SJ, Gold PJ, Welt S, Warren RS, Starnes HF, Sherwin SA, Old LJ, Oettgen HF. Clinical pharma-

- colony of recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 1987;5:1942-1951
- 31 Cheadle, WG. The human leukocyte antigens and their relationship to infection. *Am J Surg* 1993;165:75S-81S
- 32 Cremer J, Martin M, Redl H, Bahrami S, Abraham C, Graeter T, Haverich A, Schlag G, Borst HG. Systemic inflammatory response syndrome after cardiac operations. *Ann Thorac Surg* 1996;61:1714-1720
- 33 **D**anner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE. Endotoxemia in human septic shock. *Chest* 1991;99:169-175
- 34 De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F, Pirenne J, Gathy R, Lopez M, Dehart I, Igot D, Baudrihay M, Delacroix D, Franchimont P. Direct stimulation of cytokines (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-2, IFN- $\gamma$  and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. *Cytokine* 1992;4:239-248
- 35 Deitch EA, Berg R, Specian R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg* 1987;122:185-190
- 36 Derkx B, Marchant A, Goldman M, Bijlmer R, van Deventer S. High levels of interleukin-10 during the initial phase of fulminant meningococcal septic shock. *J Infect Dis* 1995;171:229-232
- 37 Detriche O, Berre J, Massaut J, Vincent JL. The Brussels sedation scale: use of a simple clinical sedation scale can avoid excessive sedation in patients undergoing mechanical ventilation in the intensive care unit. *Br J Anaesth* 1999;83:698-701
- 38 de Waal Malefyt R, Figdor CG, Huijbens R, Mohan-Peterson S, Bennet B, Culpepper J. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. *J Immunol* 1993;151:6370-6380
- 39 de Werra I, Zanetti G, Jaccard C, Chioléro R, Schaller M-D, Yersin B, Glauser MP, Calandra T, Heumann D. CD14 expression on monocytes and TNF $\alpha$  reduction in patients with septic shock, cardiogenic shock or bacterial pneumonia. *Swiss Med Wkly* 2001; 131:35-40
- 40 Dinarello CA. The endogenous pyrogens in host defense interactions. *Hospital Practice* 1989;24:111-128
- 41 Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000;118:503-508
- 42 Dirksen MSC, Vree TB, Driessen JJ. Clinical pharmacokinetics of long-term infusion of midazolam in critically ill patients - preliminary results. *Anaesthesia and Intensive Care* 1987;15:440-444
- 43 Döcke, W.D., U. Syrbe, A. Meinecke, C. Platzner, A. Makki, K. Asadullah, C. Klug, H. Zuckermann, P. Reinke, H. Brunner, R. Baehr, and H.D. Volk. Improvement of monocyte function - a new therapeutic approach? *Intensive Care and Emergency Medicine* 1994;18:473-488

- 44 Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W. Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997;3:678-681
- 45 Döcke, W.D., P. Reinke, R. von Baehr, and H.D. Volk. Monitoring der monozytären HLA-DR-Expression bei Transplantation und Sepsis, in: Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik, G. Schmitz and G. Rothe, Editor. 1994, Schattauer-Verlag: Stuttgart. 163-177
- 46 Dofferhoff AS, de Jong HJ, Bom VJ, van der Meer J, Limburg PC, de Vries-Hospers HG, Marrink J, Mulder PO, Weits J. Complement activation and the production of inflammatory mediators during the treatment of severe sepsis in humans. *Scand J Infect Dis* 1992;24:197-204
- 47 Driessen JJ, Vree TB, Guelen PJM. The effects of acute changes in renal function on the pharmacokinetics of midazolam during long-term infusion in ICU patients. *Acta Anaesthesiologica Belgica* 1991;42:149-155
- 48 **E**chtenacher B, Falk W, Mannel DN, Krammer PH. Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J Immunol.* 1990;145:3762-3766
- 49 Edelman DA, Jiang Y, Tyburski J, Wilson RF, Steffes C. Toll-Like Receptor-4 Message Is Up-Regulated in Lipopolysaccharide-Exposed Rat Lung Pericytes. *J Surg Res.* 2006;134:22-27
- 50 El Azab SR, Rosseel PM, De Lange JJ, van Wijk EM, van Strik R, Scheffer GJ. Effect of VIMA with sevoflurane versus TIVA with propofol or midazolam-sufentanil on the cytokine response during CABG surgery. *Eur J Anaesthesiol* 2002;19:276-282
- 51 Elebute EA, Stoner HB. The grading of sepsis. *Br J Surg* 1983;70:29-31
- 52 Endo S, Inada K, Inoue Y, Kuwata Y, Suzuki M, Yamashita H, Hoshi S, Yoshida M. Two types of septic shock classified by the plasma levels of cytokines and endotoxin. *Circ Shock* 1992;38:264-274
- 53 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* 1995;85:1341-1347
- 54 **F**aist E, Markewitz A, Fuchs D, Lang S, Zarius S, Schildberg FW, Wachter H, Reichart B. Immunomodulatory therapy with thymopentin and indomethacin. Successful restoration of interleukin-2 synthesis in patients undergoing major surgery. *Ann Surg* 1991;214:264-273
- 55 Fang XM, Schröder S, Hoefft A, Stüber F. Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: Interleukin-1 receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. *Crit Care Med* 1999;27:1330-1334
- 56 Fasquelle R, Delaunay A. Geschichte der Mikrobiologie. In: Toellner R (Ed.) *Illustrierte Geschichte der Medizin.* Andreas & Andreas, Salzburg 1986;2392-2397

- 57 Fingerle G, Pforte A, Passlick B, Blumenstein M, Ströbel M, Ziegler-Heitbrock HWL. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood* 1993;82:3170-3176
- 58 Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. I-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-3822
- 59 Fisher CJ Jr, Opal SM, Dhainaut JF, Stephens S, Zimmerman JL, Nightingale P, Harris SJ, Schein RM, Panacek EA, Vincent JL. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med* 1993;21:318-327
- 60 Fong Y, Moldawer LL, Marano M, Wei H, Tatter SB, Clarick RH, Santhanam U, Sherris D, May LT, Sehgal PB, Lowry SF. Endotoxemia elicits increased circulating  $\beta_2$ -IFN/IL-6 in man. *J Immunol* 1989;142:2321-2324
- 61 Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, Lowry SF. The biologic characteristics of cytokines and their implications in surgical injury. *Surg Gynecol Obstet* 1990;170:363-378
- 62 Frankenberger M, Sternsdorf T, Pechumer H, Pforte A, Ziegler-Heitbrock HWL. Differential cytokine expression in human blood monocyte subpopulations: A polymerase chain reaction analysis. *Blood* 1996;87:373-377
- 63 Frieling JT, van Deuren M, Wijdenes J, van der Meer JW, Clement C, van der Linden CJ, Sauerwein RW. Circulating interleukin-6 receptor in patients with sepsis syndrome. *J Infect Dis* 1995;171:469-472
- 64 Galley HF, DiMatteo MA, Webster NR. Immunomodulation by anaesthetic, sedative and analgesic agents: does it matter? *Intensive Care Med* 2000;26:267-274
- 65 Gallos G, Jones DR, Nasr SH, Emala CW, Lee HT. Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis. *Anesthesiology* 2004;101:902-911
- 66 Gårdlund, Sjölin J, Nilsson A, Roll M, Wickerts CJ, Wretling B. Plasma levels of cytokines in primary septic shock in humans: correlation with disease severity. *J Infect Dis* 1995;172:296-301
- 67 Geng Y, Zhang B, Lotz M. Protein tyrosine kinase activation is required for lipopolysaccharide induction of cytokines in human blood monocytes. *J Immunol* 1993;151:6692-6700
- 68 Giannoudis PV, Smith RM, Perry SL, Windsor AJ, Dickson RA, Bellamy MC. Immediate IL-10 expression following major orthopaedic trauma: relationship to anti-inflammatory response and subsequent development of sepsis. *Intensive Care Med* 2000;26:1076-1081
- 69 Giraud GD, MacCannell KL. Decreased nutrient blood flow during dopamine- and epinephrine-induced intestinal vasodilation. *J Pharmacol Exp Ther* 1984;230:214-220
- 70 Gomez-Jimenez J, Martin MC, Sauri R, Segura RM, Estan F, Ruiz JC, Nuvials X, Boveda JL, Peracaula R, Salgado A. Interleukin-10 and the monocytic/macrophage-induced inflammatory response in septic shock. *J Infect Dis* 1995;171:472-475

- 71 Goris RJ, te Boekhorst TP, Nuytinck JK, Gimbrere JS. Multiple-organ failure. Generalized autodestructive inflammation? Arch Surg 1985;120:1109-1115
- 72 Gramm HJ, Hannemann L, Reinhart K, Lode H. Sepsis: ein Begriff im Wandel. Dtsch med Wschr 1995;120:498-502
- 73 Greenblatt DJ, Abernethy DR, Locniskar A, Harmatz JS, Limjuco RA, Shader RI. Effect of age, gender and obesity on midazolam kinetics. Anaesthesiology 1984;61:27-35
- 74 Grundmann U, Rensing H, Adams HA, Falk S, Wendler O, Ebinger N, Bauer M. Endotoxin desensitization of human mononuclear cells after cardiopulmonary bypass: role of humoral factors. Anesthesiology 2000;93:359-369
- 75 Grzelak I, Olszewski WL, Zaleska M, Durlik M, Lagiewska B, Muszynski M, Rowinski W. Blood cytokine levels rise even after minor surgical trauma. J Clin Immunol 1996;16:159-164
- 76 Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, Thijs LG, Aarden LA. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. Blood 1989;74:1704-1710
- 77 Hackl JM. Parenterale und enterale Ernährung. Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 1998;33:731-753
- 78 Haskill S, Johnson C, Eierman D, Becker S, Warren K. Adherence induces selective mRNA expression of monocyte mediators and protooncogenes. J Immunol 1988; 140:1690-1694
- 79 Heagy W, Hansen C, Nieman K, Cohen M, Richardson C, Rodriguez JL, West MA. Impaired ex vivo lipopolysaccharide-stimulated whole blood tumor necrosis factor production may identify "septic" intensive care unit patients. Shock 2000;14:271-277
- 80 Hedera P, Stanton M, Floer B, Wald JJ. Prolonged coma after continuous sedation with propofol. Eur Neurol 1999;41:116-117
- 81 Heesen M, Bachmann-Mennenga B, Zeiler D, Mahler M, Hempelmann G. Increase of interleukin-6 plasma concentrations and HLA-DR positive T-lymphocytes after hypotensive anaesthesia with sodium nitroprusside. Acta Anaesthesiol Scand 1995;39:965-969
- 82 Heine J, Leuwer M, Scheinichen D, Arseniev L, Jaeger K, Piepenbrock S. Flow cytometry evaluation of the in vitro influence of four i.v. anaesthetics on respiratory burst of neutrophils. Br J Anaesth 1996;77:387-392
- 83 Heller A, Heller S, Blecken S, Urbaschek R, Koch T. Effects of intravenous anesthetics on bacterial elimination in human blood in vitro. Acta Anaesthesiol Scand 1998;42:518-526
- 84 Helmy SA, Al-Attayah RJ. The immunomodulatory effects of prolonged intravenous infusion of propofol versus midazolam in critically ill surgical patients. Anaesthesia 2001;56:4-8
- 85 Hennein HA, Ebba H, Rodriguez JL, Merrick SH, Keith FM, Bronstein MH, Leung JM, Mangano DT, Greenfield LJ, Rankin JS. Relationship of the proinflammatory

- cytokines to myocardial ischemia and dysfunction after uncomplicated coronary revascularization. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;108:626-635
- 86 Hebert PC, Wells G, Blajchman MA, Marshall J, Martin C, Pagliarello G, Tweeddale M, Schweitzer I, Yetisir E. A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. Transfusion requirements in critical care investigators, Canadian critical care trials group. *N Engl J Med* 1999;340:409-417
- 87 Hershman MJ, Cheadle WG, Wellhausen SR, Davidson PF, Polk HC Jr. Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br J Surg* 1990;77:204-207
- 88 Hibi M, Murakami M, Saito M, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp 130. *Cell* 1990;63:1149-1157
- 89 Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol* 2000;165:618-622
- 90 Hole A, Unsgaard G, Breivik H. Monocyte functions are depressed during and after surgery under general anaesthesia but not under epidural anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1982;26:301-307
- 91 Holmes CL, Russell JA, Walley KR. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. *Chest* 2003;124:1103-1115
- 92 Hollenberg SM, Ahrens TS, Astiz ME, Chalfin DB, Dasta JF, Heard SO, Martin C, Susla GM, Vincent JL. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients in sepsis. *Crit Care Med* 1999;27:639-660
- 93 Hughes MA, Glass PS, Jacobs JR. Context-sensitive half-time in multicompartment pharmacokinetic models for intravenous anesthetic drugs. *Anesthesiology* 1992;76:334-341
- 94 Hunter T. Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 1995;80:225-236
- 95 Hunter T. Signaling - 2000 and beyond. *Cell* 2000;100:113-127
- 96 Hynninen M, Pettila V, Takkunen O, Orko R, Jansson SE, Kuusela P, Renkonen R, Valtonen M. Predictive value of monocyte histocompatibility leukocyte antigen-DR expression and plasma interleukin-4 and -10 levels in critically ill patients with sepsis. *Shock* 2003;20:1-4
- 97 Inada T, Taniuchi S, Shingu K, Kobayashi Y, Fujisawa J, Nakao S. Propofol depressed neutrophil hydrogen peroxide production more than midazolam, whereas adhesion molecule expression was minimally affected by both anesthetics in rats with abdominal sepsis. *Anesth Analg* 2001;92:437-441
- 98 Jaeger K, Scheinichen D, Heine J, Andre M, Bund M, Piepenbrock S, Leuwer M. Remifentanyl, fentanyl, and alfentanil have no influence on the respiratory burst of human neutrophils in vitro. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998;42:1110-1113

- 99 Jensen AG, Dahlgren C, Eintrei C. Propofol decreases random and chemotactic stimulated locomotion of human neutrophils in vitro. *Br J Anaesth* 1993;70:99-100
- 100 Jolliet P, Pichard C, Biolo G, Chioléro R, Grimble G, Leverve X, Nitenberg G, Novak I, Planas M, Preiser JC, Roth E, Schols AM, Wernerman J (Working group on nutrition and metabolism, European Society of Intensive Care Medicine). Enteral nutrition in intensive care patients: a practical approach. *Intensive Care Med* 1998; 24:848-859
- 101 **K**ern H, Redlich U, Hotz H, von Heymann C, Grosse J, Konertz W, Kox WJ. Risk factors for prolonged ventilation after cardiac surgery using APACHE II, SAPS II, and TISS: comparison of three different models. *Intensive Care Med* 2001;27:407-415
- 102 Klava A, Windsor AC, Farmery SM, Woodhouse LF, Reynolds JV, Ramsden CW, Boylston AW, Guillou PJ. Interleukin-10. A role in the development of postoperative immunosuppression. *Arch Surg* 1997;132:425-429
- 103 Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, Sparks LH, Gamble JR, Agosti JM, Waltersdorff AM. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1986;136:4220-4225
- 104 Kleinschmidt S, Bauer M, Wanner G, Bussmann D, Ziegenfuß T, Menger MD, Larsen R. Einfluss von Gammahydroxybuttersäure (GHB) auf die proinflammatorische Zytokin-Genexpression bei koronarchirurgischen Eingriffen. *Anaesthesist* 1998;47:651-662
- 105 Kleinschmidt S, Wanner GA, Bussmann D, Kremer JP, Ziegenfuß T, Menger MD, Bauer M. Proinflammatory cytokine gene expression in whole blood from patients undergoing coronary artery bypass surgery and its modulation by pentoxifylline. *Shock* 1998;9:12-20
- 106 Klotz U. Klinische Pharmakologie von Midazolam. *Anaesthesiol Reanim* 1989;14:347-354
- 107 Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985;13:818-829
- 108 Koch T, Heller S. Sepsis/SIRS: Pathomechanismen und therapeutische Ansätze. *Anästhesiol Intensivmed* 1996;37:386-403
- 109 Kowalski SD, Rayfield CA. A post hoc descriptive study of patients receiving propofol. *Am J Crit Care* 1999;1:507-513
- 110 Kox WJ, Bone RC, Krausch D, Döcke WD, Kox SN, Wauer H, Egerer K, Querner S, Asadullah K, von Baehr R, Volk HD. Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Arch Intern Med* 1997; 157:389-393
- 111 Kress HG, Eberlein T, Horber B, Weis KH. Suppression of neutrophil migration and chemiluminescence is due to the sulphur atom in the thiobarbiturate molecule. *Acta Anaesthesiol Scand* 1989;33:122-128
- 112 Kreutz M, Ackermann U, Hauschildt S, Krause SW, Riedel D, Bessler W, Andreesen R. A comparative analysis of cytokine production and tolerance induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharides and *Staphylococcus aureus* in human monocytes. *Immunology* 1997;92:396-401

- 113 Kreymann G, Wolf M. Geschichte und Definition der Sepsis - Brauchen wir eine neue Terminologie? *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 1996;31:9-14
- 114 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* 1993;37:386-389
- 115 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* 1995;39:624-627
- 116 Lahat N, Zlotnick AY, Shtiller R, Bar I, Merin G. Serum levels of IL-1, IL-6 and tumour necrosis factors in patients undergoing coronary artery bypass grafts or cholecystectomy. *Clin Exp Immunol* 1992;89:255-260
- 117 Larrick JW, Graham D, Toy K, Lin LS, Senyk G, Fendly BM. Recombinant tumor necrosis factor causes activation of human granulocytes. *Blood* 1987;69:640-644
- 118 Larsen B, Hoff G, Wilhelm W, Buchinger H, Wanner GA, Bauer M. Effect of intravenous anesthetics on spontaneous and endotoxin-stimulated cytokine response in cultured human whole blood. *Anesthesiology* 1998;89:1218-1227
- 119 Larsen R. *Anästhesie* (7. Aufl). Urban & Fischer Verlag, München, Jena 2002
- 120 Leser HG, Gross V, Scheibenbogen C, Heinisch A, Salm R, Lausen M, Ruckauer K, Andreesen R, Farthmann EH, Scholmerich J. Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 1991;101:782-785
- 121 Leysen JE, Gommeren W, Niemegeers CJ. [3H]Sufentanil, a superior ligand for mu-opiate receptors: binding properties and regional distribution in rat brain and spinal cord. *Eur J Pharmacol* 1983;87:209-225
- 122 Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. *Crit Care Med* 2002;30 Suppl:S1-11
- 123 Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. In: Schwartz SI (ed) *Principles of surgery*, 7<sup>th</sup> edn. McGraw-Hill, New York 1998:3-51
- 124 Lin E, Lowry SF. Inflammatory cytokines in major surgery: a functional perspective. *Intensive Care Med* 1999;25:255-257
- 125 Lin RY, Astiz ME, Saxon JC, Rackow EC. Altered leukocyte immunophenotypes in septic shock. Studies of HLA-DR, CD11b, CD14, and IL-2R expression. *Chest* 1993;104:847-853
- 126 Lin RY, Astiz ME, Saxon JC, Saha DC, Rackow EC. Relationships between plasma cytokine concentrations and leukocyte functional antigen expression in patients with sepsis. *Crit Care Med* 1994;22:1595-1602
- 127 Livingston BM, Mackenzie SJ, MacKirdy FN, Howie JC on behalf of the Scottish Intensive Care Society Audit Group. Should the pre-sedation Glasgow Coma Scale value be used when calculating Acute Physiology and Chronic Health Evaluation scores for sedated patients? *Crit Care Med* 2000;28:389-394

- 128 Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf-Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, De Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. *Clin Exp Immunol* 1998;113: 401-406
- 129 Lun A, Cho MY, Müller C, Staffa G, Bechstein WO, Radke C, Neuhaus P, Renz H. Diagnostic value of peripheral blood T-cell activation and soluble IL-2 receptor for acute rejection in liver transplantation. *Clinica Chimica Acta* 2002;320:69-78
- 130 Luster AD. Chemokines - Chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436-445
- 131 **M**ajetschak M, Flach R, Kreuzfelder E, Jennissen V, Heukamp T, Neudeck F, Schmit-Neuerburg KP, Obertacke U, Schade FU. The extent of traumatic damage determines a graded depression of the endotoxin responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from patients with blunt injuries. *Crit Care Med* 1999;27: 313-318
- 132 Malacrida R, Fritz ME, Suter PM, Crevoisier C. Pharmacokinetics of midazolam administered by continuous intravenous infusion to intensive care patients. *Crit Care Med* 1991;20:1123-1126
- 133 Marchant A, Deviere J, Byl B, De Groote D, Vincent JL, Goldman M. Interleukin-10 production during septicemia. *Lancet* 1994;343:707-708
- 134 Marshall JC, Cook DJ, Christou NV, Bernard GR, Sprung CL, Sibbald WJ. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit Care Med* 1995; 23:1638-1652
- 135 Martin C, Saux P, Mege JL, Perrin G, Papazian L, Gouin F. Prognostic values of serum cytokines in septic shock. *Intensive Care Med* 1994;20:272-277
- 136 Martin C, Viviani X, Leone M, Thirion X. Effect of norepinephrine on the outcome of septic shock. *Crit Care Med* 2000;28:2758-2765
- 137 McBride WT, McBride SM. The balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in cardiac surgery. *Curr Opin Anaesthesiol* 1998;11:15-22
- 138 McLeod G, Dick J, Wallis C, Patterson A, Cox C, Colvin J. Propofol 2% in critically ill patients: effect on lipids. *Crit Care Med* 1997;25:1976-1981
- 139 Meier-Hellmann A. Katecholamintherapie in der Sepsis. *Anaesthesist* 2000;49:1069-1076
- 140 Meier-Hellmann A, Bredle DL, Specht M, Spies C, Hannemann L, Reinhart K. The effects of low-dose dopamine on splanchnic blood flow and oxygen uptake in patients with septic shock. *Intensive Care Med* 1997;23:31-37
- 141 Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 1998;332:281-292
- 142 Menger FM, Keiper JS. Chemistry and physics of giant vesicles as biomembrane models. *Curr Opin Chem Biol.* 1998;2:726-732

- 143 Mi WD, Sakai T, Singh H. Hypnotic endpoints vs. the bispectral index, 95% spectral edge frequency and median frequency during propofol infusion with or without fentanyl. *Eur J Anaesthesiol* 1999 ;16:47-52
- 144 Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K, Shiga M, Maekawa N, Obara H, Niwa Y. Propofol inhibits human neutrophil functions. *Anesth Analg* 1998;87:695-700
- 145 Mitov IG, Kropec A, Benzing A, Just H, Garotta G, Galanos C, Freudenberg M. Differential cytokine production in stimulated blood cultures from intensive care patients with bacterial infections. *Infection* 1997;25:206-212
- 146 Monneret G, Elmenkouri N, Bohe J, Debard AL, Gutowski MC, Bienvenu J, Lepape A. Analytical requirements for measuring monocytic human lymphocyte antigen DR by flow cytometry: application to the monitoring of patients with septic shock. *Clin Chem* 2002;48:1589-1592
- 147 Monneret G, Lepape A, Voirin N, Bohe J, Venet F, Debard AL, Thizy H, Bienvenu J, Gueyffier F, Vanhems P. Persisting low monocyte human leukocyte antigen-DR expression predicts mortality in septic shock. *Intensive Care Med* 2006;32:1175-1183
- 148 Moudgil GC, Allan RB, Russell RJ, Wilkinson PC. Inhibition, by anaesthetic agents, of human leucocyte locomotion towards chemical attractants. *Br J Anaesth* 1977;49:97-105
- 149 Muller Kobold AC, Tulleken JE, Zijlstra JG, Sluiter W, Hermans J, Kallenberg CG, Cohen Tervaert JW. Leukocyte activation in sepsis; correlations with disease state and mortality. *Intensive Care Med* 2000;26:883-892
- 150 Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Blériot JP, Cavaillon JM. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 1991;88:1747-1754
- 151 Murdoch S, Cohen A. Intensive care sedation: a review of current British practice. *Intensive Care Med* 2000;26:922-928
- 152 **N**eugebauer E, Lefering R. Scores. In: Burchardi H, Larsen R, Schuster HP, Suter PM (Hrsg). *Intensivmedizin*, 8. Aufl., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2001, 81-94
- 153 Nevriere R, Mathieu D, Chagnon JL, Lebleu N, Wattel F. The contrasting effects of dobutamine and dopamine on gastric mucosal perfusion in septic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1684-1688
- 154 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* 1998;86:159-165
- 155 Nuytinck HK, Offermans XJ, Kubat K, Goris JA. Whole-body inflammation in trauma patients. An autopsy study. *Arch Surg* 1988;123:1519-1524
- 156 **O**'Donnell NG, McSharry CP, Wilkinson PC, Asbury AJ. Comparison of the inhibitory effect of propofol, thiopentone and midazolam on neutrophil polarization in vitro in the presence or absence of human serum albumin. *Br J Anaesth* 1992;69:70-74

- 157 O'Dwyer ST, Michie HR, Ziegler TR, Revhaug A, Smith RJ, Wilmore DW. A single dose of endotoxin increases intestinal permeability in healthy humans. *Arch Surg* 1988;123:1459-1464
- 158 Ogata M, Okamoto K, Kohriyama K, Kawasaki T, Itoh H, Shigematsu A. Role of interleukin-10 on hyporesponsiveness of endotoxin during surgery. *Crit Care Med* 2000;28:3166-3170
- 159 Oldenhof H, de Jong M, Steenhoek A, Janknegt R. Clinical pharmacokinetics of midazolam in intensive care patients, a wide interpatient variability? *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1988;43:263-269
- 160 **P**ark SK, Brody JI. Suppression of immunity by phenobarbital. *Nat New Biol* 1971;233:181-182
- 161 Pascual C, Karzai W, Meier-Hellmann A, Bredle DL, Reinhart K. A controlled study of leukocyte activation in septic patients. *Intensive Care Med* 1997;23:743-748
- 162 Passlick B, Flieger D, Ziegler-Heibroch HWL. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989;74:2527-2534
- 163 Pinner RW, Teutsch SM, Simonsen L, Klug LA, Graber JM, Clarke MJ, Berkelman RL. Trends in infectious diseases mortality in the United States. *JAMA* 1996;275:189-193
- 164 Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, Alegre M, Kahn RJ, Dupont E. Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest* 1993;103:565-575
- 165 Pirttikangas CO, Perttala J, Salo M. Propofol emulsion reduces proliferative responses of lymphocytes from intensive care patients. *Intensive Care Med* 1993;19:299-302
- 166 Pirttikangas CO, Perttala J, Salo M, Vainio O, Liukko-Sipi S. Propofol infusion anaesthesia and immune response in minor surgery. *Anaesthesia* 1994;49:13-16
- 167 Pittet D, Rangel-Frausto S, Li N, Tarara D, Costigan M, Rempe L, Jebson P, Wenzel RP. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Intensive Care Med* 1995;21:302-309
- 168 Ploder M, Pelinka L, Schmuckenschlager C, Wessner B, Ankersmit HJ, Fuerst W, Redl H, Roth E, Spittler A. Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production and not monocyte human leukocyte antigen-DR expression is correlated with survival in septic trauma patients. *Shock* 2006;25:129-134
- 169 Polderman KH, Jorna EM, Girbes AR. Inter-observer variability in APACHE II scoring: effect of strict guidelines and training. *Intensive Care Med* 2001;27:1365-1369
- 170 Ponce de León-Rosales S, Molinar-Ramos F, Domínguez-Cherit G, Rangel-Frausto MS, Vázquez-Ramos VG. Prevalence of infections in intensive care units in Mexico: a multicenter study. *Crit Care Med* 2000;28:1316-1321
- 171 Prien T, Reinhardt C. Die geschichtliche Entwicklung der Intensivmedizin in Deutschland, Zeitgenössische Betrachtungen. *Anaesthesist* 2000;49:130-139

- 172 Pschyrembel klinisches Wörterbuch. Hildebrandt H (ed). 258. Aufl. Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York 1998
- 173 **R**amsay MA, Savege TM, Simpson BR, Goodwin R. Controlled sedation with alphaxalone-alphadolone. *Br Med J* 1974;2:656-659
- 174 Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, Volk HD. Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J Exp Med* 1995;181:1887-1892
- 175 Rangel-Frausto S, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *JAMA* 1995;273:117-123
- 176 Redl H, Nikolai A, Kneidinger R, Schlag G. Endothelial and leukocyte activation in experimental polytrauma and sepsis. *Behring Inst Mitt* 1993;92:218-228
- 177 Redl HR, Aderem A, Beutler BA, Calandra T, Mira JP, Ulevitch R. Clinical expert round table discussion (session 1) at the Margaux Conference on Critical Illness: innate immunity: host recognition of and sensitivity to bacterial components. *Crit Care Med* 2001;29 Suppl:S19-20
- 178 Reinhart K, Hüttemann E, Meier-Hellmann A. Sepsis. In: Burchardi H, Larsen R, Schuster HP, Suter PM (Hrsg). *Intensivmedizin*, 8. Aufl., Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2001, 995-1022
- 179 Reinhart K, Wiegand-Lohnert C, Grimminger F, Kaul M, Withington S, Treacher D, Eckart J, Willatts S, Bouza C, Krausch D, Stockenhuber F, Eiselstein J, Daum L, Kempeni J. Assessment of the safety and efficacy of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody-fragment, MAK 195F, in patients with sepsis and septic shock: a multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-ranging study. *Crit Care Med* 1996;24:733-742
- 180 Rensing H, Bauer M. Multiorganversagen: Mechanismen, klinische Manifestation und Therapiestrategien. *Anaesthesist* 2001;50:819-841
- 181 Roche Diagnostics GmbH. Instruction Manual h-Interleukin-10 ELISA, 1999
- 182 Roche Diagnostics GmbH. Instruction Manual h-Interleukin-6 ELISA, 1999
- 183 Roche Diagnostics GmbH. Instruction Manual h-Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  ELISA, 1999
- 184 Rodriguez JL, Miller CG, Garner WL, Till GO, Guerrero P, Moore NP, Corridore M, Normolle DP, Smith DJ, Remick DG. Correlation of the local and systemic cytokine response with clinical outcome following thermal injury. *J Trauma* 1993;34:684-694
- 185 Rodríguez-Gaspar M, Santolaria F, Jarque-López A, González-Reimers E, Milena A, de la Vega MJ, Rodríguez-Rodríguez E, Gómez-Sirvent JL. Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients. *Cytokine* 2001;15:232-236
- 186 Roerig DL, Kotrly KJ, Vucins EJ, Ahlf SB, Dawson CA, Kampine JP. First pass uptake of fentanyl, meperidine, and morphine in the human lung. *Anesthesiology*. 1987 Oct;67:466-472

- 187 Rossano F, Tufano R, Cipollaro de L'Ero G, Servillo G, Baroni A, Tufano MA. Anesthetic agents induce human mononuclear leucocytes to release cytokines. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992;14:439-450
- 188 Rothe G. Zelluläres Immunmonitoring von Monozyten nach Trauma und bei Sepsis. *Anästhesiol Intensivmed* 1999;40:24-27
- 189 **S**alo M, Pirttikangas CO, Pulkki K. Effects of propofol emulsion and thiopentone on T helper cell type-1/type-2 balance in vitro. *Anaesthesia* 1997 Apr;52(4):341-4
- 190 Salvo I, de Cian W, Musicco M, Langer M, Piadena R, Wolfler A, Montani C, Magni E. The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 1995;21 Suppl 2:S244-249
- 191 Schmidt M, Lugering N, Pauels HG, Schulze-Osthoff K, Domschke W, Kucharzik T. IL-10 induces apoptosis in monocytes involving the CD95 receptor/ligand pathway. *Eur J Immunol* 2000;30:1769-1777
- 192 Selby P, Hobbs S, Viner C, Jackson E, Jones A, Newell D, Calvert AH, McElwain T, Fearon K, Humphreys J, Shiga T. Tumour necrosis factor in man: clinical and biological observations. *Br J Cancer* 1987;56:803-808
- 193 Schottmüller H. Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verhandl dt Kongress Inn Med* 1914;20:864-876
- 194 Shafer A. Complications of sedation with midazolam in the intensive care unit and a comparison with other sedative regimens. *Crit Care Med* 1998;26:947-56
- 195 Shafer A, Doze VA, White PF. Pharmacokinetic variability of midazolam infusions in critically ill patients. *Critical Care Medicine* 1990;18:1039-1041
- 196 Shaked G, Czeiger D, Dukhno O, Levy I, Artru AA, Shapira Y, Douvdevani A. Ketamine improves survival and suppresses IL-6 and TNF $\alpha$  production in a model of Gram-negative bacterial sepsis in rats. *Resuscitation* 2004;62:237-242
- 197 Shapira L, Takashiba S, Champagne C, Amar S, Van Dyke TE. Involvement of protein kinase C and protein tyrosin kinase in lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production by human monocytes. *J Immunol* 1994;153:1818-1824
- 198 Shapiro BA, Warren J, Egol AB, Greenbaum DM, Jacobi J, Nasraway SA, Schein RM, Spevetz A, Stone JR. Practice parameters for intravenous analgesia and sedation for adult patients in the intensive care unit: an executive summary. *Crit Care Med* 1995;23:1596-1600
- 199 Sheeran P, Hall GM. Cytokines in anaesthesia. *Br J Anaesth* 1997;78:201-219
- 200 Shelly MP, Mendel L, Park GR. Failure of critically ill patients to metabolise midazolam *Anaesthesia* 1987;42:619-626
- 201 Siegel JH, Goodzari S, Guadelupi P, Coleman WP, Malcome D, Blevis S, Frankenfield D, Badellino MC, Boetker T, Duek SD. The host defense to trauma and sepsis: Multiple organe failure as a manifestation of host defense failure disease. In:

- Schlaf G, Redl H (eds) Pathophysiology of shock, sepsis and organ failure. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 626-664
- 202 Siegert G. Laborinformation: Immunphänotypisierung Blutzellen. Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikum Carl Gustav Carius Dresden 2002
- 203 Sipahi T, Pöcan H, Akar N. Effect of various genetic polymorphisms on the incidence and outcome of severe sepsis. *Clin Appl Thromb Hemost* 2006;12:47-54
- 204 Slade MS, Simmons RL, Yunis E, Greenberg LJ. Immunodepression after major surgery in normal patients. *Surgery* 1975;78:363-372
- 205 Smith C, Arregui LM, Promnitz DA, Feldman C. Septic shock in the Intensive Care Unit, Hillbrow Hospital, Johannesburg. *S Afr Med J* 1991;80:181-184
- 206 Smith RA, Baglioni C. The active form of tumor necrosis factor is a trimer. *J Biol Chem* 1987;262:6951-6954
- 207 Snell JJ. Immunität und Narkose. *Berliner Klin Wochenschr* 1903;40:212-220
- 208 Soliman HM, Mélot C, Vincent JL. Sedative and analgesic practice in the intensive care unit: the results of a European survey. *Br J Anaesth* 2001;87:186-192
- 209 Solomkin JS. Antibiotic resistance in postoperative infections. *Crit Care Med* 2001;29:N97-99
- 210 Spittler A, Schiller C, Willheim M, Tempfer C, Winkler S, Boltz-Nitulescu G. IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10 and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis. *Immunology* 1995;85:311-317
- 211 Stahl KD, van Bever W, Janssen P, Simon EJ. Receptor affinity and pharmacological potency of a series of narcotic analgesic, anti-diarrheal and neuroleptic drugs. *Eur J Pharmacol* 1977;46:199-205
- 212 Steinberg BM, Grossi EA, Schwartz DS, McLoughlin DE, Aguinaga M, Bizakis C, Greenwald J, Flisser A, Spencer FC, Galloway AC, Colvin SB. Heparin bonding of bypass circuits reduces cytokine release during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 1995;60:525-529
- 213 Stevenson GW, Hall SC, Rudnick S, Seleny FL, Stevenson HC. The effect of anesthetic agents on the human immune response. *Anesthesiology* 1990;72:542-552
- 214 Stüber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor- $\alpha$  concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996;24:381-384
- 215 Sullivan JS, Kilpatrick L, Costarino AT, Lee SC, Harris MC. Correlation of plasma cytokine elevations with mortality rate in children with sepsis. *J Pediatr* 1992;120:510-515
- 216 Sydow M, Neumann P. Sedation for the critically ill. *Intensive Care Med* 1999;25:634-636

- 217 **T**aniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzaki S, Kurokawa A. Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med* 1999;27:1262-1264
- 218 Taniguchi T, Kanakura H, Yamamoto K. Effects of posttreatment with propofol on mortality and cytokine responses to endotoxin-induced shock in rats. *Crit Care Med* 2002;30:904-907
- 219 Taniguchi T, Shibata K, Yamamoto K. Ketamine inhibits endotoxin-induced shock in rats. *Anesthesiology* 2001;95:928-932
- 220 Taylor NM, Lacoumenta S, Hall GM. Fentanyl and the interleukin-6 response to surgery. *Anaesthesia* 1997;52:112-115
- 221 Teasdale G, Jennet B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 1974;2:81-84
- 222 Terborg C, Schummer W, Albrecht M, Reinhart K, Weiller C, Rother J. Dysfunction of vasomotor reactivity in severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 2001; 27:1231-1234
- 223 Tønnesen E, Wahlgreen C. Influence of extradural and general anaesthesia on natural killer cell activity and lymphocyte subpopulations in patients undergoing hysterectomy. *Br J Anaesth* 1988;60:500-507
- 224 Tracy KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: An updated review of its biology. *Crit Care Med* 1993;21:S415-S422
- 225 Tran DD, Groeneveld AB, van der Meulen J, Nauta JJ, Strack van Schijndel RJ, Thijs LG. Age, chronic disease, sepsis, organ system failure, and mortality in a medical intensive care unit. *Crit Care Med* 1990;18:474-479
- 226 Tsujimoto H, Ono S, Hiraki S, Majima T, Kawarabayashi N, Sugasawa H, Kinoshita M, Hiraide H, Mochizuki H. Hemoperfusion with polymyxin B-immobilized fibers reduced the number of CD16+ CD14+ monocytes in patients with septic shock. *J Endotoxin Res* 2004;10:229-237
- 227 Tung A, Rosenthal M. Patients requiring sedation. *Crit Care Clin* 1995;11:791-803
- 228 **U**levitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995;13:437-457
- 229 Unertl K, Kottler BM. Prognostische Scores in der Intensivmedizin. *Anaesthesist* 1997;46: 471-480
- 230 **V**an den Berghe G, de Zegher F. Anterior pituitary function during critical illness and dopamine treatment. *Crit Care Med* 1996;24:1580-1590
- 231 van der Poll T, Coyle SM, Barbosa K, Braxton CC, Lowry SF. Epinephrine inhibits tumor necrosis factor- $\alpha$  and potentiates interleukin 10 production during human endotoxemia. *J Clin Invest* 1996;97:713-719

- 232 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* 1994;62:2046-2050
- 233 van der Poll T, Levi M, Hack CE, ten Cate H, van Deventer SJ, Eerenberg AJ, de Groot ER, Jansen J, Gallati H, Buller HR, ten Cate JW, Aarden LA. Elimination of interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med* 1994;179:1253-1259
- 234 van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, Kwappenberg K, Frolich M. Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* 1998;351:950-953
- 235 Venet C, Zeni F, Viallon A, Ross A, Pain P, Gery P, Page D, Vermesch R, Bertrand M, Rancon F, Bertrand JC. Endotoxaemia in patients with severe sepsis or septic shock. *Intensive Care Med* 2000;26:538-544
- 236 Veterans Administration Systemic Sepsis Cooperative Study Group. The effect of high-dose corticosteroids in patients with septic shock. *N Engl J Med* 1987;317:659-665
- 237 Vincent JL, Bihari D. Sepsis, severe sepsis or sepsis syndrom: need for clarification. *Intensive Care Med* 1992;18:255-257
- 238 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* 1996;22:707-710
- 239 Vinik HR, Reves JG, Greenblatt DJ, Abernethy DR, Smith LR. The pharmacokinetics of midazolam in chronic renal failure patients. *Anaesthesiology* 1983;59:390-394
- 240 Volk HD, Lohmann T. Decrease of the proportion of HLA-DR+ monocytes as prognostic parameter for the clinical outcome of septic disease, in: *Immunotherapeutic prospects of infectious disease*, K.N. Masihi and W. Lange, Editor. 1990, Springer: Berlin Heidelberg New York.
- 241 Volk HD, Reinke P, Krausch D, Zuckermann H, Asadullah K, Muller JM, Docke WD, Kox WJ. Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis. *Intensive Care Med* 1996;22:S474-481
- 242 Vree TB, Shimoda M, Driessen JJ, Guelen PJM, Janssen TJ, Termond EFS, van Dalen R, Hafkenscheid JCM, Dirksen MSC. Decreased plasma albumin concentration results in increased volume of distribution and decreased elimination of midazolam in intensive care patients. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 1989;46:537-544
- 243 **W**akefield CH, Carey PD, Foulds S, Monson JR, Guillou PJ. Changes in major histocompatibility complex class II expression in monocytes and T cells of patients developing infection after surgery. *Br J Surg*, 1993;80:205-209
- 244 Walton B. Effects of anaesthesia and surgery on immune status. *Br J Anaesth* 1979;51:37-43

- 245 Walz MK, Eigler FW. Methodik der Punktionstracheostomie. *Chirurg* 1996;67:436-443
- 246 Waters CM, Avram MJ, Krejcie TC, Henthorn TK. Uptake of fentanyl in pulmonary endothelium. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;288:157-163
- 247 Weerwind PW, Maessen JG, van Tits LJ, Stad RK, Fransen EJ, de Jong DS, Penn OC. Influence of Duraflo II heparin-treated extracorporeal circuits on the systemic inflammatory response in patients having coronary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:1633-1641
- 248 Wenzel RP. The mortality of hospital-acquired blood stream infections: need for a new vital statistic? *Int J Epidemiol* 1988;17:225-227
- 249 West MA, LeMieur T, Clair L, Bellingham J, Rodriguez JL. Protein kinase C regulates macrophage tumor necrosis factor secretion: Direct protein kinase C activation restores tumor necrosis factor production in endotoxin tolerance. *Surgery* 1997;122:204-212
- 250 Westaby S. Organ dysfunction after cardiopulmonary bypass. A systemic inflammatory reaction initiated by the extracorporeal circuit. *Intensive Care Med* 1987;13:89-95
- 251 Whelan P, Morris PJ. Immunological responsiveness after transurethral resection of the prostate: general versus spinal anaesthetic. *Clin Exp Immunol* 1982;48:611-618
- 252 Wilhelm W. AN01-Handbuch: Behandlungsstandards und Therapieprotokolle für die Intensivstation. Eigendruck, Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Universitätskliniken des Saarlandes, 1999
- 253 Wilhelm W, Grundmann U, Rensing H, Werth M, Langemeyer J, Stracke C, Bauer M. Monocyte deactivation in severe human sepsis or following cardiopulmonary bypass. *Shock* 2002;17:354-360
- 254 Wilson BMG, Severn A, Rapson NT, Chana J, Hopkins P. A convenient human whole blood culture system for studying the regulation of tumor necrosis factor release by bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol Methods* 1991;139:233-240
- 255 Wilson CS, Seatter SC, Rodriguez JL, Bellingham J, Clair L, West MA. In vivo endotoxin tolerance: impaired LPS-stimulated TNF release of monocytes from patients with sepsis, but not SIRS. *J Surg Res* 1997;69:101-106
- 256 Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990;249:1431-1433
- 257 Wolczyn FG, Krappmann D, Scheidereit C. The NF $\kappa$ B/Rel and I $\kappa$ B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 1996;74:749-769
- 258 **Y**oung C, Knudsen N, Hilton A, Reves JG. Sedation in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2000;28:854-866
- 259 **Z**iegenfuß T, Wanner GA, Grass C, Bauer I, Schuder G, Kleinschmidt S, Menger MD, Bauer M. Mixed agonistic-antagonistic cytokine response in whole blood from

- patients undergoing abdominal aortic aneurysm repair. *Intensive Care Med* 1999;25:279-287
- 260 Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH. Metoclopramide: a novel and safe immunomodulating agent for restoring the depressed macrophage immune function after hemorrhage. *J Trauma* 1998;44:70-77
- 261 Ziegler S, Kleinschmidt S, Collard CD. Genpolymorphismen beim Intensivpatienten: Ist der Krankheitsverlauf vorbestimmt? *Anaesthesist* 2004;53:213-227
- 262 Ziegler E. *Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der pathologischen Anatomie*. Fischer, Jena 1905
- 263 Ziegler-Heitbrock HW, Passlick B, Flieger D. The monoclonal antimonocyte antibody My4 stains B lymphocytes and two distinct monocyte subsets in human peripheral blood. *Hybridoma* 1988;7:521-527
- 264 Zweigner J, Gramm HJ, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR. High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood* 2001;98:3800-3808

## 7 DANKSAGUNG

Dem Direktor der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie der Universität des Saarlandes, Prof. Dr. R. Larsen, danke ich für die Möglichkeit zur wissenschaftlichen Arbeit im Labor der Klinik.

Für die Überlassung des Promotionsthemas, für die Unterstützung bei der experimentellen Durchführung der Versuche und für die stete Hilfe und Beratung bei der Abfassung der vorliegenden Arbeit danke ich Frau Priv.-Doz. Dr. I. Bauer.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Priv.-Doz. Dr. W. Wilhelm sowie Herrn Prof. Dr. M. Bauer für die Beratung und Betreuung.

Außerdem danke ich Herrn Dip.-Math. Dr. Th. Georg vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik für die Unterstützung bei der statistischen Ausarbeitung der Ergebnisse.

## 8 LEBENSLAUF

### Persönliche Daten

Name: Luedtke  
Vorname: Jan Clinton Moritz  
Geburtsdatum: 28. September 1975  
Geburtsort: Freiburg im Breisgau  
Familienstand: verheiratet

### Schulbildung

1982-1986 St.-Ursula Grundschule in Lüneburg  
1986-1988 Orientierungsstufe Stadtmitte in Lüneburg  
1988-1996 Gymnasium Wilhelm-Raabe-Schule in Lüneburg  
1993-1994 Clear-Brook-High-School in Houston, Texas

### Studium

1996-2003 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Homburg/Saar

### Beruflicher Werdegang

2003-2004 Arzt im Praktikum an der urologischen Universitätsklinik in Homburg/Saar  
seit 2005 Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung des Städtischen Klinikums Neunkirchen

### Publikationen

2006 Bauer I, Bauer M, Raddatz A, **Luedtke C**, Werth M, Silomon M, Rensing H, Wilhelm W. Einfluss des Geschlechts auf die stimulierbare Zytokinantwort bei Patienten mit schwerer Sepsis. Anaesthesist 2006;55:515-527

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACCP	American College of Chest Physicians
ACT	activated clotting time
ANOVA	analysis of variance
APACHE	acute physiology and chronic health evaluation
ASA	American Society of Anesthesiologists
BIPAP	biphasic positive airway pressure
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CARS	compensatory anti-inflammatory response syndrome
CCS	Canadian Cardiovascular Society
CD	cluster of differentiation
CP	Corynebacterium parvum
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
EK	Erythrozytenkonzentrat
EKZ	extrakorporale Zirkulation
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
FLI	Floureszenzintensität
GCS	Glasgow-Coma-Score
(s)GOT	(Serum)-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
HLA	human leukocyte antigen
HLM	Herzlungenmaschine
HWZ	Halbwertzeit

---

HZV	Herzzeitvolumen
ID	Identifikationsnummer
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B	inhibitorisches Protein $\kappa$ B
IL	Interleukin
ISS	injury severity score
KG	Körpergewicht
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
MARS	mixed antagonistic response syndrome
MCP	monocyte chemoattractant protein
MFI	mittlere Fluoreszenzintensitäten
MHC	major histocompatibility complex
MIP	monocyte inflammatory protein
MOD-Score	multiple organ dysfunction score
MOF-Score	multiple organ failure score
MPS	mononukleäres phagozytierendes System
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF- $\kappa$ B	nukleärer Faktor $\kappa$ B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NNR	Nebennierenrinde
NYHA	New York Heart Association
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PEEP	positive endexpiratory pressure
PGE2	Prostaglandin E2
PKC	Proteinkinase C
PTK	Proteintyrosinkinase

PTP	Proteintyrosinphosphatase
RR	Blutdruck nach Riva-Rocci
SAC-I	Staphylokokkus aureus Cowan strain-I-Lysat
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SEM	standard error of the mean
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SOFA-Score	sepsis-related organ failure assessment score
SV	Schlagvolumen
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
T <sub>H1</sub>	T-Helferzellen vom Typ 1
T <sub>H2</sub>	T-Helferzellen vom Typ 2
TIVA	totale intravenöse Anästhesie
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TNFR	TNF-Rezeptor
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil