

Die Rolle der Apoptose von zirkulierenden Leukozyten bei Patienten mit schwerer Sepsis

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Stefan Müller
aus Aachen

2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. F. Stüber
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ch. Wirtz

Tag der Mündlichen Prüfung: 14. 12. 2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Universitätsklinik
Bonn
Prof. Dr. med. A. Hoefft

Meinen beiden Eltern in Dankbarkeit

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis.....	5
2	Abkürzungen.....	6
3	Einleitung.....	7
3.1	Sepsis.....	7
3.1.1	Epidemiologie.....	7
3.1.2	Definitionen der Sepsis.....	8
3.1.3	Immunpathogenese.....	8
3.2	Apoptose.....	9
3.2.1	Apoptose in der Sepsis.....	12
3.3	Fragestellung.....	12
4	Methodik.....	13
4.1	Einschlusskriterien für Patienten.....	13
4.2	Klinische Datenerhebung.....	14
4.3	Geräte/Chemikalien.....	14
4.3.1	Geräte:.....	14
4.3.2	Chemikalien:.....	15
4.4	Durchflusszytometrie.....	16
4.4.1	Einführung.....	16
4.4.2	Analysenablauf.....	19
4.4.2.1	Phosphatidylserinfärbung.....	19
4.4.2.2	Färbung membranständiger Proteine (FAS, FAS-L).....	20
4.4.2.3	Färbung intrazellulärer Proteine (BCL-2, Kaspase 3).....	20
4.4.3	Standardisierung.....	21
4.5	Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA).....	21
4.6	Statistik.....	21
5	Ergebnisse.....	22
5.1	Klinische Daten.....	22
5.1.1	Laborwerte.....	25
5.2	Apoptoseparameter.....	26
5.2.1	Phosphatidylserin Externalisierung.....	26
5.3	FAS-Rezeptor.....	28
5.4	FAS-Ligand.....	29
5.5	BCL-2.....	30
5.6	Kaspase 3.....	32
5.7	Nukleosomen-Konzentrationen.....	34
6	Diskussion.....	36
6.1	Apoptose.....	36
6.2	Signaltransduktionswege.....	37
6.3	Unterschiede in den Leukozyten-Subpopulationen.....	39
6.4	Möglichkeiten und Folgen einer Veränderung der Apoptoserate.....	39
7	Zusammenfassung.....	41
8	Literatur.....	42
9	Danksagung.....	47

2 Abkürzungen

Sofern im Text nicht direkt genannt oder eindeutig bekannt, sind folgende Abkürzungen verwandt worden, Aufzählung gemäß erscheinen:

AIDS - A cquired I mmune D eficiency S yndrome	SIRS - s ystemic i nflammatory r esponse s yndrome
TNM – T umor, N odes (Lymphknoten), M etastasen (internationales Tumorklassifikationssystem)	PIRO - P steht für P rädisposition, I für die Art und Ausdehnung des primären I nсульта, also im Fall der Sepsis der primären Infektion, R für Art und Ausmaß der Wirtsantwort (host response) und O für das Ausmaß entstehender O rgandysfunktion – Schema zur Stratifizierung der Sepsispatienten
TNF – T umor N ekrose F aktor	FAS – F ibroblasten- a ssoziiert
FAS-L – FAS- L igand	Mo - M akrophagen
T _H - T- H elfer-Zellen	NK – n atürliche K illerzellen
CD – C luster of d ifferentiation - immunphänotypische Oberflächenmerkmale von Zellen	FiO ₂ – F raktion der i nspiratorischen S auerstoffkonzentration
PEEP – p ositive e nd- e xpiratory p ressure	PaO ₂ – arterieller Sauerstoffpartialdruck
pH - p ondus H ydrogenii	GOT - G lutamat- O xalacetat- T ransaminase (neuer - Aspartat-Aminotransferase - AST, ASAT)
HCO ₃ - Hydrogencarbonat	FACS - f luorescence a ctivated c ell s orting
PS ⁺ - P hosphatidylserin positiv	SSC - S idwards S catter, Seitwärtsstreulicht
FSC - F orward S catter, Vorwärtsstreulicht	FITC - F luorescein- I sothiocyante
FL1-3 – Fluoreszenzlicht 1-3	PerCP - P eridinin C hlorophyll- α P rotein
PE - P hycoerythrin	PBS - p hosphate b uffered s aline
BCL 2 - B -cell L ymphoma 2	LFU – „linear fluorescence unit“, lineare Fluoreszenzeinheit
MFI – m ittlere F luoreszenzintensität	

3 Einleitung

Die Sepsis wird in der Intensivmedizin immer bedeutender, doch ist das Verständnis der Pathomechanismen nur bruchstückhaft. Der Verlust der Immunkompetenz ist bereits früh (4) beschrieben worden, doch sind die Gründe und Wege dorthin bisher nicht ganz geklärt. Hier möchte die vorliegende Arbeit für einen Teilbereich ein wenig Klarheit schaffen.

3.1 Sepsis

3.1.1 Epidemiologie

Sepsis ist eine der Haupttodesursachen bei Intensivpatienten und stellt damit ein großes ungelöstes Problem der operativen Intensivmedizin dar. Trotz vieler Weiterentwicklungen auf dem Gebiet der Intensivmedizin, beispielsweise im Rahmen der spezifischeren Antibiotikatherapie, verbessertem Beatmungsmanagement, verbessertes Kreislaufmonitoring und vieles mehr, hat sich die Letalität der Sepsis (20-80%) in den letzten Jahren nicht wesentlich geändert (3;9). Nach einer epidemiologischen Studie zur Häufigkeit der Sepsis traten in den USA im Jahr 1995 insgesamt 751.000 Fälle schwerer Sepsis auf deren Mortalität durchschnittlich bei 28,6% (ca. 215.000 Todesfälle/Jahr) lag (2). Für Deutschland existieren bisher keine genauen epidemiologischen Daten. Die deutsche Sepsis Gesellschaft nimmt 160.000 Erkrankungsfälle jährlich an, hiervon müssen 63.000 schwere Fälle auf Intensivstationen behandelt werden. Die durch Sepsis verursachten Behandlungskosten in Deutschland sind enorm und erreichen durchschnittliche Fallkosten von ca. 24.000 €, was einer jährlichen Belastung für das Gesundheitssystem von 1 bis 2,2 Milliarden € entspricht (36). Diese Kosten machen damit 19-42% der Gesamtkosten der Intensivmedizin in Deutschland aus. Legt man die in den USA erhobenen und für Deutschland geschätzten Zahlen der Inzidenz der Sepsis mit 150-300 Fällen pro 100.000 Einwohner zugrunde, fällt auf, dass die Sepsisinzidenz in der gleichen Größenordnung oder deutlich höher liegt als beispielsweise die Inzidenz von AIDS (17/100.000), von Brustkrebs (112/100.000), von Kolon- und Rektumkarzinom (48/100.000) oder von der Herzinsuffizienz (196/100.000)(12).

Dabei steigt die Inzidenz der Sepsis jährlich um ca. 1,5% an (2). Sepsis ist auf der Liste der Todesursachen unter den zehn häufigsten (nach Angaben des National Center for Health Statistics) und ist damit in seiner Bedeutung für die Gesellschaft dem Myokardinfarkt nur wenig

unterlegen, die öffentliche und fachöffentliche Wahrnehmung der Sepsis ist jedoch vergleichsweise gering.

3.1.2 Definitionen der Sepsis

Das Krankheitsbild der Sepsis ist eine Umschreibung verschiedener Krankheitsverläufe gekennzeichnet durch eine Infektion und Multiorganversagen. Die Multikausalität des Krankheitsbildes erschwert eine eindeutige Zuordnung. Im Rahmen der Konsensus-Konferenz 1991 ist eine klare Definition verfügbar geworden(8), welche 2001 aktualisiert wurde (32), danach unterscheidet man dabei das systemische inflammatorische Syndrom (systemic inflammatory response syndrom, SIRS) von der schweren Sepsis. In der schweren Sepsis liegt definitionsgemäß ein SIRS mit bakteriellem Erregernachweis (oder Verdacht) und Dysfunktion mindestens zweier Organsysteme vor. Kommt es dabei zu einem Kreislaufversagen, spricht man von einem septischen Schock (8). Im klinischen Alltag sind die genannten Kriterien nicht unbedingt hilfreich. So haben in den letzten Jahren neuere Erkenntnisse über die Pathophysiologie der Sepsis dazu beigetragen, dem phasenhaften Verlauf der Inflammation mit einer überschießenden, aber auch paralyisierten Immunantwort Rechnung zu tragen und derzeit wird an einer Weiterentwicklung der Konsensuskriterien und Definitionen der Sepsis gearbeitet (7). Für die Zukunft stellt dabei, ein der TNM-Klassifikation ähnliches, den stadienhaften Verlauf der Sepsis besser berücksichtigendes Modell – das sogenannte PIRO-Modell – einen vielversprechenden Ansatz dar (32). Die Buchstaben von PIRO stehen hierbei für „predisposition“, „insult“ oder „infection“, „response“ und „organ dysfunction“.

3.1.3 Immunpathogenese

Unter normalen Umständen reguliert der Körper die Entzündungsantwort durch Produktion pro- und antiinflammatorischer Mediatoren in einem ausgeglichenen Maß. In der Sepsis kommt es jedoch zum Versagen der körpereigenen Regulationskapazität („host defense failure“). Hierbei besteht eine Wechselbeziehung der Inflammationskaskade mit der Aktivierung des Gerinnungssystems (11). Hinzu kommt die erhöhte Gefäßpermeabilität (50), diese führt dann vergesellschaftet mit einer Vasodilatation zu einer lebensbedrohlichen Hypotension. Schwere Sepsis ist definiert durch die Dysfunktion mindestens zweier großer Organsysteme oder einer

unerklärlichen metabolischen Azidose (22). Die hierbei freigesetzten Aktivatoren verstärken die Inflammation zusätzlich. So kommt es zu einer überschießenden antiinflammatorischen Immunantwort, als Folge einer unkontrollierten systemischen Entzündungsreaktion (40). In frühem sowie fortgeschrittenem Stadium kann diese fulminante antiinflammatorische Gegenregulation zu einer Immunsuppression mit ungenügender Infektabwehr, Gewebsschädigung, Multiorganversagen und letztlich zum Tod des Patienten führen (16).

Im Zusammenhang mit der Immunologie der Sepsis rückt in jüngster Zeit der programmierte Zelltod (Apoptose) von Leukozyten in das Zentrum des Interesses. In Tiermodellen wurde entdeckt, dass Sepsis die Apoptose von Zellen des Immunsystems induziert (4;16).

Untersuchungen in jüngster Zeit zeigen, dass dies auch für den Menschen zutrifft (18). Danach aktivieren Leukozyten während der Sepsis in gesteigertem Maße ein „Selbstmordprogramm“, an dem sie zugrunde gehen. Die Tatsachen, dass Hemmung der Apoptose im Mausmodell das Überleben einer Sepsis drastisch verbessert (20), legt den Schluss nahe, dass Apoptose in die Immunopathogenese der Sepsis involviert ist. Obwohl bislang beim Menschen keine umfassenden Untersuchungen hinsichtlich der Apoptose von Lymphozyten bei der Sepsis vorliegen, wird über mögliche neue Ansätze der immunmodulatorischen Therapie spekuliert (14;16;21;39).

3.2 Apoptose

Der Begriff „Apoptose“ wurde 1972 von Kerr et al. für eine Art des programmierten Zelltodes mit bestimmten Charakteristika eingeführt (24). Im Rahmen des hier beobachteten Zelltodes kommt es nicht zu einem Anschwellen der Zelle und Zerstörung der Zellorganellen, vielmehr kommt es zu einer Kern-Pyknose und einer Verringerung des Zellvolumens. An der Zellmembran ist ein Abschnürung membranumschlossener Vesikel – die so genannte Zeiose (31) – zu beobachten. Des weiteren schnüren sich apoptotische Körperchen von den betroffenen Zellen ab und bilden die so bezeichneten apoptotischen Körperchen – apoptotic bodies. Dieser Zelluntergang ist selektiv, betrifft im Gegensatz zur Nekrose, nur einzelne Zellen eines Gewebes und ist ein kontrollierter Vorgang. Der programmierte Zelltod ist damit unter anderem eine Möglichkeit des Körpers Wachstumsvorgänge, beispielsweise im Rahmen der pränatalen Gehirnentwicklung, zu steuern. Täglich bildet der menschliche Organismus ca. 60×10^9 Zellen neu, werden im Rahmen der Entwicklung bestimmten Zellen nicht mehr benötigt, ist der

programmierte Zelltod eine Möglichkeit diese zielgenau zu entfernen. Pro Tag werden ca. 100

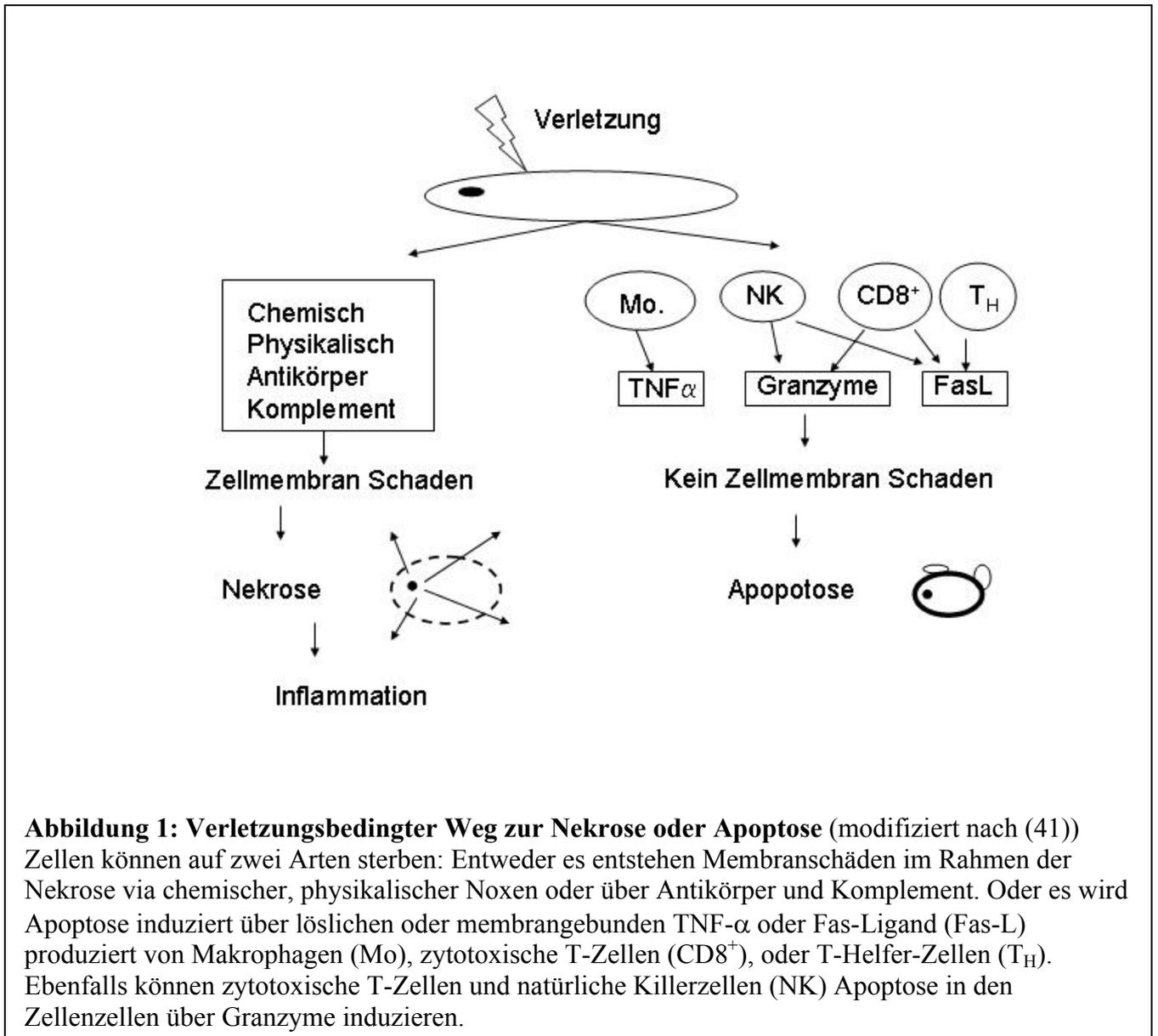


Abbildung 1: Verletzungsbedingter Weg zur Nekrose oder Apoptose (modifiziert nach (41))
 Zellen können auf zwei Arten sterben: Entweder es entstehen Membranschäden im Rahmen der Nekrose via chemischer, physikalischer Noxen oder über Antikörper und Komplement. Oder es wird Apoptose induziert über löslichen oder membrangebundenen TNF- α oder Fas-Ligand (Fas-L) produziert von Makrophagen (Mo), zytotoxische T-Zellen (CD8⁺), oder T-Helfer-Zellen (T_H). Ebenfalls können zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen (NK) Apoptose in den Zellenzellen über Granzyme induzieren.

Millionen neutrophile Granulozyten via Apoptose eliminiert (28). Vor allem im Rahmen der Reifung in den primären und sekundären Lymphorganen gehen viele Zellen wieder zugrunde.

In der Zelle existieren präformierte Signalaufnehmer und Signaltransduktionswege, die den Prozess der Apoptose vermitteln können. Auf der Zelloberfläche liegen bei vielen Zelltypen Apoptoserezeptoren vor, zu denen der Fas-Rezeptor, der TNF-Rezeptor α und andere Rezeptoren gehören. Zu diesen gehören eine intrazelluläre sogenannte „Todesdomäne“, welche den Signaltransduktionsweg innerhalb der Zelle weiterleitet. Im Zuge der Aktivierung dieser Domäne wird das Signal auf Cystein-Aspartat-Proteasen, die Kaspasen, übertragen, welche ihrerseits

wiederum andere Prokaspasen durch Spaltung in den aktiven Zustand überführen. Schließlich werden Effektor-kaspasen, insbesondere Kaspase 3, aktiviert, die struktur- und funktionsrelevante Biomoleküle spalten und somit inaktivieren um so den Zelltod herbeizuführen(39). Als Verstärker und Alternativweg der Apoptose ist das Mitochondrium involviert. Dabei gelangt Cytochrom C aus dem Mitochondrium in das Zytosol und führt dort im Zusammenwirken mit anderen Faktoren zu einer Aktivierung von Kaspasen(43).

Die Vorgänge der Apoptose markieren die Zelle außerdem mit bestimmten Membranmolekülen (z.B. Phosphatidylserin) für Makrophagen. Dies geschieht folgendermaßen: Nach nicht vollständig geklärten Vorgängen werden in der frühen Apoptose (siehe Abbildung 2) Phosphatidylserinmoleküle externalisiert. Jene Moleküle sind in der gesunden Zelle nur an der Membrannenseite expremiert. Wird eine Zelle jedoch beispielsweise im Rahmen von akutem Sauerstoffmangel nekrotisch, wird die Membranintegrität gestört und es bilden sich Löcher. So können messtechnisch apoptotische von nekrotischen Zellen, wie weiter unten beschrieben, unterschieden werden.

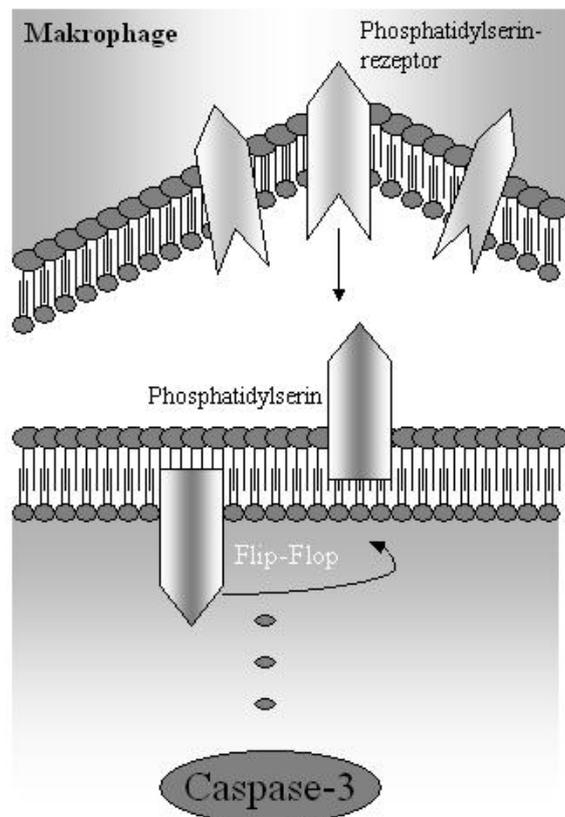


Abbildung 1: Markierung apoptotischer Zellen zur Phagozytose. In der frühen Phase der Apoptose werden in der gesunden Zelle innen exprimierte Phosphatidylserinmoleküle externalisiert. So können Makrophagen apoptotische Zellen phagozytieren, da diese mit einem Rezeptor für Phosphatidylserinmoleküle ausgestattet sind (modifiziert nach (52)).

3.2.1 Apoptose in der Sepsis

Es gibt bereits mehrfache Hinweise, dass Apoptose in peripheren Lymphozyten zur Deaktivierung der Immunfunktion führt((29) (49)) und damit zu einer geringeren Überlebensrate. Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen.

3.3 Fragestellung

1. Tritt in der schweren Sepsis eine vermehrte Apoptoserate bei peripheren Blut-Leukozyten auf?
2. Lassen sich Unterschiede der Apoptose in Subpopulationen dieser Zellen darstellen?
3. Welche Signaltransduktionswege sind während der Apoptose in Leukozyten bei Patienten in der schweren Sepsis herauf- bzw. herunterreguliert?

4 Methodik

4.1 Einschlusskriterien für Patienten

Die Untersuchungen wurden den Grundlagen der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (2000) entsprechend durchgeführt.

Die Studie wurde von der Ethik Kommission der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms Universität geprüft und genehmigt.

In die Studie wurden 16 Patienten mit septischem Krankheitsbild und 10 Patienten der Intensivstation ohne das Krankheitsbild der systemischen Inflammation eingeschlossen, alle Patienten oder ihre Angehörigen willigten in die Untersuchung ein. Es handelte sich bei den Patienten um Fälle aus unterschiedlichen chirurgischen Fachgebieten und verschiedener Krankheitsgenese. Die in die Studie eingeschlossenen septischen Patienten erfüllten alle die Kriterien der schweren Sepsis nach der Konsensus-Konferenz von 1991 (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference, 1991)(8;32). Sie zeigten mindestens 2 der folgenden Symptome, sofern sie keine andere Ursache als die der Sepsis hatten:

- Infektion
- Hypothermie $< 36^{\circ}\text{C}$ oder Hyperthermie $> 38^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz $> 90/\text{min}$
- Atemfrequenz $> 20/\text{min}$ oder CO_2 Partialdruck $< 32 \text{ mmHg}$
- Leukopenie $< 4000/\mu\text{l}$ oder Leukozytose $> 12000/\mu\text{l}$ oder mehr als 10% unreife Zellen

Die Patienten erfüllten zusätzlich die Kriterien der schweren Sepsis, sie litten an Dysfunktionen von mindestens 2 Organsystemen, die sich wie folgt manifestieren:

- Renales System: Kreatinin $> 2 \text{ mg/dl}$
- Hepatobiliäres System: Bilirubin $> 2 \text{ mg/dl}$
- Kardiovaskuläres System: Katecholaminpflichtigkeit
- Pulmonales System: $\text{paO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ (Definition des „acute lung injury“)

Ausschlusskriterien: Alter < 18 Jahre, maligne Grunderkrankung, Schwangerschaft, fehlendes Einverständnis.

Die Kontrollgruppe bestand aus 11 gesunden Probanden.

4.2 Klinische Datenerhebung

Nach steriler Blutentnahme am Tag der Diagnosestellung wurden die Proben innerhalb von 30 Minuten weiterverarbeitet, hier wurden die Proben nach Aliquotierung währenddessen stets auf Eis gelagert. Nicht benötigtes Material wurde bei -80°C eingefroren.

Folgende Vitalparameter wurden parallel zur Probenentnahme protokolliert, woraus im Anschluss die Scores (siehe 5.1) errechnet werden konnten:

Alter, Gewicht, Anzahl und Art der Operation(en), Sepsisdiagnose(n), Glasgow Coma Scale, Länge des stationären Aufenthaltes, Beatmungstage, PEEP, FiO₂, Katecholaminkonzentrationen, systolischer Blutdruck, mittlerer arterieller Blutdruck, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Temperatur, pH-Wert, PaO₂, HCO₃, Natrium, Kalium, Kreatinin, Harnstoff, Blutzucker, Harnmenge, Nierenersatzverfahren, Gesamtbilirubin, GOT, Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit, Leukozytenzahl, neutrophile Leukozyten, segmentierte Leukozyten, basophile Leukozyten, eosinophile Leukozyten, Lymphozyten, Monozyten, Interleukin-6, Procalcitonin.

Der Apapche II – Score (27) setzt sich aus den Bereichen physiologischer Status (bestehend aus Temperatur, Mitteldruck, Herzfrequenz, Oxygenierung, pH, Natrium, Kalium, Kreatinin, Hämatokrit, Leukozyten und Glasgow-Coma-Scale) den Alters Punkten und dem Gesundheitsstatus (operiert, nicht operiert und Notfall-OP) zusammen. In die Berechnung des SAPS II-Score (10) fließen folgende Werte ein: Aufnahmezustand, Chronische Leiden, Glasgow Coma Scale, Alter des Patienten, Syst. Blutdruck, Herzfrequenz, Körpertemperatur, nur bei masch. Beatmung: PaO₂/FiO₂, Ausfuhr Urin, Harnstoff im Serum, Leukozyten, Kalium, Natrium, Bicarbonat, Bilirubin. Aus diesen Werten wird bei verschiedener Gewichtung ein Punktwert erstellt. Der SOFA-Score (10;37;37) setzt sich PaO₂/FiO₂ mit oder ohne Beatmung, Kreatinin und Ausfuhrmenge, Bilirubin, Blutdruck und Katecholaminmenge, Thrombozyten und der Glasgow Coma Scale zusammen.

4.3 Geräte/Chemikalien

4.3.1 Geräte:

Laborfuge 400 R mit Ausschwingrotor (Heraeus, Hanau, Deutschland)

10/100/1000 µl Eppendorf Pippetierhilfen (Hamburg, Deutschland)

Sarstedt Monovetten[®] EDTA (Nümbrecht, Deutschland)

Absaugvorrichtung

FACSCalibur (E 2094) nebst PowerMac G3 und HP DeskJet 1600CM (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Falcon-Röhrchen (12x75 mm) von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)

ELISA-Reader (Bio-Rad, München, Deutschland)

4.3.2 Chemikalien:

PharMLyse™ (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Perm/Wash™ Buffer (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Cytofix/Cytoperm™ (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Hepes/Ca²⁺-Annexin-Bintry-Puffer (2,5mM CaCl₂, 140mM NaCl, 10mM Hepes von Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Quantibrite™ PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

PBS (Phosphate Buffered Saline) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Cell-Death-Detection Kit (Roche, Mannheim, Deutschland)

Folgende Antikörper gegen menschliche Antigene:

Annexin V (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

VIA-Probe (7-AAD) (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

CD 14 PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

CD 3 PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

CD 4 PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

CD 8 PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

CD 19 PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Caspase-3 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Isotype-Control Maus-IgG₁ (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

BCL-2 PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

CD 95 PE (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

CD 4 PerCP (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

CD 8 PerCP (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

CD 19 PerCP (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

CD 14 PerCP (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

CD 4/8/3 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

CD 66b FITC (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

CD 3 FITC (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

Fas-L – CD178 PE von (EuroClone, Wetherby, U.K.)

Trail PE von (EuroClone, Wetherby, U.K.)

4.4 Durchflusszytometrie

4.4.1 Einführung

Die Untersuchungen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie durchgeführt.

Die Durchfluss-/Flowzytometrie ist ein mittlerweile etabliertes Verfahren, Zellen nach ihren Eigenschaften zu sortieren. „Fluorescence activated cell sorting“ (FACS) misst die Fluoreszenz von einzelnen Zellen(23), welche zuvor durch spezifische oder unspezifische fluoreszenzmarkierte Antikörper erzeugt worden sind.

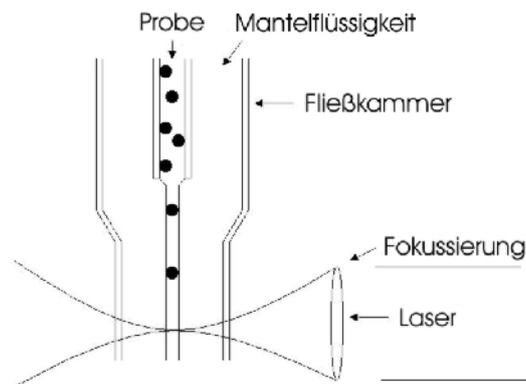
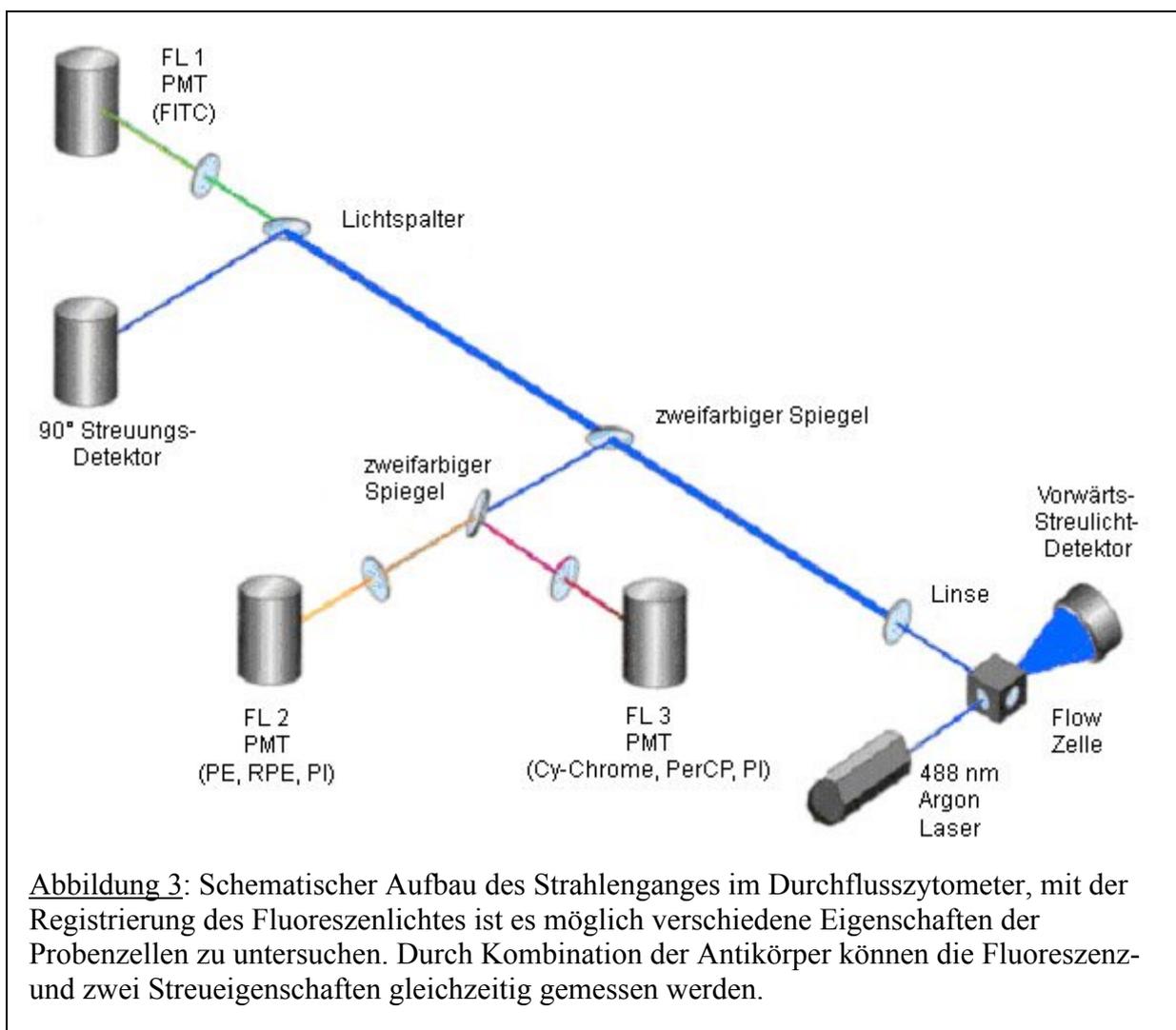


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Messbereiches, die Mantelflüssigkeit umgibt die Probenflüssigkeit in der Form, dass eine Hintereinanderreihe der zu untersuchenden Zellen erreicht wird.

Die markierten Zellen werden mittels Überdruck im Probenröhrchen über ein Schlauchsystem in den Messungsbereich des Gerätes überführt. Die Probenflüssigkeit wird dabei von einer Mantelflüssigkeit (s. Abb.3) umgeben.

Dieses Flüssigkeitsgemisch wird durch eine Düse (Nozzel \varnothing 70 μm) gepresst, wodurch eine Beschleunigung des Zellflusses, ferner eine Auftrennung kleiner Zellaggregate und eine Hintereinanderreihung der Zellen erreicht wird. Dieser Vorgang wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet.

In der Messkammer werden die Zellen durch monochromatisches Laserlicht eines luftgekühlten Argonionenlasers (488 nm) angeregt (s. Abb.4), das Streulicht wird durch eine Photodiode und



vier Photomultiplier registriert (38).

Entlang der Achse des auf die Zelle treffenden Lichtes (sog. „Forward light scatter“ - FCS) erfolgt die Lichtbeugung, die der Zelloberfläche und somit ihrer relativen Größe proportional ist.

Gemessen im 90° Winkel zum eintreffenden Licht (sog. „Sideward light scatter“ - SSC) erfolgt eine Lichtberechnung und –reflektion, die der relativen Zellgranularität entspricht. Außerdem wird das emittierte Fluoreszenzlicht in drei Messbereichen (entsprechend den Farben gelbgrün, orange und rot) gemessen. In der Abbildung 4 ist illustriert, daß FL1 die gelbgrünen (Fluorescein-Isothiocyanate - FITC) Farben, FL2 die orangen (Phycoerythrin-PE) Farben und FL3 die roten (Peridinin Chlorophyll- α Protein - PerCP) Farben mißt.

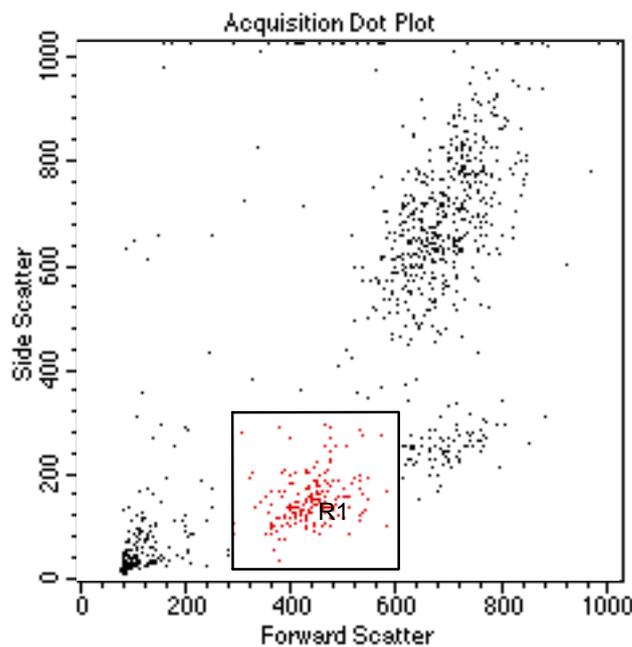


Abbildung 4: Dot Plot: Abzisse - Forward und Ordinate - Side Scatter, R1 umschreibt die Lymphozytenpopulation, Auftrennung der Zellen nach Größe und Granularität ermöglicht die Darstellung eines Differentialblutbildes

Die Messwerte werden digitalisiert und einem von 1024 Messkanälen zugeordnet. In der Abbildung 5 wird illustriert, wie sich die mononukleären Zellen im sog. „Dot Plot“ darstellen. Hier ist rel. Größe (Forward Scatter) zur Granularität (Side Scatter) aufgetragen. Mit den Boole'schen Logikkriterien können hier Zellen ausgeschlossen werden. So können mit Hilfe von Filterkriterien Aussagen über Subpopulationen getroffen werden, welche in Bezug auf die o.g. Kriterien gewisse Voraussetzungen erfüllen. Beispielsweise können Leukozytenpopulationen rechnerisch selektioniert werden. In der vorliegenden Arbeit werden T-Zell-Populationen, B-Zellen, Monozyten und Granulozyten durch Färbung von Oberflächenantigenen markiert. Die

Membranantigene von Leukozyten werden nach der CD-Nomenklatur (Cluster of differentiation) benannt.

Tabelle 1: Oberflächenantigene von Leukozytenpopulationen

CD 3	T-Zellen
CD 4	T-Helfer-Zellen
CD 8	Zytotoxische T-Zellen
CD 19	B-Zellen
CD 14	Monocyten, Makrophagen
CD 66b	Granulozyten

Die CD-Antikörper-Klassifikation unterliegt einer stetigen Überarbeitung durch den Workshop of Human Leukocyte Antigens.

4.4.2 Analysenablauf

Alle Untersuchungen wurden an Vollblut vorgenommen, welches mittels EDTA Zusatz antikoaguliert wurde. Die Verarbeitung des Blutes wird innerhalb von 30 Minuten nach Entnahme vom Patienten/Probanden begonnen.

Die Versuchsdurchführung untergliederte sich wie folgt:

1. Phosphatidylserinfärbung (Annexin-V Färbung) – hierbei wurden die Zellen nativ untersucht.
2. Färbung membranständiger Proteine – hierzu wurden die Zellen fixiert.
3. Färbung intrazellulärer Proteine – hier mußten die Zellen fixiert und permeabilisiert werden.

4.4.2.1 Phosphatidylserinfärbung

Die Zellen wurden mit Annexin-V (FITC) gefärbt(25).

100 µl Vollblut wurden in Falcon-Röhrchen gegeben, dann wurden die Erythrozyten mittels PharmLyse lysiert, jeweils 1,5 ml. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten und Zentrifugation von 4 Minuten bei 4°C und 200 G wurde die Lösung bis auf das verbleibende Pellet abgesaugt und anschließend mit 2 ml Hapes/Ca²⁺-Puffer gewaschen. Nach gründlichem Absaugen wurden 10 µl 7-AAD, sowie 2,5 µl Annexin und 7,5 µl Hapes/Ca²⁺ auf die Proben gegeben. Fünf verschiedene Typisierungen erfolgten mit PE-Farbstoff, nach kurzem Aufschütteln und 10 Minuten Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur erfolgte nochmals ein Waschschrift mit 1

ml Hepes/Ca²⁺-Puffer. Zum Schluss wurden die Zellen in 250 µl Hepes/Ca²⁺-Puffer zwecks Messung resuspendiert.

Die Messung mit dem FACSCalibur erfolgte nach weniger als 30 minütiger Lagerung auf Eis. Die Instrumenten-Einstellungen, welche die Detektion der Signale durch die Photomultiplier in Form der Spannung und Kompensation festlegten, blieben bei allen Untersuchungen dieser Art verschiedener Untersuchungstage gleich.

4.4.2.2 Färbung membranständiger Proteine (FAS, FAS-L)

Die Zellen wurden mit verschiedenen membranständigen Proteinantikörpern gefärbt(5;26). 100 µl Vollblut wurden in Falcon-Röhrchen gegeben, dieses wurde dann mittels jeweils 5 µl FITC/PerCP-Farbstoffen typisiert, dass es möglich wurde die Leukozytenpopulationen T-Helfer-Zellen, cytotoxische T-Zellen, B-Lymphozyten, Monozyten sowie Granulozyten eindeutig nach Tabelle 1 zu unterscheiden. Nach Aufschütteln und einer Inkubationszeit von 30 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur, wurde 2 ml FACS-Lyse hinzugegeben, welche die Erythrozyten lysierte und zugleich die Leukozyten fixierte. Nach Aufschütteln und einer Inkubationszeit von 15 Minuten in Dunkelheit und bei Raumtemperatur, wurde das Lysat mit o.g. Bedingungen abzentrifugiert. Die Zellen wurden zum Abschluss in 250 µl PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die Messung mittels Durchflusszytometrie, wobei die Instrumenten-Einstellungen zuvor mit Hilfe von Standardbeads festgelegt worden sind.

4.4.2.3 Färbung intrazellulärer Proteine (BCL-2, Kaspase 3)

In den Zellen wurde die Aktivität zweier intrazellulärer Proteine nachgewiesen(1). 100 µl Vollblut wurden in Falcon-Röhrchen gegeben, dieses wurde dann mittels jeweils 5 µl FITC/PerCP-Farbstoffen typisiert, dass es möglich wurde die Leukozytenpopulationen s.o. zu unterscheiden. Nach Aufschütteln und einer Inkubationszeit von 30 Minuten in Dunkelheit bei Raumtemperatur, wurde 1,5 ml PharmLyse hinzugegeben, welche nach kurzem Aufschütteln 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubierte. Nach Zentrifugieren s.o. wurde mittels PBS einmal gewaschen und anschließend 250 µl Cyofix/Cytoperm hinzugegeben, dies inkubierte für 20 Minuten bei 4°C. Nach Zentrifugieren und Waschen mittels PermWash wurden die intrazellulären Antikörper zugegeben, welche für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubierten.

Nach einem letzten Waschschrift mit PermWash, wurden die Zellen in 250 µl resuspendiert auf Eis gelagert.

Zur Messung wurden die Instrumenten-Einstellungen des unter 2.3.3 beschriebenen Essay benutzt.

4.4.3 Standardisierung

Zwecks Linearisierung wurde das QuantiBRITE™-System von Becton Dickinson angewandt, verbunden mit der Anwendung des QuantiQuest™ ist somit die Molekülzahl pro Zelle bestimmbar.

Mit Fluoreszenz markierten Beads wurde eine Eichgerade erstellt, und die gemessene Fluoreszenzintensität der o.g. Untersuchungen daran linearisiert, um eine Vergleichbarkeit zwischen den Messungen zu gewährleisten und eine Abweichung des Verstärkers von der Linearität u kompensieren.

4.5 Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA)

Im Rahmen der Studie wurde das Entstehen von Nukleosomen im Serum gemessen (Cell-Death-Detection Kit, Roche), welche als DNA-Spaltprodukte auf Apoptose hinweisen (13).

Zusammengefasst wurde eine mit Streptavidin beschichtete ELISA-Platte mit 20 µl Serum versetzt, anschließend wird 80 µl des Antikörpergemisches aus Anti-histone-biotin und Anti-DNA-POD zugegeben, welches zwei Stunden inkubierte. Nach dreimaligem Waschen wurde 100 µl des Gemisches hinzugeben, aus welchem der farblich aktive Antikörper in einer zehnminütigen Inkubationszeit erstellt wurde.

Eine Messung bei 405 nm zur Referenzwellenlänge von 490 nm ermöglichte einen intra- sowie interindividuellen Vergleich.

4.6 Statistik

Teile der Auswertung wurden direkt von der BD-CellQuest™ Software geleistet. Die Statistische Auswertung erfolgte mit PRISM® 3.00, wobei deskriptive Statistik und die ANOVA-Analyse angewendet wurden. Es handelt sich hier um die Untersuchung von nicht verbundenen Variablen. Statistische Signifikanz wurde als $p < 0.05$ angenommen. In unserer Studie haben wir die Patienten stets am ersten Tag dieses Krankheitsverlaufes untersucht, nachdem sie durch erfahrene Intensivmediziner in die Studie eingeschlossen worden sind.

5 Ergebnisse

5.1 Klinische Daten

Wie oben beschrieben handelt es sich bei der Sepsis um ein extrem heterogenes Krankheitsbild.

Tabelle 2: Sepsisdiagnosen auf der Intensivstation für die Patienten:

Diagnosen	Anzahl
nekrotisierende Fasziits	1
akutes Nierenversagen	1
Papillenadenom	1
nekrotisierende Pankreatitis	2
nekrotisierende Enterokolitis	1
septische Enzephalopathie	1
Dickdarmperforation	1
Erysipel	1
Peritonitis	1
Fornier Gangrän	1
KHK	1
Pneumonie	1
Apsirationspneumonie	1
rupturiertes Bauchaortenaneurysma	1
Polytrauma	1

In der Gruppe der Sepsis-Patienten sind 16 Patienten mit dem Krankheitsbild der Sepsis eingeschlossen worden, wovon elf männlich und fünf weiblich waren, der Altersmedian befand sich bei 68 Jahren. In der Vergleichsgruppe der kritisch kranken Patienten ohne Sepsis befanden sich zehn Patienten, wovon acht männlich und zwei weiblich waren bei einem Altersmedian von 53 Jahren. Als zweite Kontrollgruppe haben wir 11 gesunde Probanden untersucht, hiervon waren 6 männlich und fünf weiblich bei einem Altersmedian von 34 Jahren. Um die Patienten zu vergleichen, ermittelten wir drei gebräuchliche Scores. Hiermit war es uns möglich die Krankheitsschwere objektiv zu vergleichen. Der SOFA-Score (siehe Abbildung 6) wurde herangezogen, um den Zustand der Organfunktion der Patienten zu vergleichen. Im Mittelwert hatten alle Sepsis-Patienten einen SOFA-Score-Wert von 15 und alle Vergleichspatienten ohne Sepsis einen Score-Wert von 3, wodurch sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) ergab. Als weiteren Score untersuchten wir den SAPS II – Score (siehe Abbildung 7), dieser ist ein Aufnahmescore und erlaubte eine Charakterisierung des Patientenkollektivs betreffend der Krankheitsschwere. Alle Sepsis-Patienten hatten im Mittel einen Wert von 57 und alle kritisch Kranken einen Score-Wert von 26, wodurch sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) ergab. Als weiteren Aufnahmescore für Intensivpatienten analysierten wir den Apache II-Score

(siehe Abbildung 8). Im Mittel hatten die septischen Patienten einen Wert 26 und die kritisch kranken Patienten von 12, hierbei ergab sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$). Anhand der verschiedenen Scores ergibt sich ein guter Einblick in die Krankheitsschwere. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Patienten in der Sepsis signifikant von der Kontrollgruppe hinsichtlich der Organfunktion und der initialen Krankheitsschwere unterschieden.

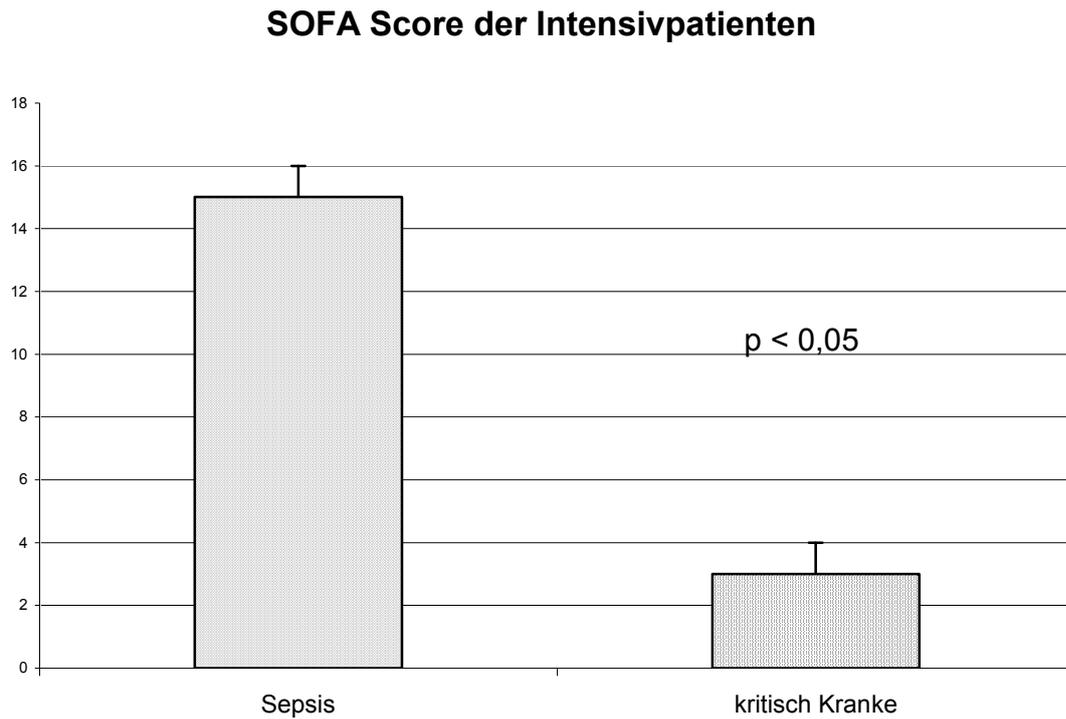


Abbildung 5: SOFA-Score (Sepsis-related Organ Failure Assessment) der Intensivpatienten zur Beurteilung der Organfunktion

SAPS II-Score der Intensivpatienten

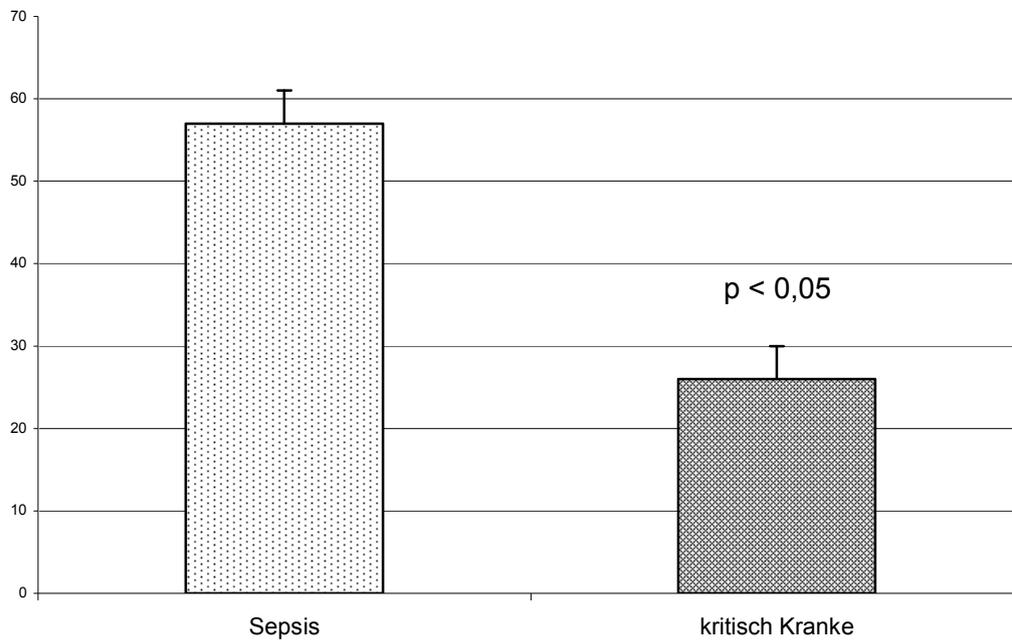


Abbildung 6: SAPS II-Score (Simplified Acute Physiology Score II) zur Beurteilung der Krankheitsschwere

Apache II Score der Intensivpatienten

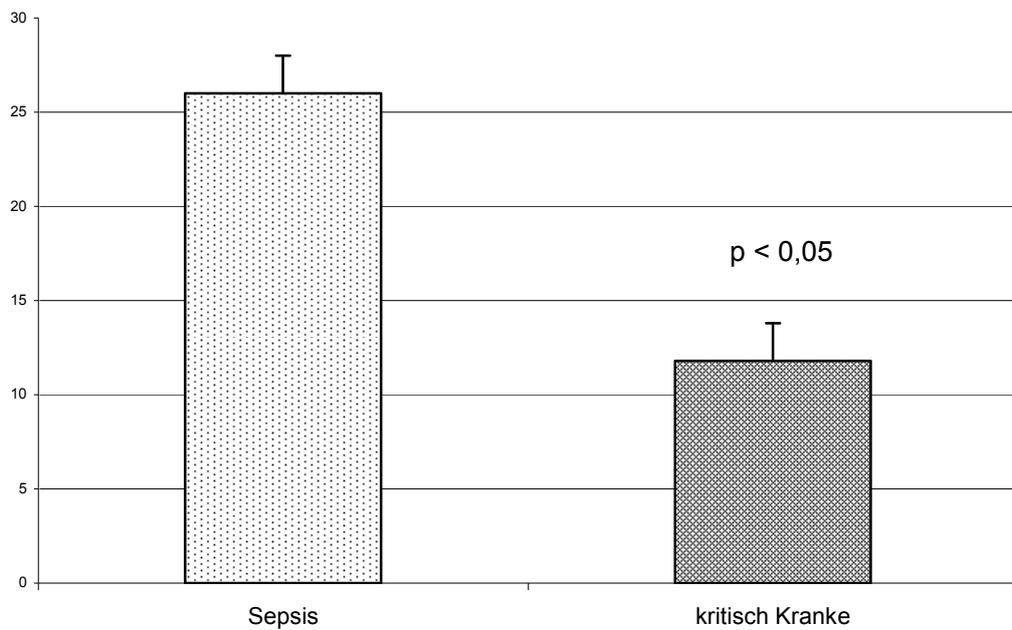


Abbildung 7: Apache II-Score (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II) der Intensivpatienten zur Beurteilung der Krankheitsschwere

5.1.1 Laborwerte

Im Rahmen des täglichen Immunmonitorings untersuchten wir das proinflammatorische Serum Interleukin-6 (siehe Abbildung 9) als einen Entzündungsparameter, welcher in der Intensivmedizin ein Marker der Pro-Inflammation ist. Die septischen Patienten hatten im Mittel 4394 pg/ml einen stark erhöhten Wert ($p < 0,05$), während im Serum der kritisch kranken Patienten 20 pg/ml nachweisbar waren. Außerdem verglichen wir Procalcitonin (PCT) als weiteren Laborwert, dieser gibt Hinweise auf eine bakterielle Infektion im menschlichen Körper. Hier (siehe Abbildung 10) waren die Werte der septischen Patienten wesentlich erhöht im Durchschnitt 39,4 ng/ml ($p < 0,05$), die kritisch kranken Patienten wiesen lediglich einen Durchschnittswert von 0,25 ng/ml auf.

IL-6 Werte der Intensivpatienten

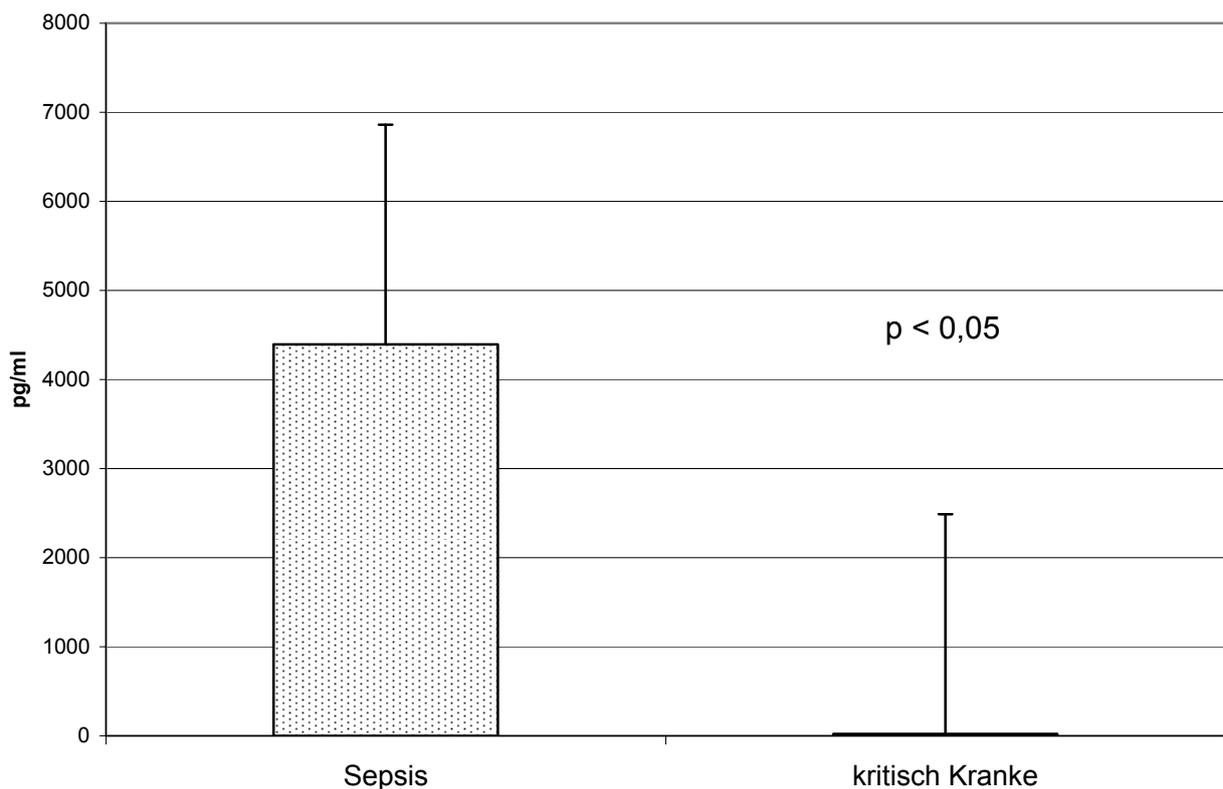


Abbildung 8: Interleukin 6 im Serum ist bei der schweren Sepsis im Vergleich mit den kritisch Kranken signifikant erhöht

PCT Werte der Intensivpatienten

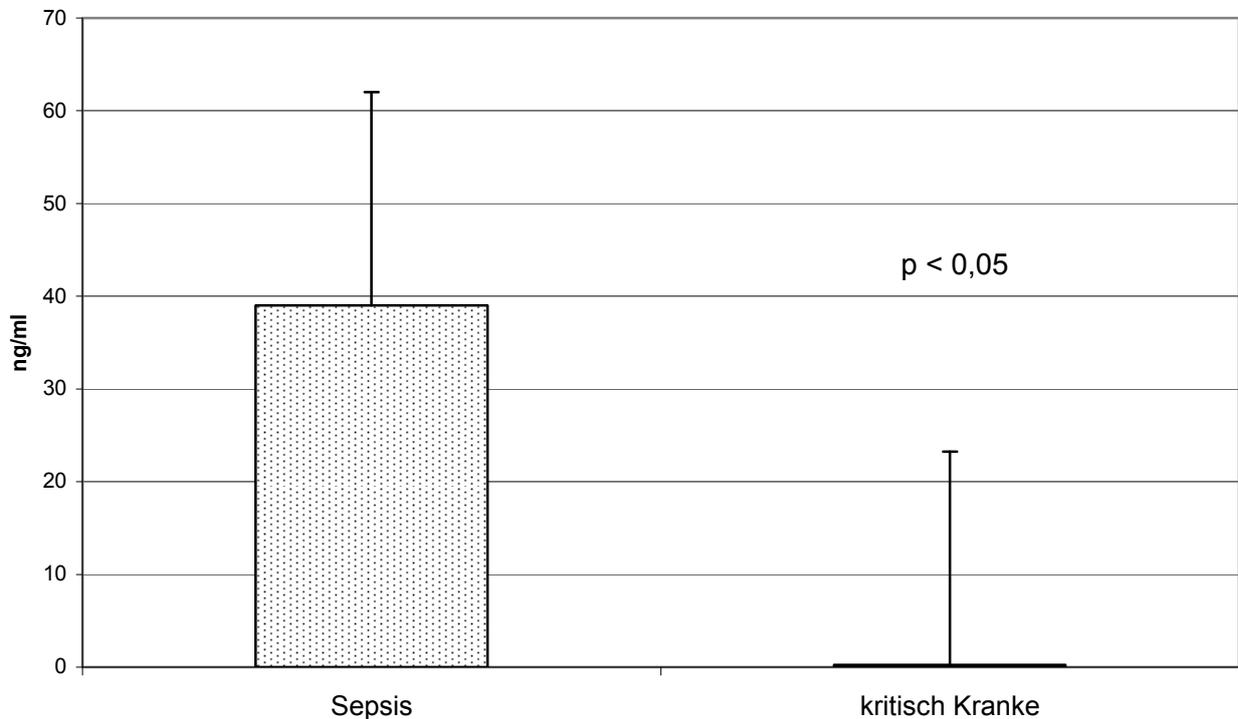


Abbildung 9: Procalcitonin um Hinweise über das Vorliegen einer bakteriellen Infektion zu erhalten sind bei den septischen Patienten im Vergleich zu den kritisch Kranken signifikant erhöht.

5.2 Apoptoseparameter

5.2.1 Phosphatidylserin Externalisierung

Phosphatidylserin (PS) ist ein Molekül, welches sich in der Regel an der Innenseite der Membran befindet. Im Rahmen der Apoptose werden diese Moleküle externalisiert, es markiert die betroffene Zelle somit für die Phagozytose. Mittels oben beschriebener Methoden ist diese Externalisierung der Analyse zugänglich. Phosphatidylserin positive Zellen gelten als frühapoptotisch, sofern sie keine Zeichen der Nekrose beispielsweise durch eine Anfärbung durch 7-AAD zeigen, denn die Membran ist noch intakt.

Bei den T-Helferzellen (CD 4+, siehe Abbildung 11) zeigten die septischen Patienten mit 6,12% ($\pm 1,0\%$) verglichen mit den kritisch Kranken 3,18% ($\pm 1,10$) eine signifikant ($p < 0,05$) höhere Phosphatidylserin-Externalisierung. Ein Vergleich mit den Gesunden 3,07% ($\pm 1,04\%$) zeigte einen signifikanten ($p < 0,01$) Unterschied. Für die zytotoxischen T-Zellen (CD 8+, siehe

Abbildung 12) wies die Gruppe der septischen Patienten mit 7,40% ($\pm 1,06\%$) im Vergleich mit den kritisch kranken Patienten 4,02% ($\pm 0,43\%$) und den gesunden Probanden 3,74% ($\pm 0,28\%$) einen erheblichen Unterschied auf ($p < 0,05$ Sepsis versus kritisch Kranke, $p < 0,001$ Sepsis versus Gesunde). Die B-Zellen (CD 19+, siehe Abbildung 13) waren in der Gruppe der septischen Patienten mit $9,51\% \pm (1,49\%)$ verglichen mit den kritisch Kranken $3,78\% (\pm 0,22\%)$ und den Gesunden $3,3\% (\pm 0,32\%)$ ebenfalls vermehrt der frühen Apoptose unterworfen ($p < 0,01$ Sepsis versus kritisch Kranke, $p < 0,001$ Sepsis versus Gesunde).

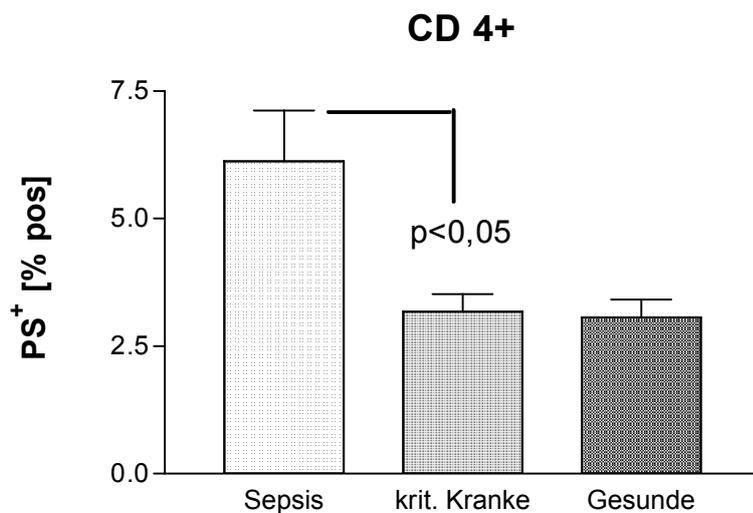


Abbildung 10: Phosphatidylserin Externalisierung auf T-Helfer-Zellen (CD 4⁺)

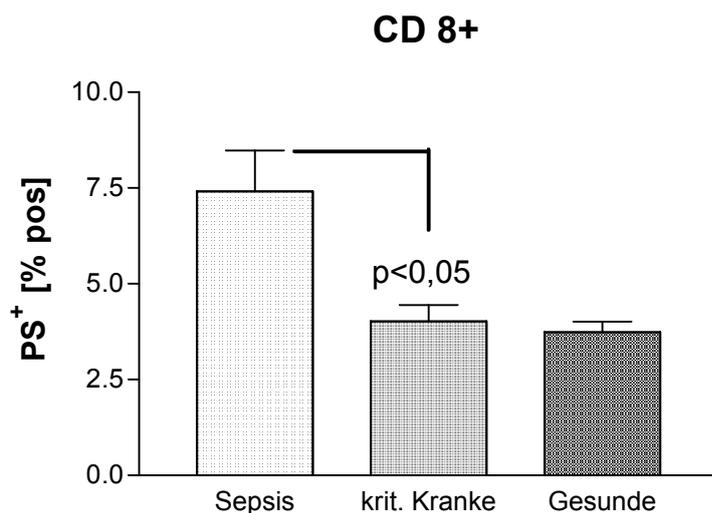


Abbildung 11: Phosphatidylserin Externalisierung auf zytotoxischen T-Zellen (CD 8⁺)

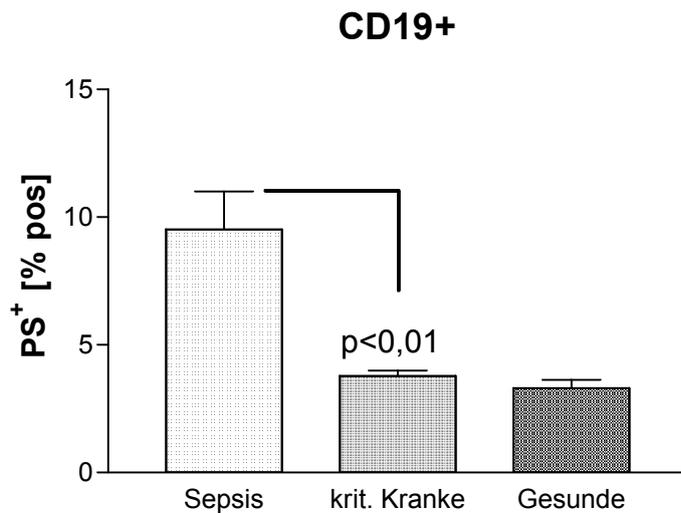


Abbildung 12: Phosphatidylserin Externalisierung auf B-Zellen (CD 19⁺)

5.3 FAS-Rezeptor

Der FAS-Rezeptor, welcher auch als CD 95 bezeichnet wird, wurde initial auf Fibroblasten gefunden und hieß daher zu Anfang fibroblasten-assoziiert (FAS), FAS ist jedoch heute ein stehender Begriff. Er ist ein Todesrezeptor und gehört zu Familie der TNF- α -Rezeptoren. Über diesen Rezeptor wird der membranassoziierte Weg, der so genannte extrinsische Weg, der Apoptose eingeleitet. Hier werden mögliche Induktionswege der Apoptose untersucht. Die FAS-Rezeptoren auf den T-Helferzellen (siehe Abbildung 14) waren bei den Patienten, welche ein septisches Krankheitsbild aufwiesen, wesentlich höher auf der Zelloberfläche expremiert (7.600 LFU \pm 1740), als bei Patienten mit der systemischen Inflammation, die weniger ($p > 0,05$) Rezeptoren (3.130 LFU \pm 845) und den gesunden Probanden, die signifikant ($p < 0,001$) weniger Rezeptoren (908 LFU \pm 106) pro Zelle expremierten. Auch in der Population der zytotoxischen T-Zellen (siehe Abbildung 15) haben die septischen Patienten eine wesentlich höher Zahl von FAS-Rezeptoren auf der Zelloberfläche expremiert (5.310 LFU \pm 1490), während die Patienten mit der systemischen Inflammation weniger ($p > 0,05$) Rezeptoren (3.494 LFU \pm 1000) und die gesunden Probanden signifikant ($p < 0,001$) weniger Rezeptoren (808 LFU \pm 137) pro Zelle expremierten.

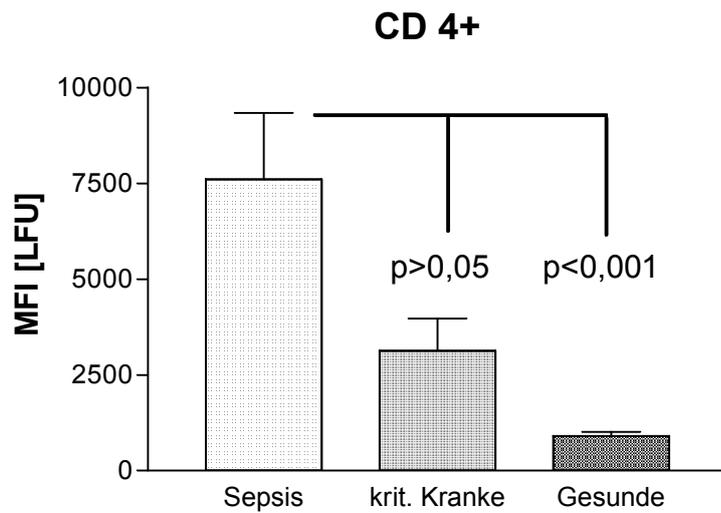


Abbildung 13: Alle untersuchten Patientenpopulationen zur mittleren Fluoreszenzintensität des Todesrezeptors (FAS) für die T-Helferzellen

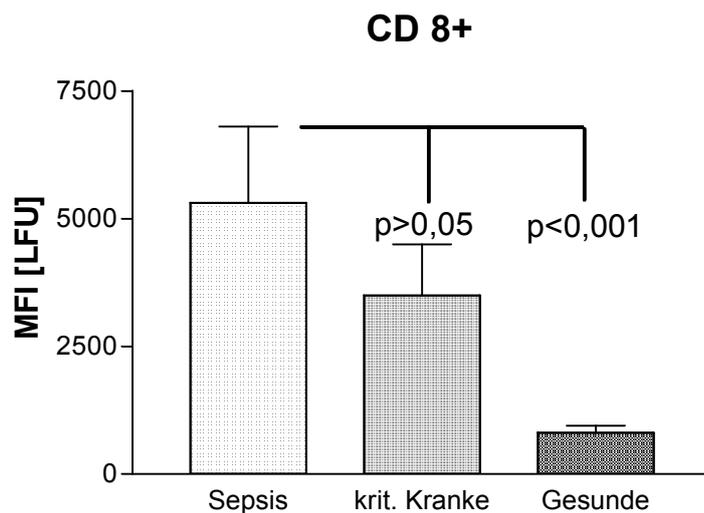


Abbildung 14: Alle untersuchten Patientenpopulationen zur mittleren Fluoreszenzintensität des Todesrezeptors (FAS) für die zytotoxischen T-Zellen

5.4 FAS-Ligand

Über den FAS-Liganden können T-Helferzellen bei anderen Zellen Apoptose induzieren. Dies geschieht durch den oben beschriebenen FAS-Rezeptor. Auf den T-Helfer-Zellen ist der FAS-Ligand (siehe Abbildung 16) in der Gruppe der septischen Patienten signifikant ($p < 0,01$) höher expremiert ($181 \text{ LFU} \pm 58$) als in der Patientengruppe der kritisch Kranken ($19 \text{ LFU} \pm 3,3$) und der gesunden Probanden ($14,4 \text{ LFU} \pm 0,7$; $p < 0,001$).

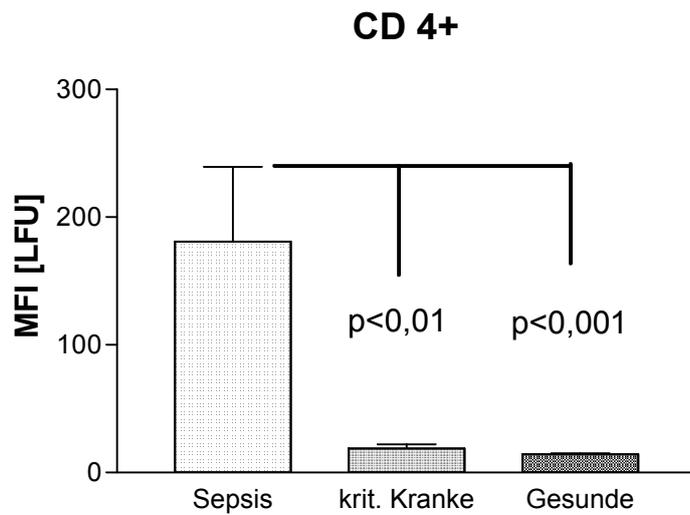


Abbildung 15: Alle untersuchten Patientenpopulationen zur mittleren Fluoreszenzintensität des FAS-Liganden für die T-Helferzellen

5.5 BCL-2

BCL-2 ein Vertreter der antiapoptischen Moleküle der BCL-2-Gruppe und ist in der Mitochondrien-Membran lokalisiert. Die septischen Patienten haben in der Gruppe der CD 4 positiven Zellen (siehe Abbildung 17) eine signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Moleküldichte ($5730 \text{ LFU} \pm 481$) als die kritisch kranken Patienten ($7010 \text{ LFU} \pm 379$) und die gesunden Probanden ($7450 \text{ LFU} \pm 244$). Für die zytotoxischen T-Zellen (siehe Abbildung 18) war in keiner Gruppe eine signifikante Veränderung nachweisbar. Bei den B-Zellen (siehe Abbildung 19) hatten die septischen Patienten einen signifikanten ($p < 0,01$) Abfall der Moleküldichte ($4700 \text{ LFU} \pm 510$) um rund 36% im Vergleich zu den kritisch kranken Patienten ($5910 \text{ LFU} \pm 511$) und den gesunden Probanden ($7360 \text{ LFU} \pm 281$).

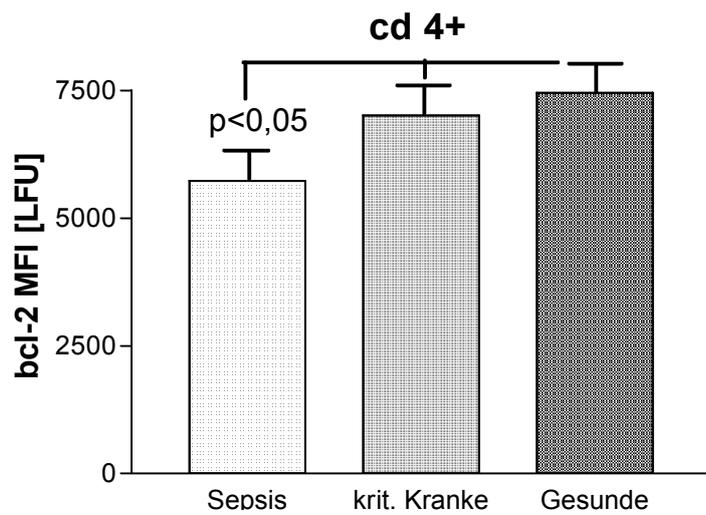


Abbildung 16: Alle untersuchten Patientenpopulationen zur mittleren Fluoreszenzintensität des Membranproteins BCL-2 für die T-Helferzellen

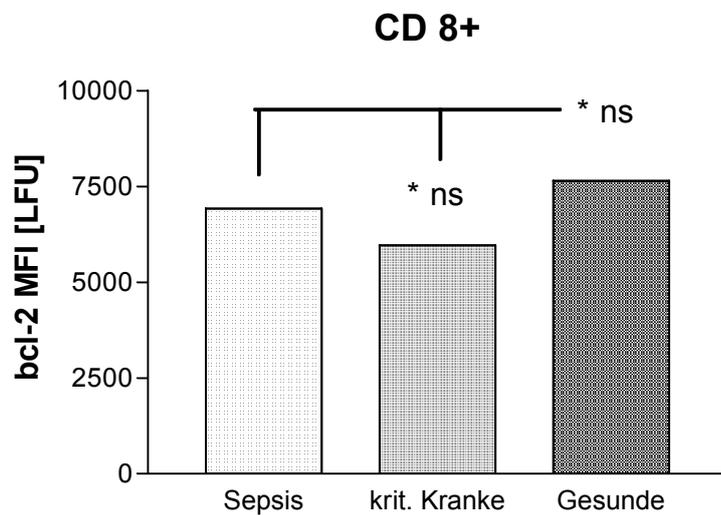


Abbildung 17: Alle untersuchten Patientenpopulationen zur mittleren Fluoreszenzintensität des Membranproteins BCL-2 für die zytotoxischen T-Zellen

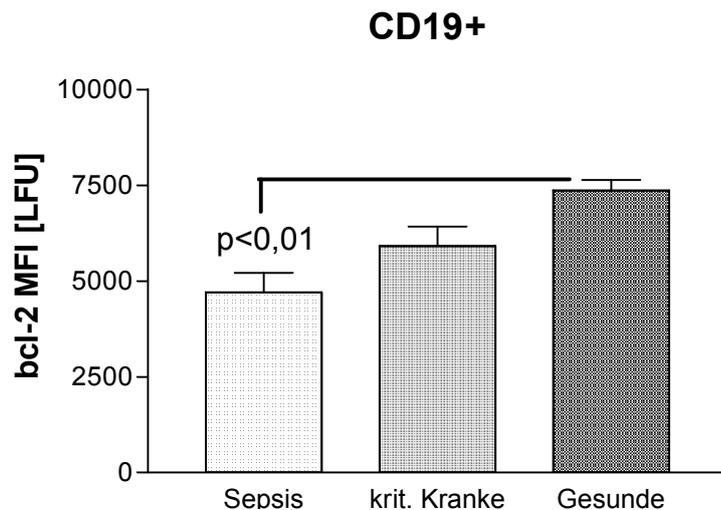


Abbildung 18: Alle untersuchten Patientenpopulationen zur mittleren Fluoreszenzintensität des Membranproteins BCL-2 für die B-Zellen

5.6 Kaspase 3

Kaspase 3 ist ein Schlüsselenzym im Rahmen der Apoptose. Es liegen verschiedene Kaspasen im Zytosol inaktiv als Proenzyme in Form von Prokaspasen vor, diese werden durch verschiedene Abläufe innerhalb der Apoptose aktiviert. Gemessen wurde nur die aktive Form, welche eine Schlüsselstellung in der Apoptose-Kaskade darstellt. Es wurde hier der Anteil der aktivierten Zellen bestimmt.

Bei den CD 4 positiven Zellen (siehe Abbildung 20) hatten die septischen Patienten eine mit 2,67% ($\pm 0,73$) positiven Zellen signifikant ($p < 0,001$) höhere Kaspase 3-Aktivität als die kritisch kranken Patienten (0,3% $\pm 0,05$) und die gesunden Probanden (0,4% $\pm 0,08$). Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für die zytotoxischen T-Zellen (siehe Abbildung 21), hier hatten die septischen Patienten eine signifikant ($p < 0,01$ Sepsis versus kritisch Kranke, $p < 0,001$ Sepsis versus Gesunde) erhöhte Kaspase-3-Aktivität auf 3,62% ($\pm 0,76$) positive Zellen im Vergleich zu den kritisch kranken Patienten (0,44% $\pm 0,1$) und den gesunden Probanden (0,31% $\pm 0,08$).

Die septischen Patienten haben in der Population der B-Zellen (siehe Abbildung 22) eine wesentlich ($p < 0,01$ Sepsis versus kritisch Kranke, $p < 0,001$ Sepsis versus Gesunde) erhöhte Kaspase-Aktivität 3,78% ($\pm 0,69$) als in der Gruppe der kritisch kranken Patienten (0,7% $\pm 0,11$) und der gesunden Probanden (0,41% $\pm 0,72$).

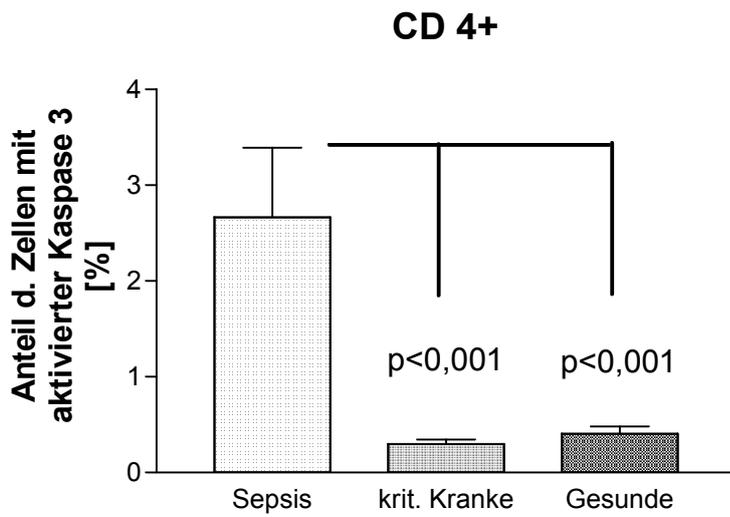


Abbildung 19: Vergleich aller untersuchten Patientenpopulationen nach den Zellen mit aktivierter Kaspase-3 als gemeinsame Endstrecke der Apoptose für die T-Helferzellen

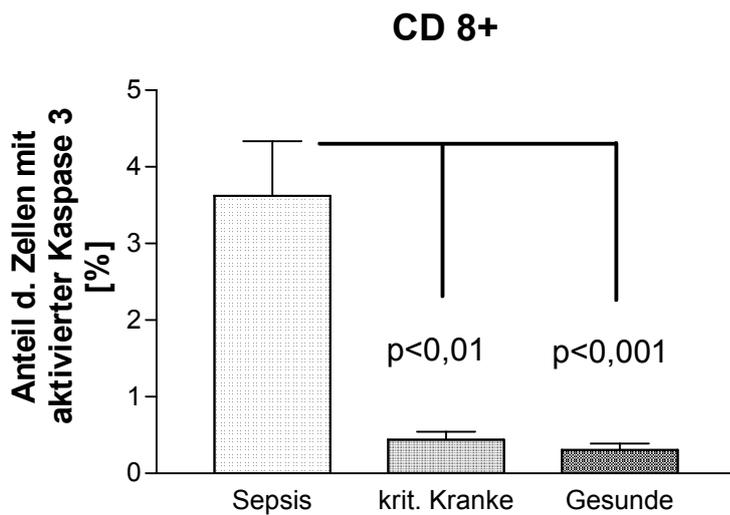


Abbildung 20: Vergleich aller untersuchten Patientenpopulationen nach den Zellen mit aktivierter Kaspase-3 als gemeinsame Endstrecke der Apoptose für die zytotoxischen T-Zellen

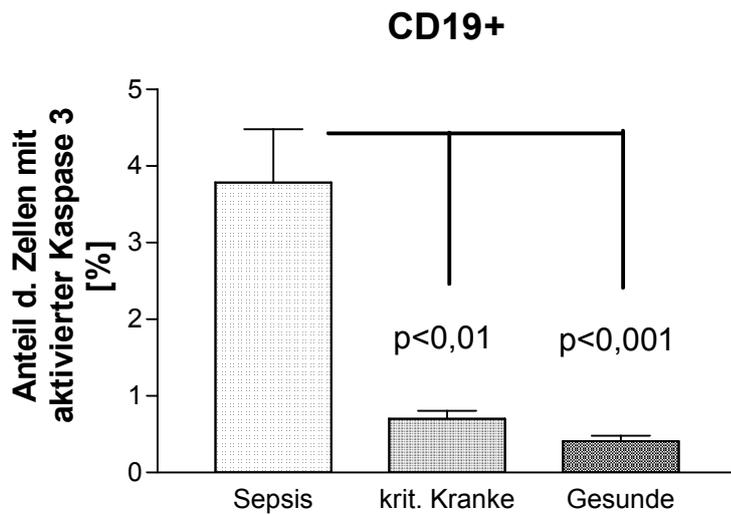


Abbildung 21: Vergleich aller untersuchten Patientenpopulationen nach den Zellen mit aktivierter Kaspase-3 als gemeinsame Endstrecke der Apoptose für die B-Zellen

5.7 Nukleosomen-Konzentrationen

Im Rahmen der Apoptose entstehen Nukleosomen: Dies sind DNA-Spaltprodukte. Die DNA-Spaltung stellt das Ende der Apoptose Kaskade dar. In der vorbeschriebenen Untersuchung wurden diese Nukleosomen mittels ELISA-Technik untersucht. Auf der Ordinate wurde der Quotient aus den Absorptionunterschieden und der Konzentration abgebildet. Somit stellt ein höherer Wert eine höhere Konzentration von Nukleosomen im untersuchten Blut dar.

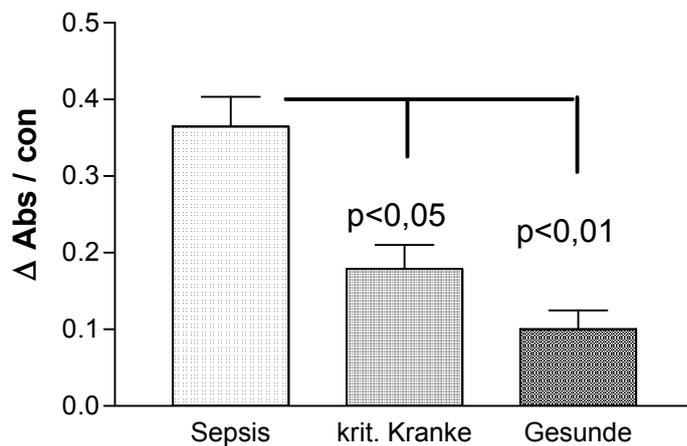


Abbildung 22: Vergleich aller untersuchten Patientenpopulationen zu den Nukleosomenkonzentrationen, welche im Rahmen der ELISA-Technik als dimensionslose Zahlen als Absorptionswerte ausgewiesen wurden.

Das septische Patientengut hat auch im Serum Zeichen einer signifikant erhöhten Apoptose mit einem dimensionslosen Zahlenwert von 0,36 ($\pm 0,03$), während die kritisch kranken Patienten einen Wert von 0,17 ($\pm 0,015$) und die gesunden Probanden einen Wert von 0,1 ($\pm 0,01$) erreicht haben.

6 Diskussion

6.1 Apoptose

Unsere Untersuchungen zeigten eine vermehrte Apoptose der peripheren Leukozyten im septischen Patientenkollektiv. Im Folgenden werden gemäß der Fragestellungen die einzelnen Ergebnisse anhand der aktuellen Literatur diskutiert, im Anschluss wird ein Ausblick auf mögliche Konsequenzen aus diesen Ergebnissen gegeben.

Im Rahmen der Sepsis durchschreitet der Organismus sowohl eine Phase der Hyperinflammation als auch der Hypoinflammation(16;45). Die Hypoinflammation stellt eine anerge Phase des Organismus im Rahmen der Bekämpfung der Infektion dar. Zwar kommen sowohl Apoptose als auch Nekrose im septischen Organismus vor, jedoch ist Apoptose der führende Pathomechanismus im Rahmen der Immundefizienz(18).

Vermehrte Apoptose führt zu einem fulminanten und anhaltenden Lymphozyten-Verlust und leitet damit eine anerge Phase im Rahmen der Sepsis ein. Ein hoher Anteil der peripheren Lymphozyten hatten positive Phosphatidylserinfärbungen (s. Abb. 11-13), jedoch waren keine nekrotischen Zellen detektierbar. Zusätzlich konnten im Serum erhöhte Nucleosomenkonzentrationen (s. Abb. 23) festgestellt werden. Diese sind das morphologisch Korrelat zur Kern-Fragmentation im Rahmen des programmierten Zelltodes, da im Rahmen dieses Prozesses Endonukleasen die DNA zersetzen und Kern-Partikel entstehen. Diese Nucleosomen konnten in der Gruppe der Sepsis-Patienten in einer signifikant erhöhten Konzentration nachgewiesen werden. Apoptose von Lymphozyten in der Sepsis war ein Prozess, welcher zuerst lediglich in post-mortem Studien an Tieren gezeigt werden konnte; in den vergangenen Jahren ist auch im Rahmen der Sepsis-Forschung ein Augenmerk hierauf gerichtet worden. So kann in der vorliegenden Untersuchung und in der Literatur (18;29;41) gezeigt werden, dass Lymphozytenapoptose im Rahmen der Sepsis eine evidente Rolle spielt.

In der Gruppe der kritisch kranken Patienten konnte keine wesentlich erhöhte Rate von Apoptose im Vergleich zu den Gesunden gezeigt werden. Auch wenn man der Ansicht sein könnte, dass Apoptose lediglich in der Sepsis im Rahmen der Hypoinflammation vorkommt, ist es verständlich, dass manche der kritisch Kranken ebenfalls eine leicht erhöhte Apoptoserate aufweisen. Verschiedene Faktoren wie Ischämie/Reperfusion von Verletzungen, inflammatorische Prozesse, Aktivierung der Gerinnungskaskade (11) erklären eine moderate

Erhöhung der Apoptose, welche dann im Rahmen des septischen Krankheitsbildes durch eine Verstärkung dieser Faktoren und hinzukommen anderer exzessiv gesteigert wird.

Unsere Ergebnisse weisen eher auf das gemeinsame Einwirken von pathologischen Mechanismen wie zum Beispiel auch Sauerstoffradikale und Stickoxide hin als auf gut regulierte Prozesse der Lymphozyten-Populationen, damit könnte sich die „lawinenartige“ Entwicklung im Rahmen der Sepsis erklären. Konnte zuvor die Apoptose der Lymphozyten vor allem in der Milz beobachtet werden (17), wird in der vorliegenden Untersuchung und in anderen Untersuchungen neueren Datums (29) eine erhöhte Apoptose von peripheren zirkulierenden Lymphozyten gezeigt. Wenngleich die Vermutung anhand der Ergebnisse nahe liegt, dass diese apoptotischen Lymphozyten schneller, als wir bisher annahmen, aus dem Blutkreislauf entfernt werden. Damit wird eventuell nur einen kleinen Einblick in die tatsächlichen Geschehnisse im Kreislauf der septischen Patienten gewährt. Der erhebliche Lymphozytenverlust spiegelt sich auch in einem wesentlich kritischeren Allgemeinzustand der Patienten in Form des SOFA-Scores (s. Abb 6) wieder. Ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen Lymphopenie in der Sepsis und schlechter Überlebensrate liegt jedoch in der Literatur bisher nur für das Tiermodell vor. Daher gibt es bereits verschiedene Ansätze die Apoptose im septischen Organismus zu hemmen (15). Apoptose von verschiedensten Zellen wurde bisher häufig bei Patienten mit malignem Grundleiden nachgewiesen, hierzu gab es die ersten Untersuchungen und damit ließen sich auch erhöhte Nukleosomen-Level erklären. Jedoch haben wir im Rahmen der Patienten-Rekrutierung solche mit malignem Grundleiden ausgeschlossen. Somit ist die Erklärung der Apoptose durch das Krankheitsbild der Sepsis die einzig schlüssige (54).

6.2 Signaltransduktionswege

Zwei Signaltransduktionswege leiten Apoptosesignale weiter: Das Todesrezeptor-System und das mitochondriale System. Beide Wege enden in der Aktivierung von Kaspase 3, welche die gemeinsame Endstrecke der Apoptose bildet und in der DNA- und Zellzersetzung endet. Wird in einigen Arbeiten (29) angenommen, die Abnahme von anti-apoptotischen Faktoren wie BCL-2 oder BCL-XL sei ein dritter Weg. Wir haben angenommen, dass diese Proteine wesentlich an der Membranstabilität der Mitochondrien beteiligt sind und BCL-2 daher als Stellvertreter desselbigen Signaltransduktionsweges betrachtet. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass die FAS-Todesrezeptoren in jeder untersuchten Population der Lymphozyten (s. Abb. 14 und 15)

signifikant erhöht sind, obwohl die erhöhten Werte im Patientenkollektiv der kritisch Kranken auf Faktoren schließen lässt, welche nicht nur in der Sepsis vorkommen.

Die Induktion des Apoptoseprogramms durch FAS-Ligand von T-Helferzellen (s. Abb. 16)(42;43) wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In unseren Ergebnissen spiegelt sich jedoch eine Beteiligung dieses Faktors wieder. So scheint dieser Transduktionsweg in Sepsis eine möglicherweise ebenfalls entscheidende Rolle zu spielen.

BCL-2 ist der Name einer Proteingruppe, welche mit der Mitochondrienmembran und anderen Membranen innerhalb der Zelle assoziiert sind. Hier haben sie die Aufgabe für ein Gleichgewicht des Membranpotentials zu sorgen. In dieser heterogenen Gruppe von BCL-Molekülen gibt es pro-apoptotische und anti-apoptotische Faktoren. Das Protein BCL-2 selbst ist ein anti-apoptotischer Faktor, dessen Abnahme auf einen erhöhten Verbrauch oder eine verminderte Produktion schließen lässt. In unseren Ergebnissen konnten wir eine Abnahme dieser Proteine jedoch nicht in allen untersuchten Lymphozyten-Populationen messen. So scheint die Abnahme der zytotoxischen T-Zellen bereits in einer anderen Krankheitsphase so evident zu sein, dass eine weitere Abnahme der BCL-2 Konzentrationen in der Sepsis keinen signifikanten Einfluss auf den Krankheitsverlauf nimmt.

Doch welcher Weg auch immer der letztendlich entscheidende sei, scheint die Kombination der verschiedenen Faktoren die Apoptose zu induzieren und keine Monokausalität vorzuliegen. Ein Nachweis dafür ist jedoch schwierig, da sich die beschriebenen Signaltransduktionswege auch gegenseitig aktivieren können. Weitere Untersuchungen zu diesem Thema sind nötig, um immunmodulatorische Ziele für ein therapeutisches Eingreifen zu formulieren (19;20;41). So scheinen unsere Ergebnisse ein Eingreifen auf der Ebene des BCL-2 ebenfalls zu rechtfertigen. Denn andere Wege der Aktivierung durch Katecholamine und Mediatoren wie IL-6, IL-8 oder IL-10, welche wiederum durch TNF- α vermehrt freigesetzt werden, hatten bei *in vitro* Versuchen (29) nicht einen solch fulminanten Effekt. Dabei ist anzunehmend, dass die singuläre Betrachtung der einzelnen Mediatoren wahrscheinlich nicht dem Geschehen im septischen Organismus nahe kommt. Die veränderte Gerinnungseigenschaft mit Komplement-Aktivierung (11) und die erhöhte Gefäßpermeabilität (50), Ischämie-Reperfusionssyndrom, reaktive Sauerstoffradikale oder Stickoxide können ein Symptom oder Ursprung der Aktivierung der Apoptose sein. Zumal wir annehmen müssen, niemals gleichzeitig jedes Kompartiment der Organismus untersuchen zu können. Daher sind sich wohl auch nicht alle zitierten Autoren über die beteiligten Faktoren einig.

Die gemeinsame Endstrecke der Apoptose – die Aktivierung der Kaspasen-Kaskade – untersuchten wir mittels des Schlüsselenzyms Kaspase-3, welche in allen untersuchten Lymphozyten-Populationen signifikant erhöht war. So liegt die Vermutung nahe, dass die über verschiedene Wege induzierte Apoptose eine Schlüsselrolle in der Erklärung der Lymphopenie und der anergen Phase des septischen Organismus darstellt.

6.3 Unterschiede in den Leukozyten-Subpopulationen

In der dieser Arbeit vorangestellten Fragestellung wollten wir die unterschiedliche Beteiligung der Subpopulationen der Apoptose ermitteln.

Unterschiede scheinen hierin nur in geringem Maße vorzuliegen, so differieren die untersuchten Populationen der Leukozyten in der Endstrecke der Apoptose im Signifikanzniveau gar nicht.

Denn in allen Populationen waren die Konzentrationen der Kaspase 3 hochsignifikant erhöht (s. Abb. 20-22) sowie alle Populationen hochsignifikant Phosphatidylserin-positiv (s. Abb. 11-13).

Während wir den FAS-Rezeptor nur bei den T-Zellen (s. Abb. 14-15) untersucht haben, da wir hier auch einen sich gegenseitig aktivierenden Effekt vermuten (34), zeigte sich hierbei ein hochsignifikanter Unterschied in beiden T-Zell-Subpopulationen im septischen Patientengut. Der Effekt des FAS-Liganden (s. Abb. 16), wie von verschiedenen anderen Autoren (26;33) erwähnt, bestätigt sich in unserem untersuchten Patientengut ebenfalls.

Der Effekt den mitochondrien assoziierten Transduktionsweges via BCL-2 ist in den B-Zellen (s. Abb. 19) erheblicher denn in den untersuchten T-Zell-Populationen (s. Abb. 17-18). Hieraus könnte sich der Schluss ableiten lassen, dass dem Organismus im Kampf gegen die Sepsis das Immungedächtnis nicht so vordringlich ist. Dies würde bedeuten, dass die Vorgänge im septischen Organismus geordneter verlaufen, als bisher angenommen.

6.4 Möglichkeiten und Folgen einer Veränderung der Apoptoserate

Aufgrund der hohen Letalität (30-70%) wird dem Krankheitsbild der Sepsis seit Jahren ein besonderes Interesse gewidmet. Hierzu gibt es verschiedene Ansätze die Therapie zu optimieren (48). Der direkte Weg in der Blockade der Mediatoren gibt die Möglichkeit direkten Einfluss zu nehmen (46;53). Sicherlich bedarf es weiterer Untersuchungen der beteiligten Faktoren, um ein kontrolliertes und erfolgreiches Eingreifen zu ermöglichen.

Frühere Strategien in der Gabe von Kortikosteroiden haben im Rahmen niedriger Dosierungen (35) positiven Ergebnisse in Form von niedrigeren TNF- α - und IL-6- Konzentrationen gezeigt.

Während eine direkte TNF- α -Blockade im humanen Sepsismodell nicht erfolgreich(47) war. Andere Eingriffe auf der Ebene von einzelnen Mediatoren, wie IL-1-Rezeptor Antagonist, Inhibitoren oder Antagonisten von Plättchen-Aktivatoren, Arachidon-Säure-Metaboliten, Sauerstoffradikalen, NO, Bradykinin, Phosphodiesterase und C1-Esterase, zeigten nur wenige oder gar keine Erfolge (48), wenngleich diese Mediatoren im Rahmen der septischen Kreislaufdepression eine erhebliche Rolle spielen (41). Wobei Behandlungen mit aktiviertem Protein C (APC) signifikant verbesserte Überlebensraten zeigten (6).

Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (MIF) ist als proinflammatorisches Enzym untersucht worden und hat einen entscheidenden Einfluss auf Überlebensrate im Tiermodell zu haben (30). Hier ist auch eine Veränderung der Apoptoserate im Knock-Out-Modell beschrieben. Die Blockade der Aktivierung der Komplementkaskade, welche auch durch apoptotische Zellen geschieht, scheint ebenfalls in experimentellen Studien Überlebensvorteile zu ergeben (46;48). Apoptotische Zellen haben erhebliche thrombogene Eigenschaften im Organismus (54), dies kann zur Addition der bereits reduzierten Organperfusion führen und akzentuiert die multiple Organdysfunktion. Dieser Mechanismus selbst wiederum führt im Rahmen eines „Cirulus vitiosus“ zu einer Verstärkung der Apoptose (42). Daher wäre ein frühes Eingreifen in diese und die oben beschriebene Kaskade wahrscheinlich sehr gewinnbringend (44).

In der oben genannten Übersichtsarbeit weisen Riedemann et al.(48) auch auf eine evidente Rolle der Apoptose der Lymphozyten hin, hier scheint eine BCL-2 Überexpression und eine spezifische Blockade der Kaspase im Tiermodell Erfolg zu haben. Auch Oberholzer et al. (41) weisen auf therapeutische Optionen hin, indem zum einen Kaspasen spezifisch geblockt werden und zum anderen die Stimulation einer BCL-2 Überexpression in einer verringerten Apoptose resultieren (51). Da jedoch eine rigorose Blockade der Apoptose auch die physiologischen Vorgänge behindern würde, denn wie oben erläutert, ist Apoptose im menschlichen Organismus ein durchaus physiologischer Vorgang. Eine ungezielte Blockade des kontrollierten Zelltodes könnte daher ungeahnte Wirkungen haben, daher hoffen wir im Rahmen der vorliegenden Ergebnisse einen weiteren Baustein für künftiges Eingreifen in den septischen Organismus geliefert zu haben. Denn durch mehr Einblicke in die Regulationsprozesse können Eingriffe in den septischen Organismus in Form von der Blockade der Kaspasen, der Todesrezeptoren mit beispielsweise synthetischen Peptiden oder RNA-Applikation gegen pro-apoptotische Faktoren Erfolg haben (53).

7 Zusammenfassung

Hintergrund: In der vorliegenden Untersuchung wurde der Zusammenhang zwischen Sepsis und Apoptose von peripheren Leukozyten untersucht. Die Sepsis hat auch heute noch in der Intensivmedizin eine sehr hohe Letalität, ein multifaktorielles Geschehen liegt diesem Krankheitsbild zugrunde. Die Apoptose von peripheren Leukozyten scheint eine herausragende Rolle im Rahmen der Immunkompetenz zu spielen.

Ziel: Wir untersuchten zum einen, ob eine erhöhte Apoptoserate vorkommt und zum anderen die verschiedenen Transduktionswege im Rahmen der Apoptose, wobei hier auch die verschiedenen Lymphozytenpopulationen interessant waren.

Methoden: 16 Patienten in der schweren Sepsis, zehn Patienten kritisch kranke Intensivpatienten und elf Probanden wurden mittels Durchflusszytometrie und ELISA-Technik auf verschiedene Proteine, welche in der Apoptose eine Rolle spielen, untersucht.

Ergebnisse: Im Rahmen der Phosphatidylserinexternalisierung und des Nukleosomennachweises war es möglich eine elevierte Apoptoserate nachzuweisen. Der membrangebundene Signaltransduktionsweg über das FAS-Rezeptoren-System war in der Gruppe der septischen Patienten hochreguliert. Jedoch konnten wir nachweisen, dass der mitochondriale Weg über das BCL-2 nicht in allen Zellpopulationen signifikant betroffen war. Die gemeinsame Endstrecke über die Kaspase-3 war ebenfalls in allen untersuchten Populationen der septischen Patientengruppe signifikant höher aktiviert.

Perspektive: Diese Ergebnisse untermauern die Beobachtungen, wie die in der Sepsis auftretende Immundefizienz durch die Apoptose der immunkompeten Zellen einen wesentlichen Nachteil für den Krankheitsverlauf hat. Aus diesem Grunde gibt es bereits Untersuchungen die Apoptose in der Sepsis zu bremsen, um somit einen Überlebensvorteil zu erreichen. Jedoch sind weitere Untersuchungen über das Verständnis der Signaltransduktionswege nötig.

8 Literatur

- (1) Adrie C, Bachelet M, Vayssier-Taussat M, Russo-Marie F, Bouchaert I, Adib-Conquy M, et al. Mitochondrial membrane potential and apoptosis peripheral blood monocytes in severe human sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 Aug 1;164(3):389-95.
- (2) Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001 Jul;29(7):1303-10.
- (3) Angus DC, Wax RS. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* 2001 Jul;29(7 Suppl):S109-S116.
- (4) Ayala A, Urbanich MA, Herdon CD, Chaudry IH. Is sepsis-induced apoptosis associated with macrophage dysfunction? *J Trauma* 1996 Apr;40(4):568-73.
- (5) Belanger AJ, Scaria A, Lu H, Sullivan JA, Cheng SH, Gregory RJ, et al. Fas ligand/Fas-mediated apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells: therapeutic implications of fratricidal mode of action. *Cardiovasc Res* 2001 Sep;51(4):749-61.
- (6) Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001 Mar 8;344(10):699-709.
- (7) Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996 Jul;24(7):1125-8.
- (8) Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992 Jun;101(6):1644-55.
- (9) Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 2000;26 Suppl 1:S64-S74.
- (10) Castella X, Artigas A, Bion J, Kari A. A comparison of severity of illness scoring systems for intensive care unit patients: results of a multicenter, multinational study. The European/North American Severity Study Group. *Crit Care Med* 1995 Aug;23(8):1327-35.
- (11) Dellinger RP. Inflammation and coagulation: implications for the septic patient. *Clin Infect Dis* 2003 May 15;36(10):1259-65.
- (12) Gerlach H, Toussaint S. [Sepsis therapy--Why change-management of sepsis can lower its lethality]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2006 Oct;41(10):614-24.
- (13) Holdenrieder S, Stieber P, Bodenmuller H, Fertig G, Furst H, Schmeller N, et al. Nucleosomes in serum as a marker for cell death. *Clin Chem Lab Med* 2001 Jul;39(7):596-605.

- (14) Hotchkiss RS, Chang KC, Grayson MH, Tinsley KW, Dunne BS, Davis CG, et al. Adoptive transfer of apoptotic splenocytes worsens survival, whereas adoptive transfer of necrotic splenocytes improves survival in sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 May 27;100(11):6724-9.
- (15) Hotchkiss RS, Coopersmith CM, Karl IE. Prevention of lymphocyte apoptosis--a potential treatment of sepsis? *Clin Infect Dis* 2005 Nov 15;41 Suppl 7:S465-9.:S465-S469.
- (16) Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003 Jan 9;348(2):138-50.
- (17) Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, Jacobson A, Buchman TG, Karl IE. Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med* 1997 Aug;25(8):1298-307.
- (18) Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Matuschak GM, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med* 1999 Jul;27(7):1230-51.
- (19) Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, Chang KC, Cobb JP, Osborne DF, et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis. *J Immunol* 1999 Apr 1;162(7):4148-56.
- (20) Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, et al. Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Dec 7;96(25):14541-6.
- (21) Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, et al. Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 2002 Mar 1;168(5):2493-500.
- (22) Jacobi J. Pathophysiology of sepsis. *Am J Health Syst Pharm* 2002 Feb 15;59 Suppl 1:S3-8.:S3-S8.
- (23) Jungi TW. Flow-Zytometrie Kurs für B-D FACScan-Anwendung. 1999. Virologie Bern. Ref Type: Internet Communication
- (24) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 Aug;26(4):239-57.
- (25) King MA, Radicchi-Mastroianni MA. Antimycin A-induced apoptosis of HL-60 cells. *Cytometry* 2002 Nov 1;49(3):106-12.
- (26) Kitaura H, Nagata N, Fujimura Y, Hotokezaka H, Yoshida N, Nakayama K. Effect of IL-12 on TNF-alpha-mediated osteoclast formation in bone marrow cells: apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interaction. *J Immunol* 2002 Nov 1;169(9):4732-8.

- (27) Knaus WA, Zimmerman JE, Wagner DP, Draper EA, Lawrence DE. APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Crit Care Med* 1981 Aug;9(8):591-7.
- (28) Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol* 2003 Nov 1;171(9):4672-9.
- (29) Le TY, Pangault C, Gacouin A, Guilloux V, Tribut O, Amiot L, et al. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock* 2002 Dec;18(6):487-94.
- (30) Lehmann LE, Novender U, Schroeder S, Pietsch T, von ST, Putensen C, et al. Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are elevated in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* 2001 Aug;27(8):1412-5.
- (31) Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Aug;2(8):589-98.
- (32) Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003 Apr;31(4):1250-6.
- (33) Li-Weber M, Weigand MA, Giaisi M, Suss D, Treiber MK, Baumann S, et al. Vitamin E inhibits CD95 ligand expression and protects T cells from activation-induced cell death. *J Clin Invest* 2002 Sep;110(5):681-90.
- (34) Mahidhara R, Billiar TR. Apoptosis in sepsis. *Crit Care Med* 2000 Apr;28(4 Suppl):N105-N113.
- (35) Meduri GU, Headley AS, Golden E, Carson SJ, Umberger RA, Kelso T, et al. Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 1998 Jul 8;280(2):159-65.
- (36) Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, et al. Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med* 2002 Oct;28(10):1440-6.
- (37) Moreno R, Vincent JL, Matos R, Mendonca A, Cantraine F, Thijs L, et al. The use of maximum SOFA score to quantify organ dysfunction/failure in intensive care. Results of a prospective, multicentre study. Working Group on Sepsis related Problems of the ESICM. *Intensive Care Med* 1999 Jul;25(7):686-96.
- (38) Nebe CT. Durchflußzytometrische Meßtechnik und Datenauswertung. 1996. *Klinische Chemie*, Mannheim.
Ref Type: Internet Communication
- (39) Oberholzer A, Oberholzer C, Minter RM, Moldawer LL. Considering immunomodulatory therapies in the septic patient: should apoptosis be a potential therapeutic target? *Immunol Lett* 2001 Jan 15;75(3):221-4.

- (40) Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 2001 Aug;16(2):83-96.
- (41) Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J* 2001 Apr;15(6):879-92.
- (42) Papathanassoglou ED, Moynihan JA, McDermott MP, Ackerman MH. Expression of Fas (CD95) and Fas ligand on peripheral blood mononuclear cells in critical illness and association with multiorgan dysfunction severity and survival. *Crit Care Med* 2001 Apr;29(4):709-18.
- (43) Papathanassoglou ED, Moynihan JA, Vermillion DL, McDermott MP, Ackerman MH. Soluble fas levels correlate with multiple organ dysfunction severity, survival and nitrate levels, but not with cellular apoptotic markers in critically ill patients. *Shock* 2000 Aug;14(2):107-12.
- (44) Parrino J, Hotchkiss RS, Bray M. Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. *Emerg Infect Dis* 2007 Feb;13(2):191-8.
- (45) Pinheiro-da-Silva F, Chiamolera M, Charles N, Kanamaru Y, Velasco IT, Benhamou M, et al. B lymphocytes undergo apoptosis because of FcγRIIb stress response to infection: a novel mechanism of cell death in sepsis. *Shock* 2006 Jan;25(1):61-5.
- (46) Rajan S, Vyas D, Clark AT, Woolsey CA, Clark JA, Hotchkiss RS, et al. INTESTINE-SPECIFIC OVEREXPRESSION OF IL-10 IMPROVES SURVIVAL IN POLYMICROBIAL SEPSIS. *Shock* 2007 Nov 1.
- (47) Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med* 2001 Jul;29(7 Suppl):S121-S125.
- (48) Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003 May;9(5):517-24.
- (49) Schroeder S, Lindemann C, Decker D, Klaschik S, Hering R, Putensen C, et al. Increased susceptibility to apoptosis in circulating lymphocytes of critically ill patients. *Langenbecks Arch Surg* 2001 Feb;386(1):42-6.
- (50) Sommers MS. The cellular basis of septic shock. *Crit Care Nurs Clin North Am* 2003 Mar;15(1):13-25.
- (51) Wagner TH, Drewry AM, Macmillan S, Dunne WM, Chang KC, Karl IE, et al. Surviving sepsis: bcl-2 overexpression modulates splenocyte transcriptional responses in vivo. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007 Apr;292(4):R1751-R1759.
- (52) Weber SU, Schewe JC, Putensen C, Stuber F, Schroder S. [Apoptosis as a pathomechanism in sepsis]. *Anaesthesist* 2004 Jan;53(1):59-65.
- (53) Wesche-Soldato DE, Swan RZ, Chung CS, Ayala A. The apoptotic pathway as a therapeutic target in sepsis. *Curr Drug Targets* 2007 Apr;8(4):493-500.

- (54) Zeerleder S, Zwart B, Willemin WA, Aarden LA, Groeneveld AB, Caliezi C, et al. Elevated nucleosome levels in systemic inflammation and sepsis. *Crit Care Med* 2003 Jul;31(7):1947-51.

9 Danksagung

Zuerst möchte ich Professor Dr. med. F. Stüber für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit der Forschung danken. Dabei möchte ich nicht versäumen, mich für tatkräftige Anleitung und unermüdliche Hilfe während meiner ersten Schritte auf dem Gebiet der Wissenschaft bei Herrn Dr. med. Stefan Weber zu bedanken.

Genauso möchte ich Professor Dr. med. A. Hoeft für Schaffung der strukturellen Voraussetzungen nicht unerwähnt lassen.

Außerdem möchte dem Laborteam bestehend aus Makbule Kobilay, Sabine Mering, Dr. rer. nat. Bettina Bayerer, Dr. med. Jens-Christian Schewe, Dr. med. Malte Book, Dr. med. Sven Klaschik und Dr. med. Lutz Lehmann danken.

Auch möchte ich Julia Pochert nicht vergessen, welche mit mir zusammen die Daten der untersuchten Patienten erhoben hat.

Zuletzt möchte ich gerne den Teams der Intensivstationen unter Professor Dr. med. C. Putensen danken, welche sich Tag und Nacht um die Patienten gekümmert haben und uns in unserer Forschung unterstützt haben.

Am Schluss möchte meiner Familie zuvorderst meiner Frau Saméra für die tatkräftige und emotionale Unterstützung danken.