

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut an der
Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. Kai Zacharowski

**Systemische Endotoxinbelastung bei septischen Patienten unter
Pentaglobintherapie**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Christin Kirbach (geb. Bettge)

aus Luckenwalde

Frankfurt am Main, 2018

Dekan:	Prof. Dr. Josef Pfeilschifter
Referent:	PD Dr. med. Dr. med. habil. Alexander Koch
Korreferent/in:	Prof. Dr. med. Volkhard A. J. Kempf
Tag der mündlichen Prüfung:	10.02.2020

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	I
TABELLENVERZEICHNIS	II
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	III
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Die Sepsis	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Inzidenz und Epidemiologie	2
1.1.3 Endotoxin	3
1.1.4 Pathophysiologie.....	4
1.1.5 Blutgerinnung in der Sepsis	7
1.2 Immunologische Grundlagen.....	8
1.2.1 Angeborene und erworbene Immunität	8
1.2.2 Aufbau und Klassen der Immunglobuline	9
1.2.3 Immunglobulinklasse M	11
1.3 Stand der Forschung und Fragestellung.....	12
2 MATERIAL UND METHODIK.....	13
2.1 Studienprotokoll.....	13
2.1.1 Sepsis Kriterien	14
2.1.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien	16
2.2 Patientenkollektiv.....	16
2.3 Datenerfassung	17
2.4 Messzeitpunkte und Probengewinnung	17
2.5 Labormethoden und Geräte	19
2.5.1 EAA®	19
2.5.1.1 Testprinzip des EAA®.....	19

2.5.1.2 Materialien und Bezugsquellen	20
2.5.1.3 Ablauf der Messung.....	22
2.5.1.4 Testergebnisse	23
2.5.2 Rotationsthrombelastometrie	24
2.5.2.1 Testprinzip von Rotationsthrombelastometrie	24
2.5.2.2 Materialien und Bezugsquellen	26
2.5.2.3 Ablauf der Messung.....	27
2.5.2.4 Testergebnisse	30
2.5.3 Thrombozytenfunktionsdiagnostik	31
2.5.3.1 Funktionsweise des Multiplate®.....	32
2.5.3.2 Materialien und Bezugsquellen	33
2.5.3.3 Ablauf der Messung.....	34
2.5.3.4 Testergebnisse	36
2.6 Outcome Parameter	37
2.6.1 Primärer Endpunkt.....	37
2.6.2 Sekundäre Endpunkte	37
2.7 Statistische Methoden	37
3 ERGEBNISSE.....	38
3.1 Charakteristika der Patienten.....	38
3.2 Endotoxinaktivität und IgM-IVIg.....	41
3.3 ROTEM® und IgM-IVIg	42
3.4 Multiplate® und IgM- IVIg	43
3.5 Gerinnungsparameter.....	45
3.5.1 Thrombozytenzahl	45
3.5.2 Fibrinogenkonzentration	46
3.6 Entzündungsparameter	47
3.7 SOFA Score und unterstützende Therapien.....	48
4 DISKUSSION	50
4.1 Endotoxinaktivität und IgM-IVIg.....	50

4.2 ROTEM®, Multiplate® und IgM-IVIg.....	51
4.3 Thrombozytenzahl, Fibrinogenkonzentration und IgM-IVIg	52
4.4 Entzündungsparameter und SOFA Score	53
4.5 Limitationen	53
5 ZUSAMMENFASSUNG	55
6 ABSTRACT.....	57
7 LITERATURVERZEICHNIS	59
8 ANHANG.....	69
9 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN	82
10 LEBENSLAUF	83
11 DANKSAGUNG	85
12 SCHRIFTLICHE ERKLÄRUNG	86

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 äußere Membran eines Endotoxinmoleküls	4
Abbildung 2 Sepsiskaskade	6
Abbildung 3 Struktur eines Antikörpers am Beispiel von IgG	10
Abbildung 4 Struktur Immunglobulin M.....	11
Abbildung 5 Beobachtungszeitraum und Probengewinnung	18
Abbildung 6 Testprinzip Endotoxin- Activity- Assay®.....	20
Abbildung 7 Arbeitsplatz für Endotoxin-Activity-Assay®.....	22
Abbildung 8 Beispiel für Ausdruck der Testergebnisse des EAA®.....	23
Abbildung 9 Rotationsthrombelastometrie.....	25
Abbildung 10 Arbeitsplatz ROTEM®	27
Abbildung 11 TEMogramm.....	30
Abbildung 12 Einmalküvette des Multiplate®	32
Abbildung 13 Testprinzip Multiplate.....	33
Abbildung 14 Arbeitsplatz für Multiplate®.....	34
Abbildung 15 Multiplate Testergebnisse.....	36
Abbildung 16 Patientenfluss	39
Abbildung 17 Endotoxin Activity Assay	42
Abbildung 18 Thrombozytenzah.....	46
Abbildung 19 Fibrinogenkonzentration.....	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Kriterien für klinische Sepsisklassifizierung	15
Tabelle 2 Bestandteile der angewendeten Reagenzien für EXTEM.....	28
Tabelle 3 Bestandteile der angewendeten Reagenzien für APTEM.....	29
Tabelle 4 Bestandteile der verwendeten Reagenzien für NATEM.....	30
Tabelle 5 Testansätze Multiplate®	35
Tabelle 6 Basischarakteristika.....	40
Tabelle 7 NATEM Parameter	43
Tabelle 8 Multiplate Parameter.....	44
Tabelle 9 Entzündungsparameter	48
Tabelle 10 SOFA Scores und unterstützende Therapien	49

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
ADP	Adenosindiphosphat
ADPtest	Adenosindiphosphat aktivierte Thrombozytenfunktion
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
APACHE-II	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II Score
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
ASPItest	Arachidonsäure aktivierte Thrombozytenfunktion
AU	Aggregation Units (Aggregation)
AUC	Area Under the Curve (Fläche unter der Kurve)
BMI	Body Mass Index (Körpermasseindex)
CFT	Clot Formation Time (Gerinnselformierungszeit)
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Chronisch obstruktive Lungenerkrankung)
CRP	C- reactive- Protein (C- reaktives Protein)
CT	Clotting Time (Gerinnungszeit)
DIC	Disseminated Intravascular Coagulation (Disseminierte intravasale Gerinnung)
dl	Deziliter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

et al.	Et alii (lat. „und andere“)
GCS	Glasgow- Coma- Scale (Glasgow- Koma- Skala)
h	Stunde
HBSS	Hank´s Balanced Salt Solution
Ig	Immunglobulin
IgM- IVIg	IgM angereichertes intravenöses Immunglobulin
IL	Interleukins (Interleukine)
INR	International Normalized Ratio (Internationalisierte normalisierte Ratio)
IQR	Interquartile Range (Interquartilabstand)
ITS	Intensivstation
l	Liter
LBP	Lipopolysaccharide Binding Protein (Lipopolysaccharid bindendes Protein)
LPS	Lipopolysaccharid
MCF	Maximum Clot Firmness (Maximale Gerinnselfestigkeit)
ML	Maximum Lysis (Maximale Lyse)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm ³	Kubikmillimeter

mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
n	Anzahl der Messwerte/Patienten
NFκB	Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of activated B-Cells
nl	Nanoliter
p	p- Wert, Signifikanzniveau
PaCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PAF	Platelet Aktivating Faktor
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor (Plasminogenaktivatorinhibitor)
PAMP	Pathogen- Associated Molecular Pattern (Pathogen- assoziierte molekulare Muster)
PaO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PCT	Procalcitonin
SAPS II	Simplified Acute Physiology Score
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment Score
SOP	Standard Operating Procedure (Standardvorgehensweise)
TF	Tissue Factor (Gewebethromboplastin)
TLR	Toll- like- Receptor (Toll- like- Rezeptor)
TRAP-6	Thrombin Receptor activating Peptide (Thrombinrezeptor aktivierendes Peptid)
TRAPtest	TRAP-6 aktivierte Thrombozytenfunktion

1 Einleitung

1.1 Die Sepsis

1.1.1 Definition

Die Sepsis unterlag in den letzten Jahrhunderten verschiedenen Variationen der Begriffsdefinition. Bereits Hippokrates nahm ca. 400 v. Chr. die erste Beschreibung einer Infektion vor.

Eine erste infektiologisch- klinische Definition erfolgte 1914 von Schottmüller: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“ (1). Er beschrieb damit erstmals die Bedeutung eines Infektionsherdes als grundlegenden Bestandteil der Sepsis.

Ein stetiger Wandel in Medizin und Forschung führten zu allumfassenderen Definitionen der Sepsis. Seit der Einführung der ersten internationalen Sepsisdefinition 1992, heute als Sepsis-1 bezeichnet, unterschied man zwischen Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock. Das Vorhandensein von 2 der 4 SIRS-Kriterien und ein Infektionsverdacht war ausschlaggebend für die Schweregradeinteilung (2).

Für die Anwendung in der klinischen Praxis und für die Durchführung vergleichbarer klinischer Studien wurde 2001 durch eine Konsensuskonferenz diese Klassifikation um eine Liste mit Laborparametern und Symptomen erweitert. Demnach bestand eine Sepsis bei Vorliegen von mindestens 2 der 4 SIRS-Kriterien (siehe Kapitel 2.1.1) aufgrund einer vermuteten oder bewiesenen Infektion. Eine schwere Sepsis lag bei einer Sepsis mit Organdysfunktion vor und ein septischer Schock bei Sepsis mit

volumenrefraktärem kardiovaskulärem Versagen. Diese Definition wird heute als Sepsis-2 bezeichnet. Die vorliegende Studie wurde durchgeführt als diese noch galt (3). (siehe Kapitel 2.1.1)

Die aktuell vorliegende Definition von 2016, als Sepsis-3 bezeichnet, ist die erste empirische, datenbasierte und somit evidenzgetriebene Beschreibung der Sepsis. Demnach wird die Sepsis als Organdysfunktion bei vermuteter oder bewiesener Infektion definiert. Ein septischer Schock liegt bei infusionsrefraktärem kardiovaskulärem Versagen und einem Laktat $>2\text{mmol/l}$ als Zeichen der schweren zellulären/metabolischen Störung bei Sepsis vor. Nach dieser Definition geht jede Sepsis mit einer Organdysfunktion einher, sodass der Begriff schwere Sepsis keine Verwendung mehr findet. Der Wertsank und der Veränderung von zellulären Metabolismen wird mit dieser Definition eine wesentliche Bedeutung beigemessen (4).

1.1.2 Inzidenz und Epidemiologie

Die Sepsis in ihren unterschiedlichen Ausprägungen ist eines der häufigsten Ursachen für Morbidität und Letalität im Krankenhaus weltweit. In Deutschland erkranken pro Jahr 150 000 Menschen an einer Sepsis, davon ca. 50% an einer schweren oder einem septischen Schock (5). In Krankenhäusern der Maximalversorgung liegt die Inzidenz bei 1,3-7.9%, wobei auf chirurgischen Intensivstationen die Häufigkeit am höchsten ausfällt (6).

Trotz großer medizinischer Fortschritte, moderner Technik und medikamentöser Behandlungsmethoden ist die Letalität mit 54%- 60% bei Patienten mit einem septischen Schock in Deutschland weiterhin sehr hoch (7,8). Die schwere Sepsis und der septische Schock sind die Haupttodesursache auf Intensivstationen (9).

Des Weiteren führen der hohe therapeutische Aufwand, die diagnostischen Maßnahmen und die lange Liegedauer auf der Intensivstation zu hohen Therapiekosten von durchschnittlich 23 000 Euro pro Patient (10). Daraus

resultieren 19- 42 % der Gesamtkosten einer deutschen Intensivstation, mit etwa 1-2 Milliarden Euro jährlich (11).

1.1.3 Endotoxin

Einer der wesentlichen Auslöser einer Sepsis ist das Endotoxin. Es befindet sich der altgriechischen Bezeichnung „endo“ nach innerhalb eines Erregers. Es ist hitzeresistent und wird erst nach dem Absterben von Bakterien freigesetzt (12,13). Alle gramnegativen Bakterien weisen es als gemeinsamen Bestandteil der Zellhülle auf (14,15). Die Bakterienhülle besteht innen aus einer Zytoplasmamembran, die aus zwei Phospholipidschichten aufgebaut ist. Nach außen folgt der sogenannte periplasmatische Raum mit darauf liegender Mureinschicht.

Dieser Schicht ist eine äußere Membran aufgelagert. Hinsichtlich ihrer Lipidmatrix ist sie im Gegensatz zur Zytoplasmamembran asymmetrisch aufgebaut. Die innere Hälfte ihrer Doppelschicht ist analog zur Zytoplasmamembran aus Phospholipiden aufgebaut. In der äußeren Hälfte liegen Lipopolysaccharide (LPS) als typischer Bestandteil (16,17). Die Bezeichnung Endotoxin wird synonym verwendet. Weil es an zahlreichen physiologischen Membranfunktionen beteiligt ist, ist es essentiell für das Wachstum und Überleben von Bakterien (18).

Der Lipidanteil, das Lipid- A, ist die toxische Komponente des Endotoxins (19). Der Polysaccharidanteil wird in eine Kernregion („core“) und in eine spezifische O- Kette unterteilt (Abbildung 1) Das Lipid- A und ein Teil der Kernregion sind konserviert. Die O- spezifische Kette ist hochgradig variabel und differiert zwischen den verschiedenen bakteriellen Serotypen. Sie dient als Rezeptor für Bakteriophagen und moduliert die Komplementaktivierung (18). (Abbildung 1)

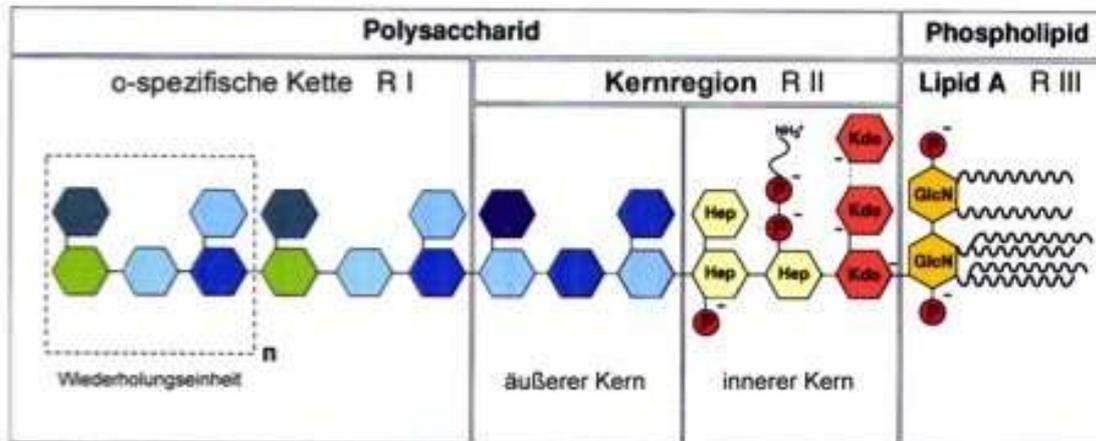


Abbildung 1 äußere Membran eines Endotoxinmoleküls (20)

Das LPS stellt ein Pathogen- assoziiertes molekulares Muster (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) dar. Es wird im Organismus von Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und signalisiert auf diesem Weg die Anwesenheit pathogener Mikroorganismen.

1.1.4 Pathophysiologie

Das klinische Bild der Sepsis wird durch das Anfachen einer Mediatorokaskade über unterschiedliche Stimuli hervorgerufen (Abbildung 2). Zu diesen Stimulanzen zählen verschiedenste Mikroorganismen, wie Viren, Pilze, Bakterien und deren Toxine. Mit 55% der Fälle sind gram-negative Erreger die häufigste Ursache (21). Diese weisen als Gemeinsamkeit das Lipopolysaccharid in ihrer Membran auf. (siehe 1.1.3)

Dringt ein gramnegatives Bakterium in den Organismus ein, interagiert LPS mit einer Reihe humoraler und zellulärer Komponenten des Wirtes. Es bindet sich an verschiedene Serumproteine, die entweder als Transporter, als Vermittler der endotoxischen Aktivität oder als neutralisierendes Potential in der Zirkulation dienen. Endotoxin wird in der Zirkulation mit hoher Affinität von einem Lipopolysaccharid- bindenden Protein (LBP) gebunden (18).

Die entstandenen LPS- LBP- Komplexe binden wiederum an membranständige CD14 Rezeptoren auf Makrophagen oder Monozyten (19). Diese führen über den transmembranären Toll- like- Rezeptor 4 (TLR4) zu einer intrazellulären Signaltransduktion. Am Ende der Transduktion steht der Nukleare Faktor (nuclear factor, NF)- κ B. Durch die Aktivierung dieses Faktors kommt es vermehrt zur Transkription von Zytokinen und Interleukinen (22). Dazu zählen vor allem Interleukin- (IL-) 1 β , IL-6, IL-8 und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) (23).

Die Abfolge von Signaltransduktion, Zellaktivierung und Mediatorenfreisetzung führt zu einer systemischen Immunantwort mit überschießender Stimulation der humoralen Immunantwort, des Komplementsystems, des Kallikrein-Kinin-Systems und des Gerinnungssystems. Darauf folgen eine Vielzahl von Reaktionen: Produktion reaktiver O₂- Verbindungen, Elastasefreisetzung, Sekretion von Lipidmediatoren (Prostanoide, Leukotriene, Plättchenaktivierender Faktor (platelet activating Faktor, PAF)), Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen und Granulozyten, sowie Freisetzung vasoaktiver Mediatoren.

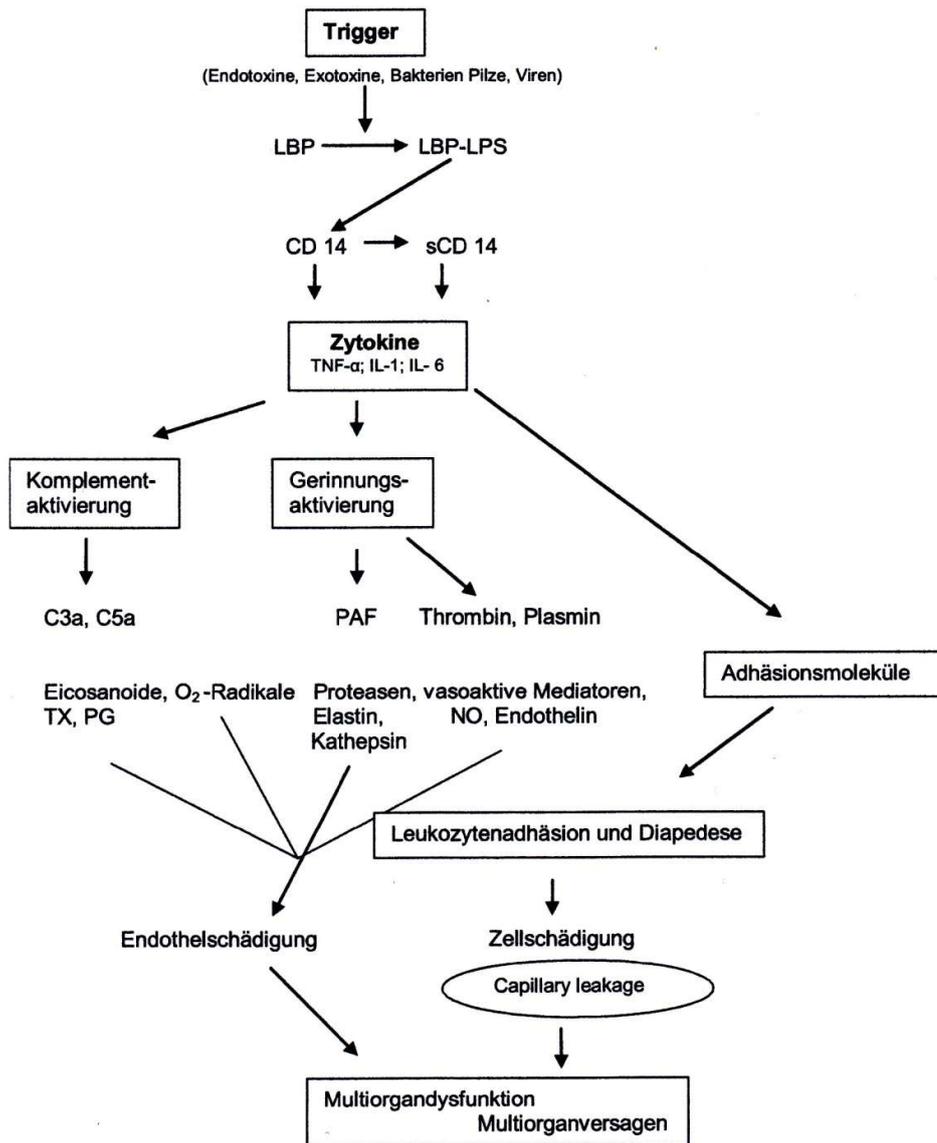


Abbildung 2 Sepsiskaskade, plättchenaktivierender Faktor (PAF), Stickoxid (NO), Thromboxan (TX), Prostaglandine (PG), Lipopolysaccharide (LPS), Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LBP-LPS), löslicher Endotoxinrezeptor (sCD14) modifiziert nach (24)

Das Zusammenspiel der komplexen Systeme führt zunächst zu einer sinnvollen Abwehrreaktion des Körpers auf den eingedrungenen pathogenen Erreger und dem Versuch der Elimination. Das Geschehen resultiert wiederum in einer unkontrollierten und überschießenden Entzündungsreaktion, wenn

kompensatorische Mechanismen versagen. Es besteht dann die Gefahr einer autodestruktiven Schädigung des Organismus mit der Ausbildung eines septischen Schocks bis hin zum Multiorganversagen.

1.1.5 Blutgerinnung in der Sepsis

Das Blutgerinnungssystem des menschlichen Organismus umfasst das thrombozytäre und das plasmatische Gerinnungssystem, das Fibrinolyse-System und das Gefäßendothel. Die komplexen Reaktionen führen zur Blutstillung bei Verletzungen und gleichzeitig auch zur Verhinderung von Thrombosen. Im physiologischen Bereich besteht zwischen prokoagulatorischer und antikoagulatorischer Hämostasereaktion eine Balance.

In der Sepsis bestehen komplexe Interaktionen zwischen inflammatorischen Prozessen und dem Gerinnungssystem (25). Die Aktivierung von Monozyten und Makrophagen durch LPS führt u.a. über die Ausschüttung von TNF- α und IL-1 zur Freisetzung verschiedener Zytokine (siehe 1.1.4) und gleichzeitig auch zur Produktion von Gewebsthromboplastin (tissue factor, TF), Plasminogenaktivator und dessen Inhibitor (plasminogen activator inhibitor, PAI) (18,26). TNF- α aktiviert zudem die Freisetzung des prokoagulatorisch wirksamen TF auf der Endothelzelloberfläche und auch die Schädigung des Endothels im Zuge des inflammatorischen Prozesses geht mit einer Störung der Blutgerinnung einher (26,27). TF führt zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade mit der Bildung von Fibringerinnsel und der Aktivierung von Thrombozyten. Der Organismus befindet sich im prokoagulatorischen Status. Um die physiologische Balance anzustreben müsste mit einer antikoagulatorischen Reaktion gegengesteuert werden.

Einige Stunden nach der TNF- α Stimulation produzieren die Endothelzellen, genau wie die Monozyten, PAI, der den Plasminogenaktivator neutralisiert und somit einen der wichtigsten Inhibitor der Fibrinolyse darstellt (28). Im Rahmen einer Sepsis kommt es durch die Gerinnungsaktivierung und gleichzeitige Hemmung der Fibrinolyse zu thrombotisch bedingten Perfusionsstörungen in

der Mikrozirkulation, mit konsekutiver Organdysfunktion (29). Ein balancierter Ausgleich zwischen Koagulation und Antikoagulation erfolgt im Rahmen einer Sepsis nicht mehr adäquat. Durch die verstärkte Gerinnung kommt es bei weiterem Fortschreiten der Sepsis zu einem Verbrauch der Gerinnungsfaktoren, der in einer Blutungsneigung aufgrund einer disseminierten intravasalen Gerinnung (Disseminated Intravascular Coagulation, DIC) resultieren und ebenfalls ein Multiorganversagen zur Folge haben kann (30).

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion kommt es durch das verzweigte Zusammenwirken verschiedenster Mediatoren untrennbar zu Sepsis assoziierten Veränderungen im Gerinnungssystem mit unterschiedlich schweren Ausprägungen.

1.2 Immunologische Grundlagen

1.2.1 Angeborene und erworbene Immunität

Dem menschlichen Organismus stehen für die Immunreaktion gegen Krankheitserreger zwei wesentliche Systeme zur Verfügung. Das eine System, die angeborene Immunität, ist für eine zeitnahe Abwehrreaktion zuständig und richtet sich unspezifisch gegen alle eindringende Pathogene. Sie agiert auf zellulärer Ebene mit Phagozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen, die mit Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (z.B. CD4-Rezeptor, Toll-like-Rezeptoren) ein breites Spektrum an Mikroorganismen binden und anschließend phagozytieren und lysieren. Die Unterscheidung zwischen körperfremden und körpereigenen Zellen erfolgt über Mustererkennungsrezeptoren (pathogen associates molekular patterns, PAMPS). Auf humoraler Ebene agiert es in der Akuten-Phase-Reaktion mit der Sezernierung Akuter-Phase-Proteine.

Dazu zählen die löslichen Proteine des Komplementsystems, die kaskadenartig aktiviert werden und zur Opsonisierung von Mikroorganismen und Bildung eines

Membranangriffkomplexes führen. Durch Zytolyse werden die Mikroorganismen auf diesem Weg direkt zerstört. Des Weiteren werden proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet die vielfältig bei der Antwort gegen pathogene Keime beteiligt sind. Das Akute-Phase-Protein CRP (c-reaktives Protein) gehört zur Gruppe der Opsonine und kann Bakterien binden und das Komplementsystem ebenfalls aktivieren. Zudem führt die Ausschüttung von Präkallikrein als Effektor des Kallikrein-Kinin-Systems zur Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung der Gefäße (31–33)

Das andere System, die erworbene Immunität, bei der die Krankheitserreger mittels Rezeptoren erkannt und eine spezifische Abwehrreaktion gegen diese eingeleitet wird. Dabei spielen B- und T-Zellen eine zentrale Rolle. Eine klonale Expansion führt zu einer spezifischen Erkennung und Abwehr von Antigenen. Dieses Vorgehen geht mit einem deutlich längeren zeitlichen Ablauf einher, ermöglicht jedoch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses mit dem eine schnellere Immunantwort bei erneuter Infektion mit demselben Erreger möglich ist (31,32).

Die Mechanismen beider Systeme sind nicht streng voneinander zu trennen, da sie eng miteinander verknüpft sind und sich gegenseitig beeinflussen.

1.2.2 Aufbau und Klassen der Immunglobuline

Bei der adaptiven Immunreaktion des Organismus können sich B-Zellen zu Plasmazellen differenzieren und lösliche Immunglobuline (Antikörper) in großen Mengen sezernieren. Die Immunglobuline sind Mukoproteine, die sich bei der Elektrophorese in der Fraktion der Gamma-Globuline finden (33,34). Sie besitzen zwei Funktionen: sie erkennen Antigene mit sehr hoher Spezifität und Affinität und lösen immunologische Effektormechanismen aus (33).

Die Immunglobuline sind große Y-förmige Proteine (Abbildung 3). Sie bestehen aus zwei molekular identischen schweren (H-Ketten) und zwei leichten (L-Ketten) Polypeptidketten, die zusammen ein achsensymmetrisches

Heterotetramer bilden. Die Ketten sind durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden (33).

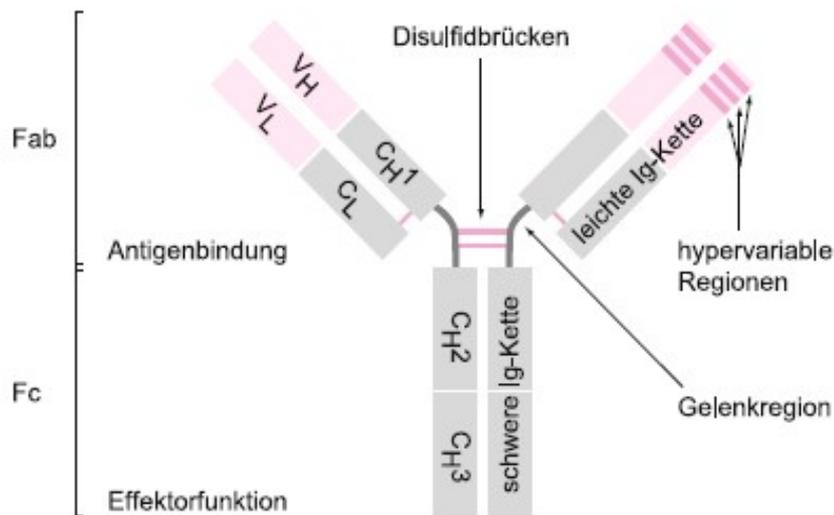


Abbildung 3 Struktur eines Antikörpers am Beispiel von IgG; H = schwere Ig-Kette; L = leichte Ig-Kette; V = variable Domäne; C = konstante Domäne; Fab = fragment of antigen binding; Fc = constant fragment (33)

Die Immunglobulinketten werden in verschiedene Domänen unterteilt. Beide, die H- und die L-Ketten, werden in Domänen der konstanten Region (bezeichnet als C_H und C_L) und Domänen der variablen Region (bezeichnet als V_H und V_L) unterteilt. Die Aminosäuresequenz der konstanten Region ist bei allen Antikörpermolekülen einer Klasse ähnlich, dagegen variiert die Sequenz der variablen Region, je nachdem gegen welches Epitop der jeweilige Antikörper gerichtet ist. Die leichten Ig-Ketten bestehen aus jeweils einer der Domänen und die schweren Ig-Ketten bestehen aus einer variablen und drei oder vier konstanten Domänen (33,34).

Die 5 Klassen der Immunglobuline, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, werden durch die H-Ketten charakterisiert. Eine spezifische Aminosäuresequenz, die als Isotyp bezeichnet wird, unterscheidet die H-Ketten voneinander. Sie werden mit den griechischen Buchstaben Alpha (α), Gamma (γ), My (μ), Epsilon (ϵ) und Delta (δ) bezeichnet. Die Einordnung als Immunglobuline, erfolgt über die

Gemeinsamkeit einer Aminosäuresequenz auf den L-Ketten. Zudem verfügen die L-Ketten auch über zwei isotypische Varianten, die mit Kappa (κ) und Lambda (λ) bezeichnet werden (33,34).

1.2.3 Immunglobulinklasse M

Das Immunglobulin M befindet sich als B-Zellrezeptor auf der Oberfläche von allen naiven B-Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten. Es ist das Immunglobulin, das bei einer Primärantwort gegen ein Antigen als erstes sezerniert wird. Für die IgM-Antwort besteht kein immunologisches Gedächtnis, daher ist ein plötzlicher IgM-Titer-Anstieg ein Hinweis auf eine kürzlich durchgemachte Erstinfektion (33,35).

Dem IgM ist es möglich ein Polymer zu bilden (Abbildung 4). Es kommt im Plasma als Pentamer oder als Hexamer vor. Dabei sind die μ -Ketten von fünf oder sechs identischen IgM-Monomeren durch eine J-Kette miteinander verbunden. Der Antikörper weist eine Molekülmasse von etwa 1000 kDa auf und verlässt die Blutbahn kaum (33,35).

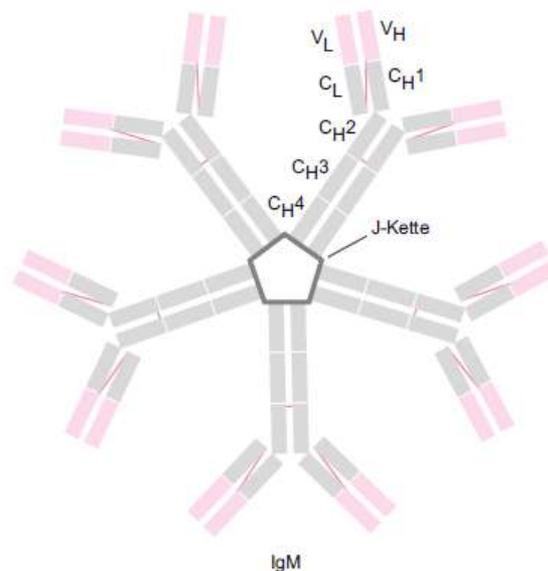


Abbildung 4 Struktur Immunglobulin M; Fünf oder Sechs IgM-Monomere werden durch eine J-Kette zu einem Pentamer oder Hexamer verbunden. V = variable Domäne; C = konstante Domäne; H = schwere Ig-Kette; L = leichte Ig-Kette (33)

Das IgM-Molekül verfügt über 10-12 identische Bindungsstellen und kann Antigene mit vielen gleichartigen umschriebenen Molekülabschnitten, wie zum Beispiel Polysaccharide, mit einer hohen Bindungsstärke binden. Die Aktivierung eines einzigen IgM-Moleküls genügt für die Auslösung der Komplementaktivierung. Ist die Kaskade in Gang gesetzt, werden Komplementfaktoren freigesetzt die mit Komplementrezeptoren, zum Beispiel auf Makrophagen, interagieren. Das gebundene Antigen wird von diesen phagozytiert (33).

1.3 Stand der Forschung und Fragestellung

Das Endotoxin wird physiologisch im menschlichen Körper durch IgM neutralisiert. Das Präparat Pentaglobin®, mit IgM-angereichertem intravenösem Immunglobulin (IgM-IVIg), ist zugelassen für die Behandlung von schweren bakteriellen Infektionen, begleitend zu einer antibiotischen Therapie. Eine der Hauptwirkungen des IgM-IVIg ist die Neutralisation von Endotoxinen im Blut. Dies ist insbesondere dem Gehalt an Immunglobulin M zuzuschreiben (36). Die IgM-IVIg vermittelte Neutralisation der Endotoxinkonzentration wurde in einem ex vivo Experiment und einer klinisch randomisiert-kontrollierten Studie nachgewiesen (37,38). Der Effekt der Neutralisation durch Immunglobulin M wurde mit dem Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test (LAL-Test) untersucht (39). Eine neue Methode zur Endotoxinmessung, der Endotoxin-Activity-Assay (EAA), kam diesbezüglich noch nicht zur Anwendung. Es hat sich gezeigt, dass der EAA präziser und weniger störanfällig ist als der LAL- Test (40).

Patienten mit einer Sepsis weisen häufig ein Ungleichgewicht zwischen dem pro- und antikoagulatorischen System auf, welches in einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) resultieren kann (41,42). Die Gerinnungsparameter, wie die international normalized ratio (INR), die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), die Thrombozytenanzahl und die Fibrinogenkonzentration, sind während einer systemischen Entzündung und Infektion beeinflusst (43–45).

Außerdem sind viskoelastische und aggregometrische Parameter verändert. Die Anwesenheit von Endotoxin in vitro und in vivo kann ROTEM® Messwerte zu einem prokoagulatorischen Status hin verändern, beispielsweise eine reduzierte Gerinnungszeit (clotting time, CT) (46,47). Weiterhin wurde ein Zusammenhang zwischen der Endotoxinaktivität und den funktionellen Gerinnungsparametern, wie Gerinnungszeit (clotting time, CT) und Gerinnselformierungszeit (clot formation time, CFT), gezeigt (48).

Mit diesen Aspekten und in vorherigen Studien dargestellten Sachverhalten ergab sich für die vorliegende Studie die Hypothese, dass bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischen Schock eine Senkung der Endotoxinaktivität unter IgM-IVIg-Therapie zu erwarten ist.

Durch den engen Zusammenhang zwischen der Endotoxinaktivität und den Veränderungen des Gerinnungssystems stellte sich eine zweite Frage: Beeinflusst eine potentielle Verminderung der Endotoxinaktivität nach IgM-IVIg-Therapie viskoelastische und aggregometrische Gerinnungsparameter?

2 Material und Methodik

2.1 Studienprotokoll

Diese prospektive, kontrollierte, Vorher-Nachher-Kohorten-Studie wurde an der Universitätsklinik Frankfurt am Main durchgeführt. Es handelt sich um eine nicht-interventionelle klinische Beobachtungsstudie.

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Johann Wolfgang von Goethe Universität (Theodor-Stern-Kai 7, 60590 Frankfurt am Main) nach den Vorgaben der Deklaration von Helsinki genehmigt und mit der Referenznummer 122/2 am 16 April 2012 abgelegt.

Die Durchführung der Studie erfolgte von Januar bis Juni 2013 auf der anästhesiologisch-operativen Intensivstation der Universitätsklinik.

Alle Patienten auf der Intensivstation wurden täglich zwischen 06:30 Uhr und 07:30 Uhr durch einen Studienarzt untersucht und auf das Vorliegen einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks hin überprüft.

2.1.1 Sepsis Kriterien

Für die klinische Einstufung eines systemischen inflammatorischen Response-Syndrom (SIRS), einer Sepsis, einer schweren Sepsis und eines septischen Schockes wurden in dieser Studie die Konsensuskriterien des American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM), entsprechend den Richtlinien der Surviving Sepsis Campaign und die Leitlinien der Deutschen Sepsis Gesellschaft verwendet (2,3,49,50). Diese Sepsisklassifizierung wird aktuell als Sepsis-2 bezeichnet. In Tabelle 1 sind die entsprechenden Klassifikationskriterien aufgeführt.

Tabelle 1 Kriterien für klinische Sepsisklassifizierung, modifiziert nach (50)

I. Sepsis

Vermutete oder gesicherte Infektion plus mindestens 2 der folgenden Zeichen für ein systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS):

- Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$)
- Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$
- Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 33\text{mmHg}$)
- Leukozytose ($\geq 12000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$)

II. Schwere Sepsis

Sepsis plus eines der folgenden Zeichen für Organdysfunktion

- absolute Thrombozytopenie von $< 100/\text{nl}$
- renale Dysfunktion: Diurese von $\leq 840\text{ml}/24\text{h}$ oder Anstieg des Serumkreatinins $\geq 2,4\text{mg}/\text{dl}$ (Männer) bzw. $\geq 2,0\text{mg}/\text{dl}$ (Frauen)
- metabolische Azidose: Base Excess $\leq 5\text{mmol}/\text{l}$ oder eine Laktatkonzentration $\geq 27\text{mg}/\text{dl}$
- akute Enzephalopathie mit einem GCS < 10 Punkte
- arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 75\text{mmHg}$ unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von $\leq 250\text{mmHg}$ unter Sauerstoffapplikation.
Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.

III. Septischer Schock

Sepsis plus eines der folgenden Zeichen für eine Hypotension, nach Ausschluss einer Hypovolämie

- systolischer arterieller Blutdruck von $\leq 90\text{mmHg}$ oder mittlerer arterieller Druck von $\leq 65\text{mmHg}$
- notwendiger Einsatz eines Katecholamins bzw. Vasopressin, um einen mittleren arteriellen Druck von 65mmHg aufrecht zu erhalten

2.1.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien

Ein Einschluss in die Studie erfolgte ab einem Alter von 18 Jahren. Beide Geschlechter wurden in die Studie eingeschlossen.

Zu den Ausschlusskriterien zählten: Schwangerschaft, eine andere antikoagulatorische Therapie außer Heparin, angeborene Koagulopathien oder Thrombophilie.

2.2 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 30 konsekutive Patienten in die Studie aufgenommen, die die Kriterien für schwere Sepsis oder septischen Schock erfüllten. Sie wurden aufgrund von Traumata, großen chirurgischen Eingriffen und postoperativen Komplikationen auf der Intensivstation behandelt.

Während der Durchführung der Studie erfolgte die Implementierung einer neuen SOP (Standard Operating Procedure) für die Behandlung von Patienten mit schwerer Sepsis/septischer Schock, in der die Anwendung von IgM-IVIg (Pentaglobin®, Biotest, Dreieich, Germany) in die Behandlung integriert wurde. Aus dieser Zäsur resultierte die Bildung von zwei Patientengruppen. Die erste Gruppe von 15 Patienten bildete die Kontrollgruppe (vorher), die zweite Gruppe von 15 Patienten die IgM-IVIg-Gruppe (nachher).

Es erfolgte eine ausführliche Aufklärung der Patienten über Inhalt und Ablauf der Studie, wenn es ihre klinische Situation zuließ. Wenn dies nicht erfolgen konnte, wurden die nächsten Angehörigen oder ihre gesetzlich benannten Betreuer aufgeklärt, welche im Sinne des mutmaßlichen Willens des Patienten die Einverständniserklärung unterzeichneten.

2.3 Datenerfassung

Die Daten der Studienpatienten wurden aus den Papierkrankenakten und dem Patienten Daten-Management-System (iMDsoft, Tel Aviv, Israel) erhoben. Zunächst erfolgte die Dokumentation schriftlich auf den Datenblättern, die im Anhang beigefügt sind.

Mit Microsoft® Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) wurde dann die Studiendatenbank programmiert und die Daten übertragen. Die Beobachtungsdaten umfassten demografische Daten wie Alter, Größe, Geschlecht und Gewicht der Patienten.

Des Weiteren erfolgten Aufzeichnungen über Vitalfunktionen, Laborparameter, Beatmungsparameter, antibiotische und hämodynamische Therapien, Art und Dosierung von prophylaktischen und therapeutischen Antikoagulanzen, die Notwendigkeit für Substitutionen von Gerinnungsfaktoren oder anderer hämostatischer Therapie. Die APACHE II, SAPS II und SOFA Score wurden aus den dokumentierten Parametern ermittelt.

2.4 Messzeitpunkte und Probengewinnung

Der Beobachtungszeitraum der Patienten umfasste vier Tage nach Studieneinschluss.

Die Analysen der Routinelaborparameter wie Blutbild, Leukozyten (Gerät XN 1000, Sysmex, Norderstedt, Deutschland), Kreatinin, Leberenzyme, PCT, CRP, IL-6 (Gerät Cobas 8000, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), INR, aPTT, Quick, Thrombozytenanzahl, Fibrinogenkonzentration (ACL Top 700, IL/Werfen Company, München, Deutschland), LBP (Immulate 2000, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Deutschland) und der Mikrobiologie erfolgten zweimal täglich um 04:00 Uhr und um 16:00 Uhr durch das Zentrallabor des Universitätsklinikums Frankfurt nach allgemein üblichen Standards.

Die Blutentnahmen für die EAA®, ROTEM® und Multiplate® Analysen erfolgten an vier aufeinander folgenden Tagen jeweils um 08:00 Uhr, 14:00 Uhr und um 20:00 Uhr. Daraus ergaben sich zwölf Abnahmezeitpunkte pro Patient zusätzlich zu den Routinelaboruntersuchungen (Abbildung 5).

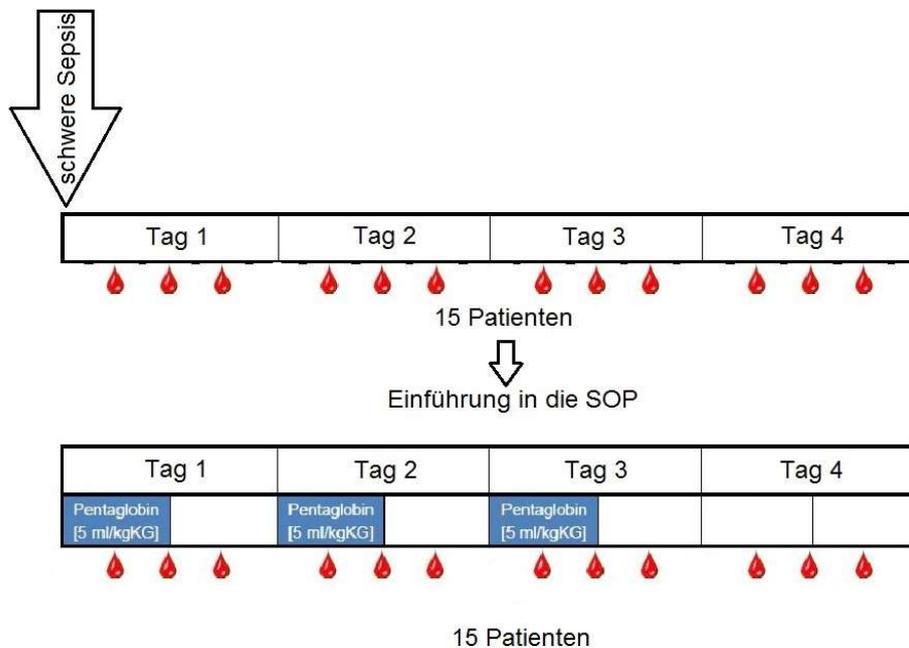


Abbildung 5 Beobachtungszeitraum und Probengewinnung

Alle Blutentnahmen erfolgten unter den hygienischen Standards der Klinik. Nach gründlicher Händedesinfektion und dem Anziehen von Einmalhandschuhen erfolgte die Desinfektion des Dreiwegehahns am vorhandenen arteriellen Zugang. Zunächst wurden 2ml Blut mit einer Spritze (Einmalspritze, 2ml, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) entnommen und verworfen, bevor die Vollblutproben für die jeweiligen Testverfahren entnommen wurden.

Es wurden den Patienten jeweils ein EDTA-Röhrchen (S-Monovette®, 2,7ml, SARSTEDT Nümbrecht, Deutschland) zur Durchführung der EAA®-Analyse, ein Zitrat-Gerinnungsröhrchen (S-Monovette®, 3 ml, SARSTEDT Nümbrecht,

Deutschland) zur Durchführung der ROTEM®-Analyse sowie ein Heparin-Röhrchen (PICO 50 Radiometer, 2ml, Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Dänemark) zur Durchführung der Multiplate®-Analyse abgenommen. Die Tests wurden im Laborraum der Intensivstation unter gleichbleibenden Bedingungen durchgeführt und innerhalb einer Stunde nach Entnahme gestartet.

2.5 Labormethoden und Geräte

2.5.1 EAA®

2.5.1.1 Testprinzip des EAA®

Der Endotoxin Activity Assay® (EAA®) ist ein in-vitro-diagnostisches Schnelltestkit, das mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper die Endotoxinaktivität in EDTA-antikoaguliertem Vollblutproben misst (51). Es ist als Point-of-Care-Test durchführbar und benötigt im Vergleich zum früher angewendeten Testverfahren LAL weniger als 30 Minuten (>2h beim LAL-Test) (40).

Das Testprinzip beruht auf zwei Effekten: Zum einen werden physiologisch radikale Sauerstoffspezies freigesetzt, wenn im menschlichen Blut Antigen-Antikörper-Komplexe und Komplement mit neutrophilen Granulozyten in Kontakt treten (oxidativer Burst). Zum anderen wird nach Kontakt mit Oxidationsmitteln ein bläuliches Licht (Chemilumineszenz) durch Luminol (3-Aminophthalhydrazid) emittiert.

In den Röhrchen des Testes befinden sich Luminol, mit humanem Komplement (C3b) opsonisiertes Zymosan und murine Anti-LPS-Antikörper der Klasse M. Zunächst induziert Zymosan über den CR3-Rezeptor an Neutrophilen eine Entzündungsreaktion, die komplementvermittelt eine Sauerstoffradikalbildung verstärkt. Bei Kontakt der EAA®-Reagenzien mit EDTA-Vollblut bindet das vorhandene Endotoxin an die Anti-LPS-Antikörper. Die gebildeten Antigen-

Antikörper-Komplexe und das komplementopsonisierte Zymosan führen zur Bildung von radikalen Sauerstoffspezies über Stimulation des CR1- und CR3-Rezeptors an neutrophilen Granulozyten. Die entstehende Oxidationsreaktion zwischen den Sauerstoffradikalen und Luminol führt zur Chemilumineszenz (Abbildung 6). Diese wird anschließend in einem photonenzählenden Luminometer detektiert (51).

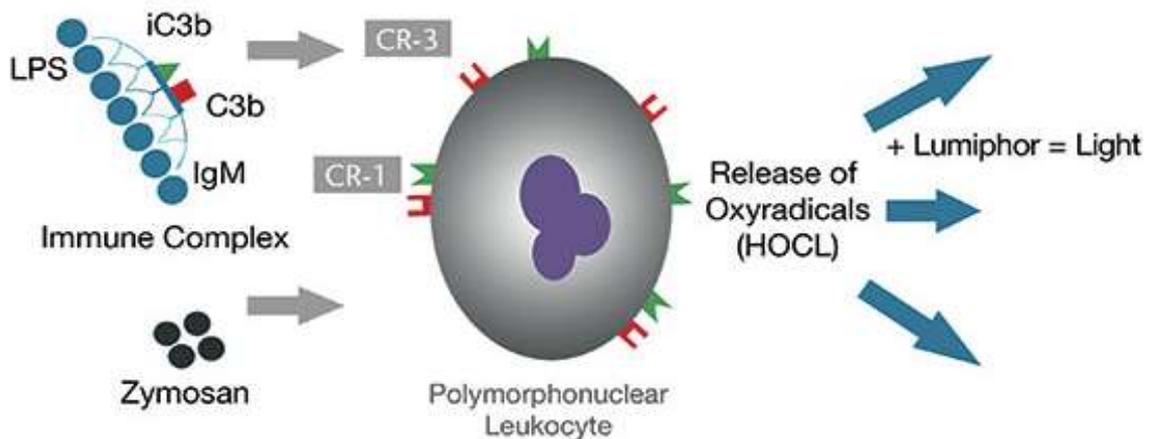


Abbildung 6 Testprinzip Endotoxin- Activity- Assay® (52)

Eine Konzentration zwischen $0,5$ und 20×10^9 Zellen/l Blut reaktionsfähige Neutrophile sind Voraussetzung für den Test. Deshalb sollte die Blutabnahme nicht länger als 2h zurückliegen (53).

2.5.1.2 Materialien und Bezugsquellen

Spectral Diagnostics Inc., Toronto, Kanada

- EAA® Reagenz, enthält EAA Reagenz, Hank's Balanced Salt Solution(HBSS)
- und Heparin
- EAA® Tray
- Röhrchen 1: Stabilisatoren und Luminol-Zymosan

- Röhrchen 2: murine monoklonale Anti-LPS-Antikörper, Stabilisatoren und Luminol-Zymosan
- Röhrchen 3: murine monoklonale Anti-LPS-Antikörper, Stabilisatoren und Luminol-Zymosan
- LPS Max Röhrchen: Endotoxin (E.coli) mit Stabilisatoren
- Aliquot Röhrchen: primär ohne Inhalt

Berthold Detection System GmbH, Pforzheim, Deutschland

- Smartline EAA Luminometer

Henry Troemner L.L.C., Thorofare, USA

- Incubating Mini Shaker
- Vortex Mixer

®Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- Reference® variabel, 10-100µl Kolbenhubpipette
- Research® variabel, 200-1000µl Kolbenhubpipette
- Multipipette® plus

STARLAB GmbH, Ahrensburg, Deutschland

- Pipettenspitze Tip One 100-1000µl
- Pipettenspitze Tip One 1-200µl

A. Menarini Diagnostics, Berlin, Deutschland

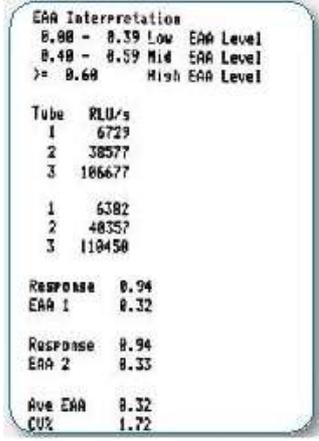
- Kurzzeitwecker

Nach dem erneuten Vortexen aller Röhrrchen erfolgte die Inkubation über 14 Minuten bei 100 Umdrehungen/min. Zur Messung im Luminometer wurde den Anweisungen auf dem Display gefolgt. Jedes Röhrrchen wurde vorher gevortext und in das Gerät eingesetzt. Nach der Messung aller Röhrrchen erfolgte die automatische Ausgabe der Testergebnisse als Ausdruck durch das Gerät und wurde mit der entsprechenden Patientenidentifikationsnummer versehen.

2.5.1.4 Testergebnisse

Zur Messung der Endotoxinaktivität wird im 1. Röhrrchen der unspezifische oxidative Burst der Neutrophilen im Patientenblut gemessen (Basalaktivität ohne spezifischen Anti-Endotoxin-Antikörper). Das 2. Röhrrchen entspricht der Testmessung und misst die Netto-Endotoxinaktivität mit dem spezifischen Antikörper. Im 3. Röhrrchen befindet sich ein Überschuss an exogenem Endotoxin und dem spezifischen Anti-LPS-Antikörper. Es wird der maximale oxidative Burst der Neutrophilen im Patientenblut gemessen. Dies dient zusätzlich als Kontrollmessung.

Der EAA®-Wert wird durch die Chemilumineszenz im 2. Röhrrchen gegen die maximale Chemilumineszenz im 3. Röhrrchen berechnet und beide werden um die Chemilumineszenz der Basalaktivität im 1. Röhrrchen korrigiert. Der Mittelwert ergibt den gemessenen EAA®-Wert (51).



EAA Interpretation	
0.00 - 0.39	Low EAA Level
0.40 - 0.59	Mid EAA Level
>= 0.60	High EAA Level

Tube	RLU/s
1	6729
2	38577
3	106677

1	6382
2	48357
3	110450

Response	0.94
EAA 1	0.32

Response	0.94
EAA 2	0.33

Ave EAA	0.32
CV%	1.72

Abbildung 8 Beispiel für Ausdruck der Testergebnisse des EAA® (54)

Die Messergebnisse werden als EAA®-Units angegeben mit Werten zwischen 0 (minimal) und 1 (maximal). Durch den Hersteller werden 3 Bereiche angegeben: <0,4 (niedrig), 0,4- 0,6 (intermediär), >0,6 (hoch), die auf empirischen Auswertungen beruhen und mit der Schwere der Sepsis, der Dosierungen von Vasopressoren und dem Outcome der Patienten korrelieren (55,56).

2.5.2 Rotationsthrombelastometrie

2.5.2.1 Testprinzip von Rotationsthrombelastometrie

Das Messverfahren der viskoelastischen Gerinnungsmessung mit der Thrombelastographie beschrieb Hartert bereits 1948 (57). Bei diesem Verfahren kann das Gerinnungssystem als ganzheitlicher dynamischer Prozess beurteilt werden. Neben den Gerinnungszeiten erfolgt auch die Erfassung der mechanischen und zeitlichen Stabilität des Blutgerinnsels. Im Vergleich zur klassischen Thrombelastographie wird bei der heute verwendeten Thrombelastometrie nicht der Cup, sondern der Pin bewegt. Dieser wird stabilisiert durch ein Präzisionskugellager. Hierdurch wird eine Minimierung von Artefakten durch Erschütterung erreicht (58,59).

Bei der Rotationsthrombelastometrie wird eine Einmalküvette (Cup, 8mm breit) mit Citratblut gefüllt und anschließend ein zylindrischer Einmal- Plastikstempel (Pin, 6mm Durchmesser) eingetaucht. Dabei verbleibt zwischen Stempel und Küvette ein 1mm breiter Spalt, der mit Blut gefüllt ist. Eine elastische Feder sorgt für eine alternierende Rotation des Pins um jeweils $4,75^\circ$. Ein am oberen Ende der Achse befindliche Spiegel reflektiert das Licht einer LED Lichtquelle. Somit wird die Rotation optisch einer lichtempfindlichen Detektionseinheit übermittelt. Die Bewegung des Pins ist unbeeinflusst, solange keine Gerinnung stattfindet. Dies registriert das System in der Darstellung einer geraden Reaktionskurve. Erfolgt eine Gerinnselbildung an Pin und Cup durch Kontaktaktivierung oder durch Zugabe von spezifischen Aktivatoren wird die

Bewegung des Pins zunehmend behindert. Je stärker die Rotation des Pins gehemmt wird, desto größer wird die Amplitude der Reaktionskurve. Bei maximaler Festigkeit des Gerinnsels beträgt die Amplitude 100 mm und die Achse rotiert nicht mehr. Diese Methode liefert Informationen über die gesamte Kinetik der Hämostase: Gerinnungszeit, Gerinnelbildung, Gerinnelstabilität und Lyse (60).

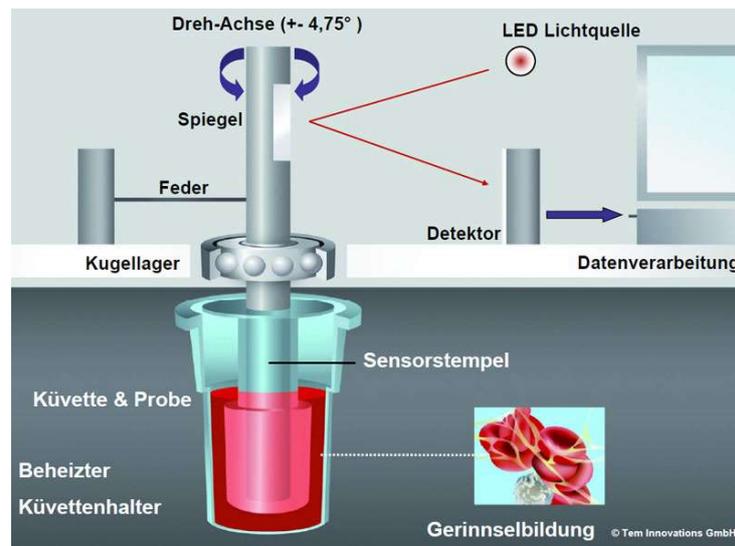


Abbildung 9 Rotationsthrombelastometrie (60)

Mit den verschiedenen Aktivatorreagenzien vom Hersteller können unterschiedliche Aspekte der Gerinnungsprozesse untersucht werden. Dazu verfügt das ROTEM®-Gerät über vier Messkanäle in denen verschiedene Messungen parallel vorgenommen werden können.

In der vorliegenden Studie wurde die EXTEM-, die APTM- und die NATM-Messung durchgeführt. Die EXTEM-Messung ermöglicht durch Resubstituieren von Calcium und Gewebethromboplasmin die Ermittlung von Gerinnelbildung, Fibrinpolymerisation und Fibrinolyse über die extrinsische Gerinnungsaktivierung. Durch eine Aprotinin-modifizierte extrinsische Gerinnungsaktivierung kann mit der APTM-Messung eine Hyperfibrinolyse identifiziert werden. Bei der NATM-Messung findet keine artifizielle

Gerinnungsaktivierung statt. Die Gerinnung wird über Kontaktaktivierung in Gang gesetzt. Diese Messung ist gegenüber allen Gleichgewichtsänderungen des Gerinnungssystems sensitiv.

2.5.2.2 Materialien und Bezugsquellen

TEM® International GmbH, München, Deutschland

- ROTEM®, Thrombelastometrie

DELL™ Technologies Inc., Texas, USA

- DELL™ Portable Computer

TEM®Innovations GmbH, München, Deutschland

- ROTEM® Cup & Pin pro (Messpin)

- hep-tem®, Reagenz für ROTEM® enthält Heparinase und CaCl₂

- ap-tem®, Reagenz für ROTEM® enthält Tranexamsäure/ Aprotinin

- r- ex-tem®, Reagenz für ROTEM® enthält Gewebethromboplasmin

-star- tem®, Reagenz für ROTEM® enthält Calciumchlorid

STARLAB GmbH, Ahrensburg, Deutschland

- Pipettenspitze Tip One 1 – 200µl



Abbildung 10 Arbeitsplatz ROTEM® (61)

2.5.2.3 Ablauf der Messung

Das ROTEM®- System besteht aus den vier Messkanälen, einem Wärmeblock (konstant 37°C) und einer zugehörigen System- Software auf einem Laptop. Zusätzlich verfügt das Gerät über eine automatische Pipette. Diese ermöglicht die exakte Überführung der jeweiligen Aktivatorreagenzien und des Patientenbluts in die Cups anhand von Pipettierprogrammen.

Nach dem Start des Systems wurden die drei benötigten Messkanäle für EXTEM, APTEM und NATEM im Dialogfeld festgelegt. Anschließend erfolgte die Eingabe der Patientenidentifikationsnummer für die spätere Speicherung der Daten.

Danach wurden die Pins auf die Achsen geschoben und die Cups in den Küvettenhalter angebracht. Im Anschluss wurden die Pipettierschritte des jeweils ausgewählten Tests abgearbeitet.

EXTEM

Zunächst wurden 20µl star-tem® Reagenz aspiriert. Nachdem ein Luftpolster geschaffen wurde, aspirierte man in dieselbe Pipettenspitze 20µl ex-tem®

Reagenz und pipettierte beides mittig in den vorbereiteten Cup. Mit einer neuen Pipettenspitze wurden 300µl Citratblut aufgenommen und hinzugefügt. Eine ausreichende Durchmischung des Testansatzes erfolgte durch nochmaliges Repipettieren, dazu wurde der gesamte Cupinhalt aufgesogen und zurück pipettiert.

Tabelle 2 Bestandteile der angewendeten Reagenzien für EXTEM (62)

Reagenz	Inhalt	Referenznummer
star- tem®Reagenz (Rekalzifizierungsreagenz)	0,2mol/l CaCl ₂ in HEPES- Puffer pH 7,4; 0,1% Natriumazid	503-01
ex- tem®Reagenz	Rekombinantes Gewebethromoplasmin und Phospholipide, Heparin- Inhibitor, Konservierungsmittel und Puffersubstanz	503-05

APTEM

Zur Durchführung dieses Tests wurden 20µl ex-tem® Reagenz aspiriert und in den vorbereiteten Cup überführt. Mit einer neuen Pipettenspitze wurden 20µl ap-tem® Reagenz aspiriert und ebenfalls in den Cup pipettiert. Im Anschluss wurden 300µl Citratblut mit einer weiteren Pipettenspitze aufgenommen und zum Testansatz hinzugefügt. Durch Repipettieren des Ansatzes wurde eine ausreichende Durchmischung erzielt.

Tabelle 3 Bestandteile der angewendeten Reagenzien für APTEM (62)

Reagenz	Inhalt	Referenznummer
ex- tem®Reagenz	Rekombinantes Gewebethromoplasmin und Phospholipide, Heparin- Inhibitor, Konservierungsmittel und Puffersubstanz	503-05
ap- tem®Reagenz	Tranexamsäure/ Aprotinin, 0,2mol/l CaCl ₂ in HEPES- Puffer pH7,4; 0,1% Natriumazid	503-04

NATEM

Der Test wurde auf Grundlage des Pipettierprogramms für den HEPTTEM- Test durchgeführt, mit dem Verzicht auf das in-tem® Reagenz. Dies bedeutete, dass beim ersten Pipettierschritt anstatt des Reagenzes Luft pipettiert wurde um den weiteren Schritten folgen zu können. Hierbei wurden 20µl hep-tem® Reagenz aspiriert und in den vorbereiteten Cup gegeben. Mit einer neuen Pipettenspitze wurden 300µl Citratblut aufgenommen und hinzugefügt. Durch Repipettieren des Ansatzes wurde eine ausreichende Durchmischung erzielt.

Tabelle 4 Bestandteile der verwendeten Reagenzien für NATEM (62)

Reagenz	Inhalt	Referenznummer
hep-tem®Reagenz (Rekalzifizierungsreagenz + Heparinase)	Heparinase I aus Flavobakterien, Konservierungsmittel (Natriumazid), Puffersubstanz, Calcium	503-08

Nachdem die jeweils letzten Pipettierschritte abgeschlossen waren, musste der Küvettenhalter mit dem Cup zügig über die Führungsstange und den Pin an die Messstation angebracht werden. Erst dann begann die Software mit der automatischen Messung.

2.5.2.4 Testergebnisse

Die aktivierten Gerinnungsabläufe werden in Echtzeit als Graphik gegen die Zeit dargestellt. Zur gleichen Zeit werden die numerischen Werte der Parameter abgebildet. Die Laufzeit der Messungen betrug 60min (Abbildung 11).

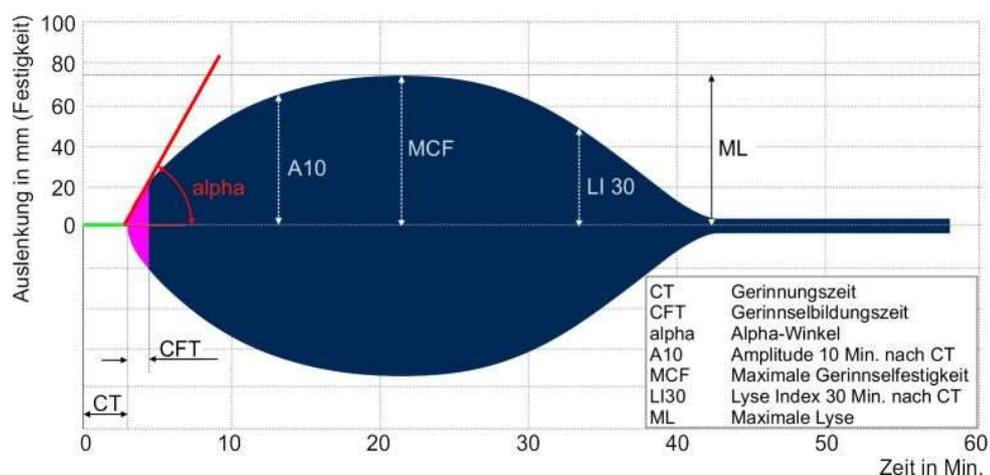


Abbildung 11 TEMogramm (63)

Zu den Gerinnungsaktivierungs- und Polymerisations-Parametern zählen die Gerinnungszeit (clotting time in [s], CT), die Gerinnselbildungszeit (clot formation time in [s], CFT) und der Alpha- Winkel (α in [°]). Die CT gibt die Zeitspanne vom Teststart bis zum Erreichen einer Amplitude von 2mm an. Die Zeit bis zu einer Gerinnselfestigkeit von 20mm wird als CFT bezeichnet. Als Maß für die initiale Geschwindigkeit der Gerinnselbildung zählt der Alpha-Winkel. Der Winkel wird zwischen der Mittellinie und der Tangente an die Kurve durch den 2mm- Amplitudenpunkt gebildet.

Die Parameter der Gerinnselfestigkeit sind unter anderem die maximale Gerinnselfestigkeit (Maximum Clot firmness in [mm], MCF) und der A10-Wert (in mm Amplitude). Dabei beschreibt die MCF die maximale mechanische Amplitude, die während der Messung erreicht wurde. Der A10-Wert gibt die Festigkeit des Gerinnsels 10 Minuten nach der CT an.

Die maximale Lyse (maximum lysis in [%], ML) und der Lyse-Index 30 (LI30 in [%]) zählen zu den Lyse-Parametern der Rotationsthrombelastometrie. Die ML während der Laufzeit wird als Differenz zwischen der MCF und der geringsten Amplitude in Prozent der MCF angegeben. Der LI30 gibt das Ausmaß der Lyse 30 Minuten nach CT an und ist der prozentuale Anteil der Gerinnselfestigkeit bezogen auf die MCF.

2.5.3 Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Das in dieser Arbeit verwendete Multiplate®- System basiert auf der multiplen Elektroden Aggregometrie und ist eine Weiterentwicklung der von Cardinal und Flower erstmals beschriebenen Methode der Impedanzaggregometrie zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion (64).

2.5.3.1 Funktionsweise des Multiplate®

Das Prinzip der Widerstandsmessung beschrieben Cardinal und Flower bereits 1980 (65). Dabei tauchen zwei Elektroden in eine Vollblutprobe und die Thrombozyten bilden eine Ummantelung um die Elektroden durch den ersten Kontakt. Zunächst zeigt sich eine konstante Leitfähigkeit zwischen den Elektroden. Zu einer weiteren Aggregation von Thrombozyten kommt es bei Zugabe der entsprechenden Reagenzien (Abbildung 12). Durch zunehmende Ummantelung der Elektroden vermindert sich der Stromfluss und der Widerstand steigt. Dies gilt als Maß für die Aggregation von Thrombozyten.

Das Impedanzaggregometer Multiplate® verfügt über fünf separate Testkanäle für parallele Messungen. Es werden Einmalküvetten verwendet (Abbildung 12). Diese bestehen aus einem Probenreservoir in das vier silberbeschichtete Sensordrähte (Durchmesser 0,3mm, Länge 3,2mm) hineinreichen. Für die Mischung der Vollblutprobe während der Messung befinden sich teflonbeschichtete Magnetrührer (800U/min) in den Einmalküvetten.

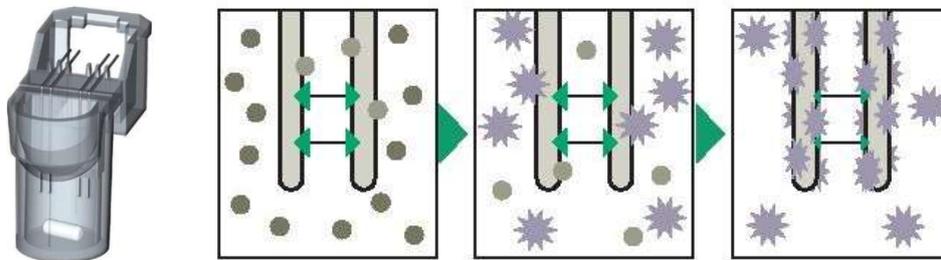


Abbildung 12 Einmalküvette des Multiplate®; Anordnung aktivierter Thrombozyten an den Messdrähten (66)

Die vier Elektroden bilden zwei unabhängige Sensoreinheiten, die die multiple Messung ermöglichen. Die zweifache Ausführung dient als interne Kontrolle und kann somit das Auftreten von systemischen Fehlern reduzieren (67).

In dieser Studie wurde die Funktion der Thrombozyten nach ex vivo Aktivierung durch die Zugabe unterschiedlicher Agonisten gemessen. Im ADPtest wird der

Vollblutprobe Adenosin- Diphosphat zugeführt und somit die Thrombozytenaktivierung über den ADP-Rezeptor induziert. Das Reagenz des ASPItests, die Arachidonsäure, ist kein direkter Aktivator der Thrombozyten. Erst die Cyclooxygenase (COX), die die Arachidonsäure als Substrat verwendet, produziert den potenten Thrombozytenaktivator Thromboxan A₂ (TXA₂). Das Thrombin Receptor Activating Peptide (TRAP-6) im TRAPtest bindet an den Thrombin-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche und führt zu einer sehr starken Thrombozytenaktivierung (Abbildung 13) (68).

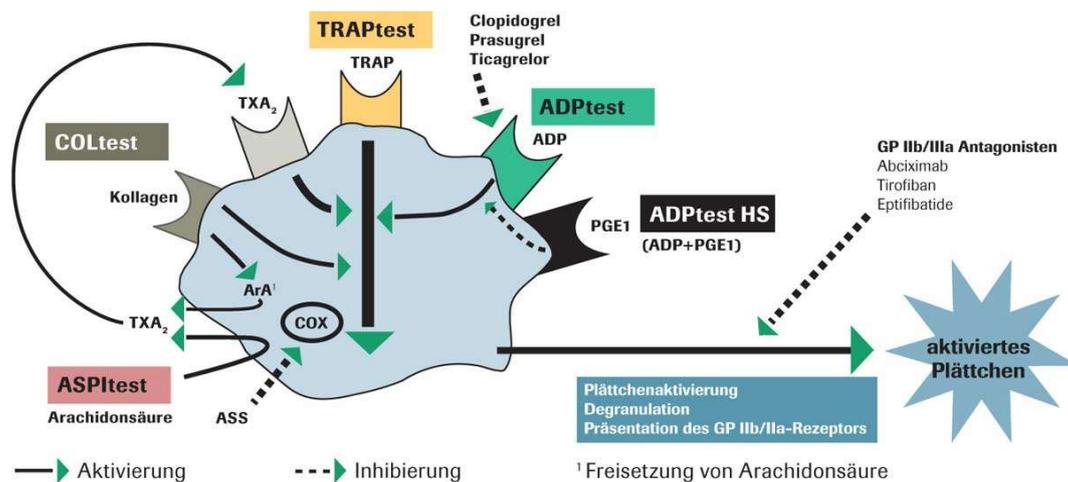


Abbildung 13 Testprinzip Multiplate (68)

2.5.3.2 Materialien und Bezugsquellen

Dynabyte GmbH, München, Deutschland

- Multiplate®, Impedanzaggregometer

Dynabyte GmbH, München, Deutschland

- Multiplate®, Messzellen

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

- ADPtest, enthält Adenosin- Diphosphat

- ASPItest, enthält Arachidonsäure
- TRAPtest, enthält Thrombin Receptor Activating Peptide

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

- Multiplate® analysis Pre-heating Tubes

B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

- Mini-Plasco® connect NaCl 0,9%, Isotone Natriumchloridlösung

STARLAB GmbH, Ahrensburg, Deutschland

- Pipettenspitze Tip One 1-200µl



Abbildung 14 Arbeitsplatz für Multiplate® (69)

2.5.3.3 Ablauf der Messung

Der Computer des Multiplate®- Systems zeigt schrittweise den Ablauf des Verfahrens in Dialogfeldern an und ist mit einer Autopipette ausgestattet.

Zu Beginn wurde die Patienten-Identifikationsnummer eingegeben und die Auswahl der durchzuführenden Messungen (ADPtest, ASPItest, TRAPtest)

getroffen und somit die Messkanäle festgelegt. Danach wurden die Einmalmesszellen in die Kanäle eingesetzt und mit dem Sensorkabel des Gerätes verbunden. Im Anschluss wurden die Pipettierschritte des Programms abgearbeitet.

Zunächst wurden 300µl einer 37°C warmen 0,9% Natriumchloridlösung aspiriert und in die erste Messzelle überführt. Dieses Vorgehen wurde für Messzelle zwei und drei wiederholt. Anschließend wurden jeweils 300µl der Patientenblutprobe nacheinander in die drei Messzellen pipettiert. Im Anschluss folgte vom Gerät eine drei- minütige Inkubationszeit bei 37°C, bei der die enthaltenen teflonbeschichteten Rührstäbe für eine konstante Durchmischung sorgten.

Nach der Inkubationszeit erfolgte die Pipettierung von je 20µl der zum jeweiligen Messkanal entsprechenden Reagenz (ADPtest, ASPItest, TRAPtest). Dabei wurde auf die Benutzung einer jeweils neuen Pipettenspitze geachtet um eine Vermischung der Reagenzien zu verhindern.

Tabelle 5 Testansätze Multiplate®

ADPtest	ASPItest	TRAPtest
300µl NaCl	300µl NaCl	300µl NaCl
300µl Vollblut	300µl Vollblut	300µl Vollblut
20µl Reagenz mit 0,2mM Adenosindiphosphat	20µl Reagenz mit 15mM Arachidonsäure	20µl Reagenz mit 1mM Thrombinrezeptor aktivierendes Peptid

Durch die Bedienung der Autopipette begannen nach dem letzten Pipettierschritt automatisch die Messzeit von sechs Minuten und die Aufzeichnung der Impedanzänderung.

2.5.3.4 Testergebnisse

Das Multiplate®-System ist mit einem Computer verbunden auf dem die Messergebnisse in einem Koordinatensystem dargestellt werden.

Die Änderung des Leitungswiderstandes durch Aggregation der Thrombozyten an den Elektroden wird in „Aggregation Units“ (AU) angegeben und auf der Ordinate aufgetragen. Auf der Abszisse erscheint die Zeit in Minuten. Die maximale Steigung der Kurve wird in AU/min angegeben und entspricht der Geschwindigkeit der Aggregationsbildung. Weiterhin wird die Fläche unter der Kurve (Area under the curve in [AU*min], AUC) abgebildet und stellt den wichtigsten Parameter der Thrombozytenfunktion dar (Abbildung 15).

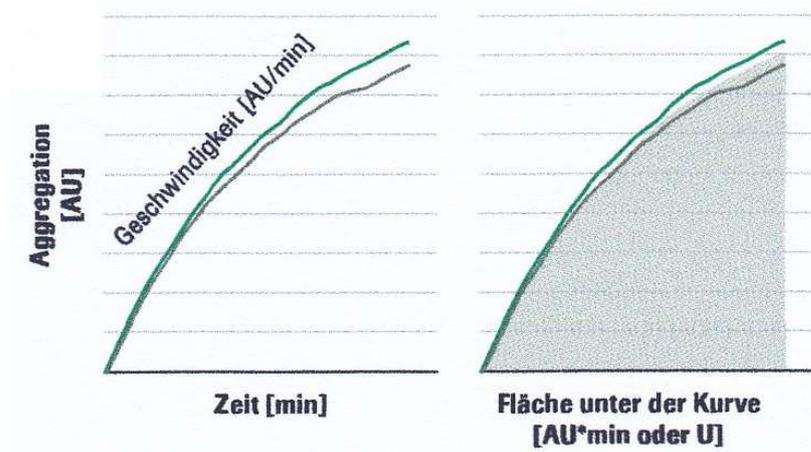


Abbildung 15 Multiplate Testergebnisse (66)

Durch die zwei unabhängigen Sensoreinheiten in den Küvetten werden zwei Kurven abgebildet. Daraus wird vom System ein Mittelwert ermittelt. Bei einer Abweichung der AUC-Werte von mehr als 20% wird eine Aufforderung zur erneuten Messung ausgegeben. Ebenso wird eine erneute Messung gefordert, wenn der Pearson-Korrelationskoeffizient unter 0,98 beträgt (70).

2.6 Outcome Parameter

2.6.1 Primärer Endpunkt

Als primären Zielparameter galt es die Wirkung einer Therapie mit IgM-IVIg auf die Endotoxinaktivität bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock zu untersuchen.

2.6.2 Sekundäre Endpunkte

Die sekundären Endpunkte konzentrierten sich zum einen auf mögliche Auswirkungen der IgM-IVIg Therapie auf funktionelle Gerinnungsparameter, gemessen mit ROTEM® und Multiplate®. Zum anderen auf konventionelle Gerinnungsparameter und Entzündungsparameter, wie INR, aPTT, Thrombozytenanzahl, Fibrinogenkonzentration, LBP, Interleukin-IL 6 und Leukozytenanzahl.

2.7 Statistische Methoden

Die vorliegende Arbeit hatte einen explorativen Charakter. Eine spezifische Fallzahlplanung war aufgrund fehlender Vorkenntnisse zur Wirkung von IgM-IVIg auf die im EAA gemessene Endotoxinaktivität nicht möglich. Bei der gewählten Fallzahl von n=30 ergeben sich für normalverteilte Endpunkte 95%-Konfidenzintervalle mit einer Spannweite unterhalb der Standardabweichung. Dies wurde für eine explorative Analyse als ausreichend genau erachtet.

Die Normalverteilung der Daten wurde mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnow-Tests überprüft. In Abhängigkeit des Ergebnisses wurden die Daten als Mittelwert (\pm SEM) oder als Median (interquartile range, IQR) angegeben.

Für die Analyse aller Parameter mit Messwiederholungen wurde eine 3-faktorielle ANOVA verwendet, in der die Einflußfaktoren Pentaglobingabe, Zeitpunkt und Tagesprofil berücksichtigt wurden. Bei nicht normalverteilten

Variablen wurden die Daten in eine Rangfolge transformiert, um die oben genannte Methode zur Anwendung zu bringen. Bei statistisch signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen kamen spezifische Post-hoc Tests zum Einsatz.

Gruppenvergleiche erfolgten für normalverteilte Variablen mit dem Students-t-Test, für nicht normalverteilte Variablen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Nominale Variablen wurden mit dem Fisher-Exact-Test auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hin überprüft.

Die Durchführung der statistischen Analysen erfolgte mit SigmaStat 3.5 und SigmaPlot 12 /Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) und zusätzlich mit SAS® (SAS Institute GmbH, Heidelberg, Germany).

Für einzelne Analysen wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen. Eine Korrektur für multiples Testen im Rahmen der Analyse von Parametern mit Messwiederholungen erfolgt nach Bonferroni-Holm.

3 Ergebnisse

3.1 Charakteristika der Patienten

Zu Beginn der Studie bestanden jeweils die Kontroll- und die IgM-IVIg-Gruppe aus 15 Patienten.

Aufgrund einer SOP Verletzung (Anwendung von IgM-IVIg nicht erfolgt) mussten zwei Patienten aus der Studie ausgeschlossen werden.

Bei zwei weiteren Patienten wurde die antikoagulatorische Therapie während der Studie auf eine von Heparin abweichende umgestellt, was zu einem nachträglichen Ausschluss führte (Abbildung 16).

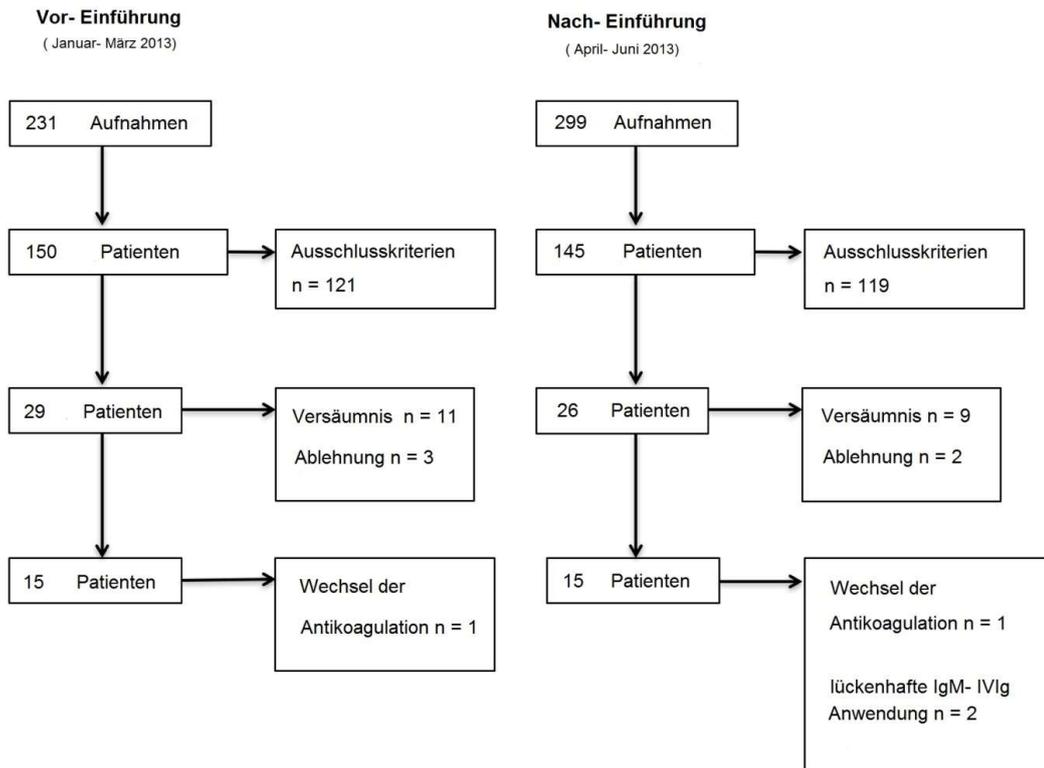


Abbildung 16 Patientenfluss; Fluss der Patienten vor (Kontrolle; n = 14) und nach (IVIg; n = 12) Einführung der Anwendung von IgM- IVIg in die SOP für die Behandlung von Patienten mit schwerer Sepsis/ septischem Schock.

Die demografischen und klinischen Daten der 26 Patienten sind in der Tabelle 6 dargestellt.

Die mit IgM-IVIg behandelten Patienten zeigten einen signifikant geringeren Body Mass Index (BMI) mit einem Median von 26,5 vs. 31,8 ($p=0,015$). Patienten der Kontrollgruppe litten vor Aufnahme auf der Intensivstation signifikant häufiger an Diabetes mellitus 35,7% vs. 0% ($p=0,03$) oder einer vorbestehenden Niereninsuffizienz 64,3 % vs. 16,7% ($p=0,019$). Die übrigen demografischen und klinischen Parameter der Patienten zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Bei Aufnahme in die Studie erfüllten n=13 (92,8%) Patienten der Kontrollgruppe und n=10 (83,3%) der IgM-IVIg Gruppe die Kriterien eines septischen Schocks.

Tabelle 6 Basischarakteristika

Parameter	Kontrolle n=14	IgM-IVIg n=12	p-Wert*
Alter in Jahren [median (IQR)]	70 (63/76)	73 (67/77)	0,959
Männlich [n (%)]	10 (71,4)	8 (66,7)	0,67
BMI [median (IQR)]	3,8 (27,5/37)	26,5 (23,5/29,5)	0,015
APACHE II [median (IQR)]	35 (30/41)	35 (31/38)	0,69
Fokus der Infektion	Lunge n=5 Abdomen n=5 Positive Blutkultur n=2 Andere n= 1 Kein Erreger n=1	Lunge n=3 Abdomen n=4 Positive Blutkultur n=1 Andere n= 2 Kein Erreger n=2	
Diabetes mellitus [n (%)]	5 (35,7)	0 (0)	0,03
Arterielle Hypertonie [n (%)]	8 (57,1)	8 (66,7)	0,464
Kardiovaskuläre Erkrankung [n (%)]	4 (28,6)	7 (58,3)	0,128
Niereninsuffizienz [n (%)]	9 (64,3)	2 (16,7)	0,019
Leberinsuffizienz [n (%)]	3 (21,4)	1 (8,3)	0,359
COPD [n (%)]	4 (28,6)	1 (8,3)	0,213
Nikotinabusus [n (%)]	3 (21,4)	1 (8,3)	0,359
Immunsuppression [n (%)]	1 (7,1)	0 (0)	0,538

BMI (Body Mass Index); APACHE II (Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II); COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease); IQR (interquartile range); IgM-IVIg (IgM-angereichertes intravenöses Immunglobulin)

3.2 Endotoxinaktivität und IgM-IVIg

Die Endotoxinaktivität bei Aufnahme in die Studie unterschied sich nicht zwischen der Kontroll- und der IgM-IVIg-Gruppe ($0,51 \pm 0,06$ vs. $0,47 \pm 0,07$).

Patienten, die eine IgM-IVIg Therapie erhielten, zeigten am ersten Behandlungstag sechs und zwölf Stunden nach Behandlungsbeginn eine signifikante Reduktion der Endotoxinaktivität ($0,26 \pm 0,07$, $p=0,01$ und $0,25 \pm 0,04$, $p=0,003$; Abbildung 17). Zusätzlich war in der IgM-IVIg-Gruppe sechs Stunden nach Behandlungsbeginn eine signifikante Reduktion der Endotoxinaktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten ($0,26 \pm 0,07$ vs. $0,43 \pm 0,07$, $p=0,04$; Abbildung 17).

Während des restlichen Beobachtungszeitraums gab es weder innerhalb noch zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede im Hinblick auf die Endotoxinaktivität. Unabhängig von den Gruppen tendierte die Endotoxinaktivität im Tagesverlauf am Morgen zu höheren und um 14.00 Uhr und 20.00 Uhr zu niedrigeren Werten.

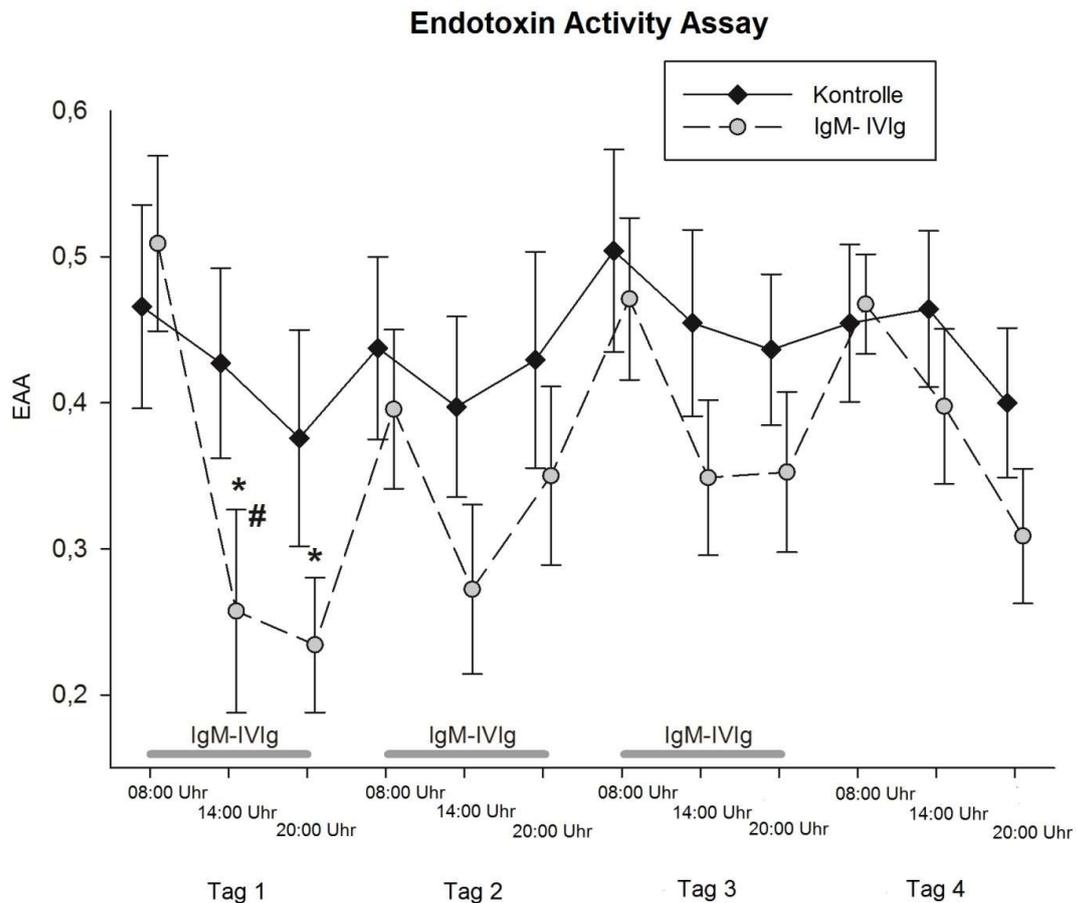


Abbildung 17 Endotoxin Activity Assay; Endotoxinlevel wurde dreimal täglich während des viertägigen Beobachtungszeitraums und der Anwendung von IgM- Immunglobulin gemessen; *, $p=0,01$ und $p=0,003$ demonstrieren jeweils die signifikante Senkung des Endotoxinlevels in der IgM-IVIg Gruppe am ersten Tag; #; $p=0,04$ kennzeichnet die signifikante Differenz zwischen der IgM-IVIg Gruppe und der Kontrollgruppe, berechnet mit dem Student's t-Test.

3.3 ROTEM® und IgM-IVIg

Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen im Hinblick auf die erhobenen viskoelastischen Messungen auf. Ebenso konnten keine Anzeichen für eine Hyperfibrinolyse im APTEM-Test nachgewiesen werden.

Während des gesamten Beobachtungszeitraumes von vier Tagen tendierten die Medianwerte der viskoelastischen Parameter des NATEM-Tests in der IgM-

IVIg- Gruppe mehr zum Prokoagulatorischen hin. Jedoch gab es auch hier keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (Tabelle 7).

Tabelle 7 NATEM Parameter

Parameter	Gruppe	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
CFT (sec) [Median (IQR)]	Kontrolle	299 (198/654)	408 (279/647)	387 (271/591)	328 (229/546)
	IgM-IVIg	238 (147/367)	173 (125/286)	201 (147/306)	177 (143/276)
CT (sec) [Median (IQR)]	Kontrolle	900 (681/1084)	1051 (847/1358)	1046 (903/1082)	953 (840/1137)
	IgM-IVIg	697 (552/981)	724 (615/1185)	839 (613/1218)	788 (660/1334)
α -angle (°) [Median (IQR)]	Kontrolle	44 (27/55)	34 (24/48)	37 (27/47)	46 (31/57)
	IgM-IVIg	58 (42/65)	61 (48/67)	57 (44/64)	61 (50/65)
MCF (mm) [Median (IQR)]	Kontrolle	53 (41/67)	54 (42/66)	52 (42/62)	47 (31/62)
	IgM-IVIg	63 (58/69)	63 (58/69)	67 (59/72)	71 (63/75)

CFT (clot formation time); CT (clotting time); MCF (mean clot firmness); IQR (interquartile range); IgM-IVIg (IgM-angereichertes intravenöses Immunglobulin); Kontrollgruppe n=14; IgM-IVIg-Gruppe n=12 (Tag 1 und 2), n=11 (Tag 3) und n=10 (Tag 4), keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen

3.4 Multiplate® und IgM- IVIg

In den aggregometrischen Parametern des ASPI, ADP und TRAP fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 8).

Tabelle 8 Multiplate Parameter

Parameter	Gruppe	ASPI- Test (AUC in AU*Min) [Median (IQR)]		ADP- Test (AUC in AU*Min) [Median (IQR)]		TRAP- Test (AUC in AU*Min) [Median (IQR)]	
		Kontrolle	IgM-IVIg	Kontrolle	IgM-IVIg	Kontrolle	IgM-IVIg
	Uhrzeit (h:min)						
Tag 1	08:00	627 (474,5/1412)	1153 (879/1455,5)	286 (191/722,5)	736,5 (547,5/1015,5)	1063 (335/1922)	1363,5 (741/1687,5)
	14:00	661,5 (322/948)	1090 (738/1239)	359,5 (188/707)	709 (389/904)	1400,5 (595/1837)	1247 (1025/1491)
	20:00	667,5 (357/1216)	960 (605/1079)	261,5 (189,5/628)	542,5 (397,5/884,5)	1328,5 (611/1919)	1051,5 (815/1549,5)
Tag 2	08:00	510,5 (205/893)	944 (865/1446)	232 (88/389)	718 (450/943)	1177 (531/1832)	1594 (1190/2165)
	14:00	659 (239/1068)	838 (646/1021)	370,5 (159/514)	565 (431/634)	1548,5 (735/1795)	1462 (1194/1841)
	20:00	428,5 (188/1209)	785 (484/1138)	335,5 (150/565)	614 (395/716)	1217,5 (788/1882)	1210 (1011/1691)
Tag 3	08:00	438,5 (282,5/1054)	747 (189/1083)	235 (127/657)	731 (422/795)	1055 (576/1631)	1470 (1200/1576)
	14:00	278 (184/1243)	839,5 (310/1076,5)	276 (175/684)	396,5 (170/766)	1137 (915/1873)	1332 (822/1549)
	20:00	722 (238/1402)	827 (556/1240,5)	237 (144/740)	729 (476,5/870,5)	1308 (630/1845)	1332,5 (916,5/1672,5)
Tag 4	08:00	552 (187/1277)	807 (535/1033,5)	257 (144/525)	653,5 (404/800,5)	1334,5 (820/1819,5)	1394 (1074,5/1776)
	14:00	388,5 (66,5/1395)	726,5 (364/993,5)	354,5 (166/564)	820,5 (501/898,5)	1281,5 (1008,5/1826,5)	1270,5 (912,5/1714)
	20:00	721 (135/1251)	726 (524,5/1296,5)	308 (186/676)	684,5 (354,5/835,5)	1308 (992/1576)	1641,5 (1260,5/1885,5)

ASPI (Arachidonsäure); ADP (Adenosindiphosphat); TRAP (Thrombin Receptor Activating Peptide); AUC (Area Under the Curve); AU* Min (Aggregation Units pro Minute); IQR (interquartile range); IgM- IVIg (IgM-angereichertes intravenöses Immunglobulin); Kontrollgruppe n=14; IgM-IVIg- Gruppe n=12; keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen

3.5 Gerinnungsparameter

Bei den routinemäßig erhobenen Gerinnungsparametern INR, aPTT und Prothrombinzeit zeigten sich innerhalb des Beobachtungszeitraums keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.5.1 Thrombozytenzahl

Bei Aufnahme in die Studie unterschieden sich die Patienten in beiden Gruppen nicht im Hinblick auf die mittlere Thrombozytenzahl (159/nl±31 vs. 188/nl±23, p=0,478).

Im Beobachtungszeitraum zeigten die Patienten der Kontrollgruppe im Vergleich zur IgM-IVIg-Gruppe einen kontinuierlichen Abfall der Thrombozytenzahl mit einem signifikant niedrigeren Wert am vierten Tag (87/nl±20 vs. 200/nl±43, p=0,016; Abbildung 18).

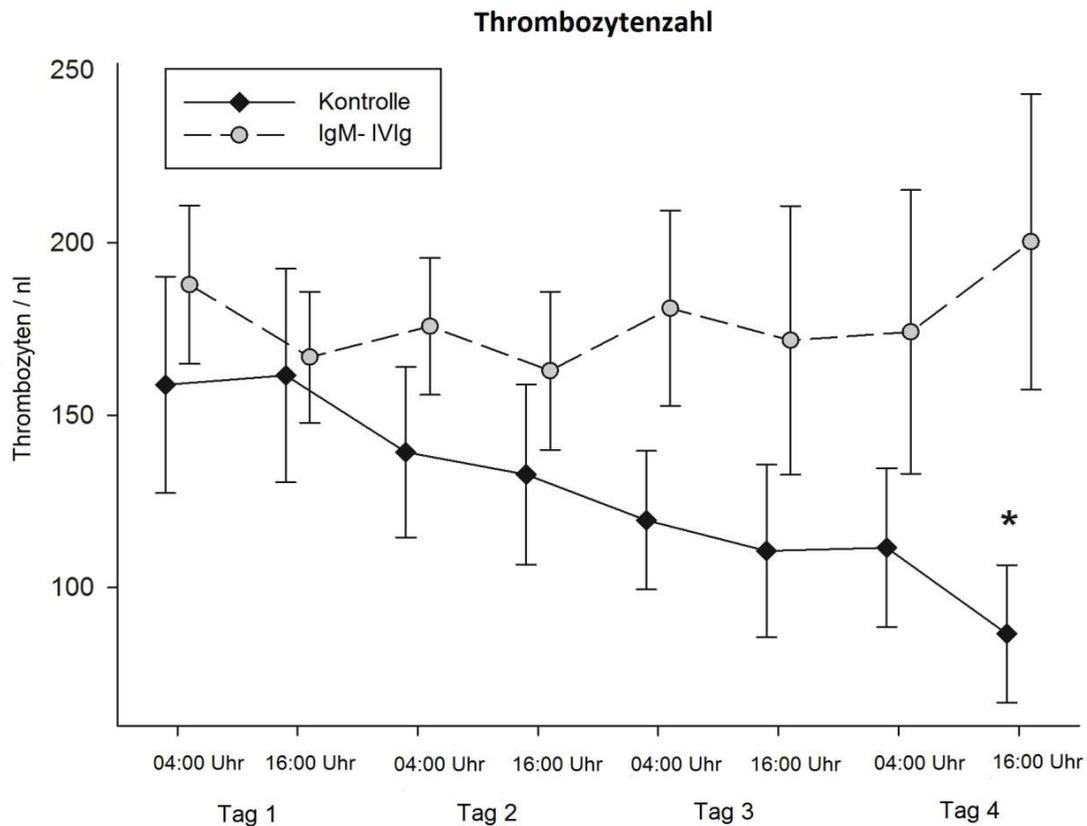


Abbildung 18 Thrombozytenzahl; Thrombozytenzahl wurde zweimal täglich während des viertägigen Beobachtungszeitraumes und der Behandlung mit IgM-angereicherten Immunglobulin (IgM-IVIg) gemessen; *, $p=0,016$ kennzeichnet die signifikante Differenz zwischen den Gruppen am Ende des Beobachtungszeitraumes, berechnet mit dem Student's t-Test.

3.5.2 Fibrinogenkonzentration

Beim Einschluss in die Studie gab es zwischen den Gruppen keinen Unterschied in der Fibrinogenkonzentration ($363\text{mg/dl}\pm 52$ vs. $403\text{mg/dl}\pm 66$, $p=0,64$).

In den nachfolgenden Messungen zeigten Patienten der IgM-IVIg-Gruppe an Tag zwei ($311\text{mg/dl}\pm 37$ vs. $475\text{mg/dl}\pm 47$, $p=0,015$) und an Tag vier ($307\text{mg/dl}\pm 35$ vs. $420\text{mg/dl}\pm 16$, $p=0,017$; Abbildung 19) ein signifikant höhere Fibrinogenkonzentration als Patienten der Kontrollgruppe.

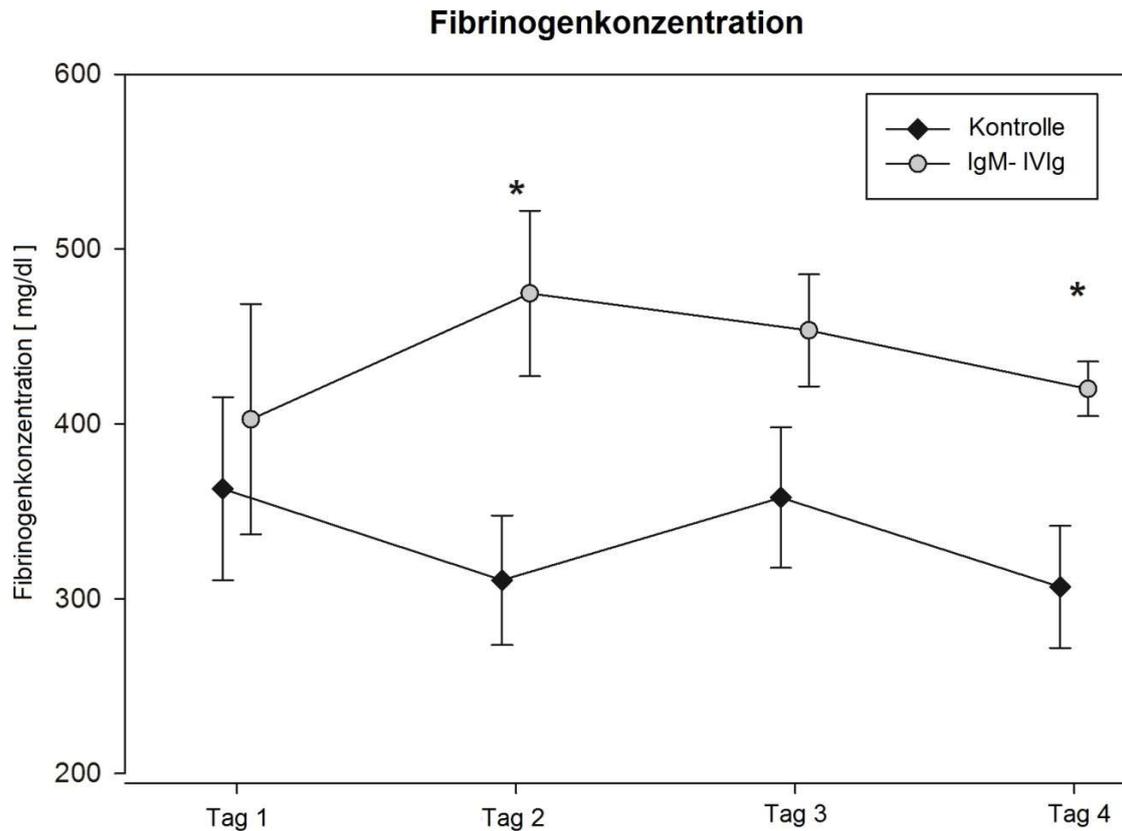


Abbildung 19 Fibrinogenkonzentration; Die Fibrinogenkonzentration wurde einmal täglich während des viertägigen Beobachtungszeitraumes und der Behandlung mit IgM- angereicherten Immunglobulin (IgM-IVIg) gemessen; *, kennzeichnet die signifikante Differenz zwischen den Gruppen an Tag 2 ($p=0,016$) und Tag 4 ($p=0,017$), berechnet mit dem Student's t-Test.

3.6 Entzündungsparameter

Die Entzündungsparameter beider Gruppen sind in der Tabelle 9 dargestellt.

Patienten der IgM-IVIg-Gruppe hatten bei Einschluss in die Studie einen signifikant höheren LBP Wert mit einem Median von 41,1 vs. 23,3 ($p=0,034$). Im weiteren Verlauf des Beobachtungszeitraums unterschieden sich die LBP Werte nicht mehr signifikant.

Im Hinblick auf die Leukozytenzahl oder das IL-6 zeigten sich während des gesamten Beobachtungszeitraums keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Tabelle 9 Entzündungsparameter

Parameter	Gruppe	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
LBP [$\mu\text{g/l}$] [Median (IQR)]	Kontrolle	23,3* (19,3/29,5)	36,2 (19,1/53,2)	26,5 (19,2/40,7)	19,2 (15,4/26,5)
	IgM-IVIg	41,1* (38,4/46,3)	36,1 (33,5/51,2)	32,0 (24,1/33,3)	28,0 (16,6/31,8)
IL-6 [$\text{pg}/\mu\text{l}$] [Median (IQR)]	Kontrolle	312,5 (22,2/1850,5)	422,6 (73,9/1033,2)	142,9 (70,1/674,7)	75,9 (42,5/331,5)
	IgM-IVIg	478,6 (159,2/1025,4)	322,4 (164,7/805,7)	125,4 (88,9/541,3)	99,5 (80,3/529,0)
Leukocytes [/ n l] [Median (IQR)]	Kontrolle	15,1 (8,6/20,7)	15,6 (9,8/24,0)	15,5 (12,0/28,3)	13,7 (10,4/19,6)
	IgM-IVIg	15,2 (7,1/23,2)	15,5 (10,6/16,3)	15,4 (9,7/20,0)	11,7 (7,6/16,2)

LBP (lipopolysaccharide binding protein); IL-6 (interleukin- 6); IQR (interquartile range); IgM-IVIg (IgM-angereichertes intravenöses Immunglobulin); Kontrollgruppe n=14; IgM-IVIg-Gruppe n=12 (Tag 1 und 2), n=11 (Tag 3) und n=10 (Tag 4); * p=0,034, berechnet mit dem Mann-Whitney-Test

3.7 SOFA Score und unterstützende Therapien

Die Werte des SOFA Score und die Anzahl der notwendigen unterstützenden Therapien während des gesamten Beobachtungszeitraumes finden sich in

Tabelle 10. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den oder innerhalb der Gruppen.

Tabelle 10 SOFA Scores und unterstützende Therapien

		Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
SOFA	Kontrolle	10,6 ±1,2	9,8 ±1,4	10,1 ±1,4	9,5 ±1,6
	IgM-IVIg	11,7 ±0,9	10,3 ±0,8	9,4 ±1,2	7,0 ±1,8
Vasopressive Therapie [n (%)]	Kontrolle	13 (92,8)	11 (78,6)	10 (71,4)	8 (57,1)
	IgM-IVIg	10 (83,3)	10 (83,3)	5 (45,4)	4 (40,0)
Beatmungs- therapie [n (%)]	Kontrolle	13 (92,8)	13 (92,8)	11 (78,6)	11 (78,6)
	IgM-IVIg	12 (100,0)	10 (83,3)	8 (72,7)	6 (60,0)
Dialyse [n (%)]	Kontrolle	5 (35,7)	7 (50,0)	9 (64,3)	9 (64,3)
	IgM-IVIg	4 (33,3)	4 (33,3)	5 (45,4)	4 (40,0)

SOFA (Sequential Organ Failure Assessment); IgM-IVIg (IgM-angereichertes intravenöses Immunglobulin); Kontrollgruppe n=14; IgM-IVIg-Gruppe n=12 (Tag 1 und 2), n=11 (Tag 3) und n=10 (Tag 4); keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bei der Berechnung mit dem Student's T-Test oder mit dem Exakten Test nach Fisher.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Studie bestand darin die potentielle Wirkung eines IgM-angereicherten Immunglobulins (Pentaglobin®) auf die Endotoxinaktivität von Patienten mit schwerer Sepsis zu untersuchen. Die Untersuchung der Effekte der IgM-IVIg Therapie auf die funktionellen Gerinnungsparameter der Thrombelastometrie, der Aggregometrie und der konventionellen Gerinnungsparameter wurde zusätzlich durchgeführt. Weiterhin wurden die Effekte auf Entzündungsparameter, wie LBP, IL- 6 und Leukozytenzahl überprüft.

4.1 Endotoxinaktivität und IgM-IVIg

Wir beobachteten eine signifikante Reduktion der Endotoxinaktivität am ersten Tag der IgM-IVIg Anwendung in der IgM-IVIg Gruppe. Im Vergleich zur Kontrollgruppe, war sechs Stunden nach Behandlung die Endotoxinaktivität signifikant niedriger. Während des weiteren Beobachtungszeitraumes gab es keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Jedoch tendierte die Endotoxinaktivität zu niedrigeren Werten in der IgM-IVIg Gruppe.

Diese Erkenntnisse zu interpretieren gestaltet sich schwierig, weil die Effekte der IgM-IVIg Therapie auf die Endotoxinaktivität vorher noch nicht untersucht wurden. Die Dosierung am zweiten und dritten Tag der Behandlung könnte unzureichend gewesen sein, entweder wegen eines Sättigungseffektes oder einer Steigerung der Endotoxinaktivität nach dem Beginn einer antibiotischen Behandlung. Ein gering ausgeprägter täglicher Abfall der Endotoxinaktivität ist auch in der Kontrollgruppe zu beobachten gewesen. Dies könnte einem zirkadianen Effekt auf die Endotoxinaktivität, in Ergänzung zu den möglichen Effekten der IgM-IVIg Behandlung, zuzuschreiben sein.

Die Wirkungen des IgM-IVIg auf die Endotoxinkonzentration nach Endotoxinapplikation wurde meist für Tiermodelle beschrieben, bei denen Endotoxin und IgM-IVIg in enger Abfolge verabreicht wurde und mit kurzen

Beobachtungszeiträumen (37,71,72). Die meisten bisherigen Studien an Menschen konzentrierten sich auf Neugeborene und Frühgeborene, die sich in ihrer Immunreaktion von Erwachsenen unterscheiden, oder an neutropenischen Patienten (39,73,74). Studien die Erwachsene mit schwerer Sepsis oder septischen Schock untersuchten, fanden Unterschiede in den klinischen „Outcomes“ während der Behandlung mit IgM-IVIg. Buda et al. untersuchten die Effektivität von IgM-IVIg auf die Verringerung der Gesamtmortalität bei septischen Patienten nach Herzoperationen. In deren IgM-IVIg-Gruppe befanden sich Patienten mit Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in Bezug auf die Gesamtmortalität. Jedoch konnte gezeigt werden das die Untergruppe der Patientin mit einer schweren Sepsis eine signifikant geringere Mortalitätsrate aufwies. Auch Rodriguez et al. untersuchten die Auswirkung von IgM-IVIg auf die Mortalitätsrate bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock. Sie konnten zeigen, dass sich die Mortalitätsrate bei Anwendung von IgM-IVIg gesenkt hat und das Überleben chirurgischer Patienten verbessert werden konnte (75,76).

Behre et al. unterschied zwischen „non-responder“ und „responder“ bei septischen Patienten mit Neutropenie während die hämatologische Malignität auf die Endotoxinaktivität nach der Behandlung mit IgM-IVIg basierte (39). In der vorliegenden Studie wurden die Patienten nicht auf ein potentielles Nicht-Ansprechen auf die Therapie mit IgM-IVIg untersucht. Deshalb könnten die Ergebnisse von „non-respondern“ in den Gruppen beeinflusst sein.

4.2 ROTEM®, Multiplate® und IgM-IVIg

Wir fanden keine signifikante Differenz in den viskoelastischen und aggregometrischen Messungen (EXTEM, APTTEM, NATTEM oder ASPI-, ADP-, und TRAP- Test) zwischen den Gruppen während des Beobachtungszeitraum, wengleich eine Reduktion der Endotoxinaktivität beobachtet werden konnte.

Endotoxin ist nicht nur ein Auslöser des angeborenen Immunsystems zur Aktivierung der Monozyten, Makrophagen und Granulozyten, mit einer Freisetzung zahlreicher Zytokine, es führt auch zu einem Anstieg von zirkulierendem Gewebsthromboplastin (tissue factor). Zusammen mit Faktor VIIa kommt es zu einer Aktivierung des Faktor IX und Faktor X, dies führt zu einer Thrombinbildung (77). Bei Patienten mit einem frühen SIRS oder Sepsis korrelieren die viskoelastischen Parameter (zum Beispiel: CT, CFT, MCF und α -Winkel) im NATEM Test mit der Endotoxinaktivität (48). Wir nahmen jedoch nur Patienten in die Studie auf, die bereits eine schwere Sepsis oder septischen Schock entwickelt hatten. Dadurch wählten wir vermutlich Patienten aus, die schon für eine längere Zeit an einer andauernden systemischen Infektion litten. Die prokoagulatorische Phase die mit dem frühen Stadium einer systemischen Infektion assoziiert ist tendiert wahrscheinlich bei manchen Patienten zu einem Zustand der disseminierten intravaskulären Gerinnung, was nachgewiesen zu eher antikoagulatorischen Messwerten bei den thromboelastometrischen Parametern führt (78,79).

Man könnte weiter spekulieren, dass in den fortgeschrittenen Stadien der Sepsis, Wechsel im Gerinnungssystem bereits profund sind, sodass allein die Elimination von Endotoxin nicht ausreichend ist um die Auswirkungen auf die viskoelastischen Parameter bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischen Schock aufzuheben.

4.3 Thrombozytenzahl, Fibrinogenkonzentration und IgM-IVIg

Die Routinegerinnungsparameter unterscheiden sich signifikant, sowohl in Bezug auf die Fibrinogenkonzentration als auch auf die Thrombozytenzahl während des viertägigen Beobachtungszeitraumes. Bei Nagetieren zeigten beide Parameter einen Abfall nach der Auseinandersetzung mit Endotoxin (43,80). Die Thrombozytenzahl blieb in der IgM-IVIg-Gruppe im Laufe der Zeit stabil. Man könnte spekulieren, dass die IgM-IVIg-Therapie eine Sepsis assoziierte Thrombozytopenie beeinflussen könnte. In einem Tiermodell fanden

Hofmann et al. einen reduzierten Abfall der Thrombozytenzahl bei Hamstern nach einer gleichzeitigen Verabreichung von Endotoxin und IgM-IVIg (72). Thrombozytopenie oder ein Abfall der Thrombozytenzahl von 30% oder mehr bei schwer kranken Patienten, unabhängig von der Ursache, sind unabhängige Prädiktoren für die Letalität auf der Intensivstation (81,82).

Die reduzierte Thrombozytenaktivierung könnte genauso den Unterschied in der Fibrinogenkonzentration erklären, den wir zwischen den Gruppen gesehen haben, weil die Thrombozytenaktivierung zu einem Verbrauch von Fibrinogen durch die Gerinnungsbildung führt (83).

Unsere Daten könnten andeuten das der Effekt des IgM-IVIg ein Grund sein könnte für eine Verminderung der Endotoxin vermittelten Thrombozytenaktivierung und die anschließende Auslösung einer Entzündung und Gerinnungsbildung und nicht zu einer reinen Elimination von Endotoxin aus dem Blutstrom.

4.4 Entzündungsparameter und SOFA Score

Zu Beginn der Studie zeigten der APACHE II, der SOFA Score, die Entzündungsmarker, außer das LBP, keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Während des Weiteren Beobachtungszeitraumes konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen oder in den Gruppen beobachtet werden. Deshalb können wir nicht verschiedene Schweregrade der Sepsis während des Beobachtungszeitraumes bedenken.

4.5 Limitationen

Die vorliegenden Daten unterliegen verschiedenen Limitationen, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden müssen. Die Stichprobengröße ist als eher gering einzustufen und muss sorgsam bedacht werden. Zudem wurden die Patienten nicht auf das potentielle Nicht-Ansprechen auf die IgM-IVIg-Therapie untersucht. Das mögliche

Vorhandensein von „non-respondern“ in den Patientengruppen könnte die Ergebnisse beeinflusst haben.

Weiterhin viel ein geringer täglicher Abfall der Endotoxinaktivität auch in der Kontrollgruppe auf. Es erfolgte während der Messungen der Laborparameter keine Messung des Kortisols, mit dem man einen zirkadianen Effekt erklären könnte. Die vorliegende Studie hat lediglich einen explorativen und deskriptiven Charakter und bewertet, aufgrund der geringen Fallzahl, nicht das klinische „Outcome“ von Patienten.

5 Zusammenfassung

Die Sepsis ist mit einer hohen Letalität im Krankenhaus verbunden. Ein wesentlicher Auslöser der Sepsis ist das Endotoxin. Es führt zu Entzündungsreaktionen im Organismus mit Ausbildung eines septischen Schocks bis hin zum Multiorganversagen. Zudem führt es zu Veränderungen im Gerinnungssystem mit unterschiedlich schweren Ausprägungen. Das Endotoxin wird physiologisch im menschlichen Körper durch IgM neutralisiert. In dieser Studie wurde der Effekt von IgM angereichertem intravenösen Immunglobulin auf die Endotoxinaktivität untersucht. Zusätzlich wurden die Auswirkungen einer IgM-IVIg-Therapie auf Entzündungsparameter und auf viskoelastische und konventionelle Gerinnungsparameter betrachtet. Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock auf einer anästhesiologisch-chirurgischen Intensivstation wurden rekrutiert. Nach dem Studieneinschluss von 15 Patienten erfolgte die Implementierung einer neuen SOP, in der die Anwendung von IgM-IVIg (5g/kg/d für 3 Tage) integriert wurde. Daraus bildeten sich eine Kontroll- und eine IgM-IVIg Gruppe. Der Beobachtungszeitraum umfasste 4 Tage. Es wurde der Endotoxin Activity Assay® (EAA®) zur Messung der Endotoxinaktivität an Vollblutproben durchgeführt. Die durchgeführte Rotationsthembelastometrie ROTEM® diente neben der Messung der Gerinnungszeiten auch zur Erfassung der mechanischen und zeitlichen Stabilität eines Blutgerinnsels. Als Maß für die Aggregation von Thrombozyten diente die Impedanzaggregometrie Multiplate®. Die Routinelaborparameter wurden nach allgemeinem Standard erhoben. Eingeschlossen wurden die Daten von 26 Patienten. Die IgM-IVIg-Gruppe zeigte am ersten Tag, 6 und 12 Stunden nach Behandlungsbeginn, eine Reduktion der Endotoxinaktivität ($0,51 \pm 0,06$ vs. $0,26 \pm 0,07$, $p < 0,05$) und unterschied sich signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe 6 Stunden nach Behandlungsbeginn ($0,26 \pm 0,07$ vs. $0,43 \pm 0,07$, $p < 0,05$). Die Thrombozytenzahl war signifikant höher in der IgM-IVIg-Gruppe im Beobachtungszeitraum ($200/\text{nl} \pm 43$ vs. $87/\text{nl} \pm 20$, $p < 0,05$). Die Fibrinogenkonzentration war in der Kontrollgruppe am zweiten ($311\text{mg/dl} \pm 37$ vs. $475\text{mg/dl} \pm 47$ ($p = 0,015$)) und am vierten Tag ($307\text{mg/dl} \pm 35$ vs. $420\text{mg/dl} \pm 16$

($p=0,017$) signifikant niedriger. Es konnten keine Unterschiede in den thromboelastometrischen oder aggregometrischen Untersuchungen, oder bei den Entzündungsparametern beobachtet werden. Die präsentierten Ergebnisse müssen aufgrund der geringen Stichprobengröße sorgsam interpretiert werden. Dennoch könnten die Ergebnisse die Basis für weitere Studien in der Zukunft sein, die auf IgM-IVIg als eine therapeutische Option bei Patienten mit einer hohen Endotoxinaktivität abzielen. In der vorliegenden Studie fanden wir Hinweise, dass eine IgM-IVIg-Therapie bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock die Endotoxinaktivität vermindert. Zudem scheint IgM-IVIg bei o.g. Patienten eine pathognomonische Thrombozytopenie positiv zu modellieren.

6 Abstract

Sepsis remains associated with a high mortality rate in hospitals. Endotoxin is known to be one of the main causes of a sepsis. It leads to inflammatory reactions in the human body which ultimately might lead to a septic shock and multiple organ failure. Moreover, Endotoxin has been shown to influence coagulation parameters to a varying extent. Endotoxin is neutralized by IgM in the human body.

This study evaluated the effects of IgM-enriched Immunglobulin on Endotoxin activity, inflammatory markers, viscoelastic and conventional coagulation parameters.

Fiveteen patients in a ICU with a severe sepsis and a septic shock were included in the study. The application of IgM-IVI (5mg / kg/ d over three days) was now integrated into a newly set up SOP. This generated a “control group” and a “IgM-IVI”group. Patients were observed for 4 days. Endotoxin Activity Assay (EAA) was performed on whole blood to measure endotoxinactivity. Thrombelastometry (ROTEM) was performed in order to test coagulation time as well as the mechanical and temporal stability of coagula. Lastly, impedance aggregometry (Multiplate) was performed on whole blood as a measure for platelet aggregation. All routine laboratory parameters were determined according to unit’s standards.

Data of 26 patients were included. On day one, EA decreased significantly after 6 and 12 hours of treatment in the IgM-IVIg group (0.51 ± 0.06 vs. 0.26 ± 0.07 , $p < 0.05$) and differed significantly in comparison to the control group six hours after the start of the treatment (0.26 ± 0.07 vs. 0.43 ± 0.07 , $p < 0.05$). Within the IgM-IVIg group platelet count was significantly higher during the entire period under observation ($200/\text{nl} \pm 43$ vs. $87/\text{nl} \pm 20$, $p < 0.05$). The fibrinogen concentration was significantly lower in the control group on day two ($311\text{mg/dl} \pm 37$ vs. $475\text{mg/dl} \pm 47$ ($p = 0.015$)) and day four ($307\text{mg/dl} \pm 35$ vs.

420mg/dl \pm 16 (p=0.017). No differences in thrombolastometric or aggreometric measurements, or inflammatory markers were observed.

Due to the small sample, the presented results must be interpreted carefully. The results, however, provide a basis for further studies on IgM-IVIg as a treatment for patients with high EA. IgM-IVIg reduces EA and seems to positively affect pathognomonic thrombocytopenia among patients with a severe sepsis or septic shock.

7 Literaturverzeichnis

1. Schottmüller H. Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verh Dtsch Ges Inn Med.* 1914;31:257.
2. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, 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;101(6):1644-1655.
3. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003;31(4):1250-1256. doi:10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B.
4. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-810. doi:10.1001/jama.2016.0287.
5. Brunkhorst FM, Gastmeier P, Kern W, et al. Prevention and follow-up care of sepsis. 1st revision of S2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V., DSG) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin, DIVI). *Internist (Berl).* 2010;51(7):925-932. doi:10.1007/s00108-010-2663-9.
6. Panknin HT, Schwemmler K. Sepsis und Multiorganversagen in der Chirurgie. *Krankenpfl J.* 1999;37(7-8):265-270.
7. Engel C, Brunkhorst FM, Bone H-G, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* 2007;33(4):606-618. doi:10.1007/s00134-006-0517-7.
8. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med.* 2000;26 Suppl 1:S64-74.

9. Bone RC. A critical evaluation of new agents for the treatment of sepsis. *JAMA*. 1991;266(12):1686-1691.
10. Moerer O, Rossi L de, Rossaint R, Burchardi H. Epidemiologische und ökonomische Aspekte der Sepsis. In: Werdan K, Schuster H-P, Müller-Werdan U, eds. *Sepsis und MODS*. 4., vollständig überarbeitete und aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer Medizin; 2005:135-150.
11. Schmid A, Burchardi H, Clouth J, Schneider H. Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. *Eur J Health Econ*. 2002;3(2):77-82. doi:10.1007/s10198-002-0095-8.
12. Pfeiffer R. Untersuchungen über das Cholera Gift. *Medical Microbiology und Immunology*. 1892;(11):393-412.
13. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, et al. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J*. 1994;8(2):217-225.
14. Raetz CR. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem*. 1990;59:129-170. doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.001021.
15. Rietschel ET, Brade H, Brade L, et al. Lipid A, the endotoxic center of bacterial lipopolysaccharides: relation of chemical structure to biological activity. *Prog Clin Biol Res*. 1987;231:25-53.
16. Heinzmann WR, ed. *Kurzlehrbuch medizinische Mikrobiologie und Immunologie: Zur Vorbereitung auf das 1. Staatsexamen*. 2.th ed. Stuttgart, New York: Schattauer Verlag; 1999.
17. Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U, eds. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 3., illustriert: Springer-Verlag; 2013.
18. Zabel P. Endotoxinbindende Proteine, Antiendotoxinantikörper. In: Werdan K, Schuster H-P, Müller-Werdan U, eds. *Sepsis und MODS*. 4., vollständig

- überarbeitete und aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer Medizin; 2005:190-205.
- 19.Hahn H, Miksits K, Bhakdi S. Infektion: Ablauf einer Infektion: Pathogenese und Rolle der Virulenzfaktoren. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U, eds. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 5., vollständig aktualisierte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2005:21-34. *Springer-Lehrbuch*.
- 20.Marina Freudenberg und Chris Galanos - Über 40 Jahre Forschung rund um Bakterienabwehr. <https://www.gesundheitsindustrie-bw.de/de/fachbeitrag/aktuell/marina-freudenberg-und-chris-galanos-ber-40-jahre-forschung-rund-um-bakterienabwehr/>. Accessed November 12, 2016.
- 21.Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit Care Med*. 1998;26(12):2078-2086.
- 22.Heine H, Rietschel ET, Ulmer AJ. The Biology of Endotoxin. *MB*. 2001;19(3):279-296. doi:10.1385/MB:19:3:279.
- 23.Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2013;50(1):23-36. doi:10.3109/10408363.2013.764490.
- 24.Schuster H-P, ed. *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen*. 3., vollständig überarbeitete und erw. Aufl. Berlin, New York: Springer; 2000.
- 25.Levi M, van der Poll T, Cate H ten, van Deventer SJ. The cytokine-mediated imbalance between coagulant and anticoagulant mechanisms in sepsis and endotoxaemia. *Eur J Clin Invest*. 1997;27(1):3-9.
- 26.Bevilacqua MP, Pober JS, Majeau GR, Cotran RS, Gimbrone MA, JR. Interleukin 1 (IL-1) induces biosynthesis and cell surface expression of procoagulant activity in human vascular endothelial cells. *J Exp Med*. 1984;160(2):618-623.

27. Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit.* 2005;11(3):RA76-85.
28. Brückmann M, Riewald M, Huhle G. Der Einfluss von Zytokinen auf die Endothelzellfunktion: ds Endothel als Motor der Sepsis? In: Werdan K, Schuster H-P, Müller-Werdan U, eds. *Sepsis und MODS*. 4., vollständig überarbeitete und aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer Medizin; 2005:487-493.
29. Cobas-Meyer M, Depka M von. Labordiagnostik der mit der Sepsis assoziierten Hämostasestörung. In: Werdan K, Schuster H-P, Müller-Werdan U, eds. *Sepsis und MODS*. 4., vollständig überarbeitete und aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer Medizin; 2005:503-510.
30. Taylor FB, JR, Wada H, Kinasewitz G. Description of compensated and uncompensated disseminated intravascular coagulation (DIC) responses (non-overt and overt DIC) in baboon models of intravenous and intraperitoneal *Escherichia coli* sepsis and in the human model of endotoxemia: toward a better definition of DIC. *Crit Care Med.* 2000;28(9 Suppl):S12-9.
31. Kaufmann SHE. Grundbegriffe. In: Hahn H, Kaufmann SHE, Schulz TF, Suerbaum S, eds. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 6., komplett überarbeitete Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag; 2009:37-39. *Springer-Lehrbuch*.
32. Murphy KM, Travers P, Walport M, eds. *Janeway Immunologie*. 7., Aufl. 2009. Korrigierter Nachdruck 2014. Berlin: Springer Berlin; 2014. Lehrbuch.
33. Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie*. 2. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verl; 2009.
34. Johnson AG. *Immunologie auf 70 Seiten*. Stuttgart, New York: Thieme; 2001.

35. Kaufmann SHE. Antikörper und ihre Antigene: Aufbau der Immunglobuline. In: Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U, eds. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 5., vollständig aktualisierte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2005. *Springer-Lehrbuch*.
36. Trautmann M, Held TK, Susa M, et al. Bacterial lipopolysaccharide (LPS)-specific antibodies in commercial human immunoglobulin preparations: superior antibody content of an IgM-enriched product. *Clin Exp Immunol*. 1998;111(1):81-90.
37. Oesser S, Schulze C, Seifert J. Protective capacity of a IgM/IgA-enriched polyclonal immunoglobulin-G preparation in endotoxemia. *Res Exp Med (Berl)*. 1999;198(6):325-339.
38. Schedel I, Dreikhausen U, Nentwig B, et al. Treatment of gram-negative septic shock with an immunoglobulin preparation: a prospective, randomized clinical trial. *Crit Care Med*. 1991;19(9):1104-1113.
39. Behre G, Schedel I, Nentwig B, Wormann B, Essink M, Hiddemann W. Endotoxin concentration in neutropenic patients with suspected gram-negative sepsis: correlation with clinical outcome and determination of anti-endotoxin core antibodies during therapy with polyclonal immunoglobulin M-enriched immunoglobulins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36(10):2139-2146.
40. Marshall JC, Walker PM, Foster DM, et al. Measurement of endotoxin activity in critically ill patients using whole blood neutrophil dependent chemiluminescence. *Crit Care*. 2002;6(4):342-348.
41. Levi M. Pathogenesis and treatment of disseminated intravascular coagulation in the septic patient. *J Crit Care*. 2001;16(4):167-177. doi:10.1053/jcrc.2001.30666.
42. Simmons J, Pittet J-F. The coagulopathy of acute sepsis. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2015;28(2):227-236. doi:10.1097/ACO.000000000000163.

43. Ishikawa A, Hafter R, Graeff H. Disseminated intravascular coagulation (DIC) after endotoxin infusion into the common bile duct of rabbits (author's transl). *Res Exp Med (Berl)*. 1979;175(3):233-238.
44. Milbrandt EB, Reade MC, Lee M, et al. Prevalence and significance of coagulation abnormalities in community-acquired pneumonia. *Mol Med*. 2009;15(11-12):438-445. doi:10.2119/molmed.2009.00091.
45. Kawai K, Hiramatsu T, Kobayashi R, et al. Coagulation disorder as a prognostic factor for patients with colorectal perforation. *J Gastroenterol*. 2007;42(6):450-455. doi:10.1007/s00535-007-2027-y.
46. Spiel AO, Mayr FB, Firbas C, Quehenberger P, Jilma B. Validation of rotation thrombelastography in a model of systemic activation of fibrinolysis and coagulation in humans. *J Thromb Haemost*. 2006;4(2):411-416. doi:10.1111/j.1538-7836.2006.01715.x.
47. Zacharowski K, Sucker C, Zacharowski P, Hartmann M. Thrombelastography for the monitoring of lipopolysaccharide induced activation of coagulation. *Thromb Haemost*. 2006;95(3):557-561. doi:10.1160/TH05-06-0420.
48. Koch A, Meesters MI, Scheller B, Boer C, Zacharowski K. Systemic endotoxin activity correlates with clot formation: an observational study in patients with early systemic inflammation and sepsis. *Crit Care*. 2013;17(5):R198. doi:10.1186/cc12892.
49. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2004;32(3):858-873.
50. Reinhart K, Brunkhorst F, Bone H, et al. Diagnose und therapie der sepsis: S2-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). *Anaesthesist*. 2006;55 Suppl 1:43-56.

51. Spectral Diagnostics Inc. *Spectral Diagnostics Incorporated Endotoxin Activity Assay: Zur Bestimmung der Endotoxinaktivität in humanen Vollblutproben*; EPIBv2G-05. Accessed November 12, 2016.
52. EAA Prinzip. <http://www.spectraldx.com/researchers.html>.
53. Romaschin AD, Harris DM, Ribeiro MB, et al. A rapid assay of endotoxin in whole blood using autologous neutrophil dependent chemiluminescence. *J Immunol Methods*. 1998;212(2):169-185.
54. Spectral Diagnostics Inc. *EAA (Endotoxin Activity Assay) Instructions for Use*. Accessed December 2, 2016.
55. Marshall JC, Foster D, Vincent J-L, et al. Diagnostic and prognostic implications of endotoxemia in critical illness: results of the MEDIC study. *J Infect Dis*. 2004;190(3):527-534. doi:10.1086/422254.
56. Monti G, Bottiroli M, Pizzilli G, et al. Endotoxin activity level and septic shock: a possible role for specific anti-endotoxin therapy? *Contrib Nephrol*. 2010;167:102-110. doi:10.1159/000315924.
57. HARTERT H. Blutgerinnungsstudien mit der Thrombelastographie; einem neuen Untersuchungsverfahren. *Klin Wochenschr*. 1948;26(37-38):577-583.
58. Lang T, Depka M von. Diagnostische Möglichkeiten und Grenzen der Thrombelastometrie/-graphie. *Hamostaseologie*. 2006;26(3 Suppl 1):S20-9.
59. Jackson GNB, Ashpole KJ, Yentis SM. The TEG vs the ROTEM thromboelastography/thromboelastometry systems. *Anaesthesia*. 2009;64(2):212-215. doi:10.1111/j.1365-2044.2008.05752.x.
60. Thromboelastometrie, TEG®, Gerinnungsstörungen. <https://www.rotam.de/methodik/thromboelastometrie/>. Accessed October 13, 2016.

61. ROTEM. <http://www.asdiagnostics.co.uk/products/poc.php>. Accessed October 13, 2016.
62. ROTEM delta Reagenzien, Reagenzienportfolio, Einmalreagenzien. <https://www.rotem.de/produkte/rotem-delta/reagenzien/>. Accessed December 2, 2016.
63. ROTEM. <https://www.rotem.de/methodik/rotem-delta-und-sigma-analyse/>.
64. Toth O, Calatzis A, Penz S, Losonczy H, Siess W. Multiple electrode aggregometry: a new device to measure platelet aggregation in whole blood. *Thromb Haemost.* 2006;96(6):781-788.
65. Cardinal DC, Flower RJ. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood. *J Pharmacol Methods.* 1980;3(2):135-158.
66. Roche Diagnostics Deutschland GmbH. *Multiplate_Analyzer_Einleger_2_2AK.indd: Multiplate Testprinzip Ergebnisse mit hoher Prädiktivität*; 2012. Accessed December 2, 2016.
67. Sibbing D, Braun S, Jawansky S, et al. Assessment of ADP-induced platelet aggregation with light transmission aggregometry and multiple electrode platelet aggregometry before and after clopidogrel treatment. *Thromb Haemost.* 2008;99(1):121-126. doi:10.1160/TH07-07-0478.
68. Roche Diagnostics Deutschland GmbH. Multiplate® Analyzer - Gerinnungsdiagnostik. <https://www.roche.de/diagnostics/systeme/gerinnungsdiagnostik/multiplate-analyzer.html#Merkmale>. Accessed October 13, 2016.
69. Roche Diagnostics Deutschland GmbH. Multiplate® Analyzer - Gerinnungsdiagnostik. <https://www.roche.de/diagnostics/systeme/gerinnungsdiagnostik/multiplate-analyzer.html#Merkmale>.

70. Calatzis A, Loreth RM, Spannagl M. *Thrombozytenfunktionsanalyse mit dem Multiplate- System: Anwendung und Interpretation*; 2007. Accessed December 2, 2016.
71. Barratt-Due A, Sokolov A, Gustavsen A, et al. Polyvalent immunoglobulin significantly attenuated the formation of IL-1beta in Escherichia coli-induced sepsis in pigs. *Immunobiology*. 2013;218(5):683-689. doi:10.1016/j.imbio.2012.08.268.
72. Hoffman JN, Fertmann JM, Vollmar B, Laschke MW, Jauch KW, Menger MD. Immunoglobulin M-enriched human intravenous immunoglobulins reduce leukocyte-endothelial cell interactions and attenuate microvascular perfusion failure in normotensive endotoxemia. *Shock*. 2008;29(1):133-139.
73. El-Nawawy A, El-Kinany H, Hamdy El-Sayed M, Boshra N. Intravenous polyclonal immunoglobulin administration to sepsis syndrome patients: a prospective study in a pediatric intensive care unit. *J Trop Pediatr*. 2005;51(5):271-278. doi:10.1093/tropej/fmi011.
74. Capasso L, Borrelli AC, Parrella C, et al. Are IgM-enriched immunoglobulins an effective adjuvant in septic VLBW infants? *Ital J Pediatr*. 2013;39:63. doi:10.1186/1824-7288-39-63.
75. Buda S, Riefolo A, Biscione R, et al. Clinical experience with polyclonal IgM-enriched immunoglobulins in a group of patients affected by sepsis after cardiac surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2005;19(4):440-445. doi:10.1053/j.jvca.2005.05.003.
76. Rodriguez A, Rello J, Neira J, et al. Effects of high-dose of intravenous immunoglobulin and antibiotics on survival for severe sepsis undergoing surgery. *Shock*. 2005;23(4):298-304.
77. Hoffman M, Monroe DM3. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost*. 2001;85(6):958-965.

78. Brenner T, Schmidt K, Delang M, et al. Viscoelastic and aggregometric point-of-care testing in patients with septic shock - cross-links between inflammation and haemostasis. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2012;56(10):1277-1290. doi:10.1111/j.1399-6576.2012.02750.x.
79. Sivula M, Pettila V, Niemi TT, Varpula M, Kuitunen AH. Thromboelastometry in patients with severe sepsis and disseminated intravascular coagulation. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2009;20(6):419-426. doi:10.1097/MBC.0b013e32832a76e1.
80. Iba T, Nakarai E, Takayama T, Nakajima K, Sasaoka T, Ohno Y. Combination effect of antithrombin and recombinant human soluble thrombomodulin in a lipopolysaccharide induced rat sepsis model. *Crit Care*. 2009;13(6):R203. doi:10.1186/cc8210.
81. Moreau D, Timsit J-F, Vesin A, et al. Platelet count decline: an early prognostic marker in critically ill patients with prolonged ICU stays. *Chest*. 2007;131(6):1735-1741. doi:10.1378/chest.06-2233.
82. Levi M, Schultz M. Coagulopathy and platelet disorders in critically ill patients. *Minerva Anesthesiol*. 2010;76(10):851-859.
83. Gawaz MP. 2. Thrombozyten und primäre Homöostase, 5. Labordiagnostik. In: Gawaz MP, ed. *Das Blutplättchen: Physiologie, Pathophysiologie, Membranrezeptoren, antithrombozytäre Wirkstoffe und antithrombozytäre Therapie bei koronarer Herzerkrankung : 31 Tabellen*. Stuttgart, New York: Thieme; 1999:4-24; 42-53.

8 Anhang

Informationen für Betreuerin/Betreuer

Systemische Endotoxin-Belastung bei septischen Patienten unter Pentaglobintherapie (DEEP-Trial)

Sehr geehrte Angehörigen bzw. gesetzliche Betreuer!

Einleitung

Der von Ihnen betreute Patient leidet an einer systemischen, d.h. den gesamten Körper betreffenden Entzündung. Eine systemische Entzündung kann auftreten nach Operationen, Verletzungen, Infektionen, etc. In Abhängigkeit des Schweregrades kann es zu Beeinträchtigungen einzelner oder mehrerer Organsysteme (Nieren, Leber, Kreislauf, etc.) kommen. Es gibt Erkenntnisse, dass diese Entzündung zu einer Beeinflussung der Blutgerinnung führt und umgekehrt. Zur Behandlung der o.g. Erkrankung wird in bestimmten Fällen das Medikament Pentaglobin eingesetzt. Die Entscheidung bezüglich dieser Therapie obliegt der behandelnden Ärztin/dem behandelnden Arzt. Die Teilnahme oder Ablehnung zur Teilnahme dieser Studie hat auf diese Entscheidung keinen Einfluss.

Worum geht es in der Untersuchung und was kommt auf den von Ihnen betreuten Patienten zu?

Das Ziel der geplanten Untersuchung ist es, im Blut von Patienten mit „Ganzkörper-Entzündungsreaktion“ einen bestimmten Faktor (Endotoxin Activity Assay) zu untersuchen, der Rückschlüsse auf den Schweregrad dieser Entzündung zulässt. Diesen Faktor wollen wir zwei Tests für Blutgerinnung gegenüberstellen und einen ggf. vorhandenen Zusammenhang untersuchen.

Die Teilnahme an der Studie hat keinerlei Einfluss auf die Art der Durchführung der Behandlung. Es werden keinerlei studienbezogene Medikamente verabreicht. D.h. es handelt sich bei der Studie um eine reine Beobachtungsstudie, die intensivtherapeutische Behandlung verläuft identisch, unabhängig von Einwilligung oder

Ablehnung der Studienteilnahme.

Wie oben erwähnt, kann es sein, dass der von Ihnen betreute Patient mit dem Medikament Pentaglobin im Rahmen Ihrer Erkrankung behandelt wurden. In dieser Studie sollen die Effekte dieser Therapie auf den Endotoxin Activity Assay sowie verschiedene Blutgerinnungs-Tests untersucht werden.

Für die Durchführung der Studie werden an drei aufeinander folgenden Tagen Blutproben benötigt. Es handelt sich um insgesamt 125 ml Blut, welches über routinemäßig in eine Schlagader eingebrachte Kunststoffkanülen gewonnen wird. D.h. die Menge an Blut ist äußerst gering und es ist keine Blutabnahme via Nadel notwendig.

Welche Risiken und Nebenwirkungen können auftreten?

Es existieren keine Risiken und Nebenwirkungen, die durch die Teilnahme an der Studie entstehen könnten. Die angesprochenen Blutentnahmen erfolgen durch routinemäßig im Rahmen der Intensivtherapie gelegte Katheter, so dass studienbedingte Infektionen, Blutergüsse oder Nervenschädigungen durch Punktionen nicht auftreten können. Auch ist die Menge des entnommenen Blutes so gering, dass daraus keinesfalls die Gabe von Fremdblut (Transfusionen) resultieren würde.

Vorzeitige Beendigung der Studie

Die Teilnahme an der Untersuchung ist freiwillig. Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Bereitschaft widerrufen, ohne dass der von Ihnen betreuten Patientin/dem von Ihnen betreuten Patient irgendwelche Nachteile für deren/dessen ärztliche Versorgung entstehen.

Wir hoffen, dass wir Ihnen mit Hilfe der Aufklärungsunterlagen und dem Gespräch mit dem Intensivmediziner alle Fragen beantworten konnten.

Ansprechpartner:

Dr. Alexander Koch

Oberarzt

Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie

Tel.: 069-6301-87468

Prof. Dr. Dr. K. Zacharowski, FRCA

Direktor

Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie

Tel.: 069-6301-5998

Einwilligungserklärung

zur Teilnahme an einer Untersuchung mit dem Thema

Systemische Endotoxin-Belastung bei septischen Patienten unter Pentaglobintherapie (DEEP-Trial)

Name: _____ Vorname: _____

Pat. Nr.: _____ Geburtsdatum: _____ Größe: _____ Gewicht: _____

1.) Ich habe die von Herrn/Frau Dr. _____ durchgeführte Aufklärung über Art und Durchführung sowie die möglichen Risiken der Untersuchung verstanden und hatte Möglichkeit, Fragen zu stellen. Ferner hatte ich die Gelegenheit, die „Information für Betreuerin/Betreuer“ durchzulesen und Fragen dazu zu stellen. Die von mir gestellten Fragen wurden beantwortet. Ich konnte mir genügend Zeit nehmen, bevor ich meine Entscheidung zur Teilnahme an dieser klinischen Untersuchung getroffen habe.

2.) Die Teilnahme an dieser klinischen Untersuchung ist freiwillig. Ich kann jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile meine Einwilligung zurückziehen. Eine derartige Entscheidung hat keinen Einfluss auf die weitere medizinische Behandlung.

3.) Eine Kopie dieser Einwilligungserklärung habe ich von dem die Untersuchung durchführenden Arzt erhalten. Die schriftliche „Information für Betreuerin/Betreuer“ wurde mir ausgehändigt.

4.) Eine Kompensation erfolgt nicht.

Ich bin mit der Aufzeichnung der im Rahmen der Studie erhobenen Krankheitsdaten und ihrer anonymisierten Verwendung, z. B. für Veröffentlichungen einverstanden.

Dem mutmaßlichen Willen der von mir betreuten Patientin/des von mir betreuten Patient entsprechend, stimme ich der Teilnahme an der Studie zu.

Eine Kopie der Information für Betreuerin/Betreuer und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt beim Prüfarzt.

(Datum / Unterschrift des Betreuers)

(Datum / Unterschrift des aufklärenden Arztes)

Patienteninformation

Sekundäraufklärung

Systemische Endotoxin-Belastung bei septischen Patienten unter Pentaglobintherapie (DEEP-Trial)

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

Einleitung

Sie leiden/litten an einer systemischen, d.h. den gesamten Körper betreffenden Entzündung. Eine systemische Entzündung kann auftreten nach Operationen, Verletzungen, Infektionen, etc. In Abhängigkeit des Schweregrades kann es zu Beeinträchtigungen einzelner oder mehrerer Organsysteme (Nieren, Leber, Kreislauf, etc.) kommen. Es gibt Erkenntnisse, dass diese Entzündung zu einer Beeinflussung der Blutgerinnung führt und umgekehrt. Zur Behandlung der o.g. Erkrankung wird in bestimmten Fällen das Medikament Pentaglobin eingesetzt. Die Entscheidung bezüglich dieser Therapie obliegt der behandelnden Ärztin/dem behandelnden Arzt. Da Sie zum Zeitpunkt des Einschusses in die Studie nicht einwilligungsfähig waren, möchten wir dies hiermit nachholen. Mit dieser Information wollen wir Sie über die durchgeführte Untersuchung aufklären, und – sofern Sie sich zur Teilnahme an der Studie entschließen – Ihr Einverständnis einholen.

Worum geht es in der Untersuchung und was wurde durchgeführt?

Das Ziel der geplanten Untersuchung ist es, im Blut von Patienten mit „Ganzkörper-Entzündungsreaktion“ einen bestimmten Faktor (Endotoxin Activity Assay) zu untersuchen, der Rückschlüsse auf den Schweregrad dieser Entzündung zulässt. Zusätzlich wollen wir zwei Blutgerinnungs-Tests durchführen und einen ggf. vorhandenen Zusammenhang untersuchen.

Es wurden keinerlei studienbezogene Medikamente verabreicht. D.h. es handelt sich bei der Studie um eine **reine Beobachtungsstudie**, die intensivtherapeutische Behandlung verläuft identisch, unabhängig von Einwilligung oder Ablehnung der Studienteilnahme.

Wie oben erwähnt, kann es sein, dass Sie mit dem Medikament Pentaglobin im Rahmen Ihrer Erkrankung behandelt wurden. In dieser Studie sollen die Effekte dieser Therapie auf den Endotoxin Activity Assay sowie verschiedene Blutgerinnungs-Tests untersucht werden.

Für die Durchführung der Studie wurden an drei aufeinander folgenden Tagen Blutproben abgenommen. Es handelte sich um insgesamt 125 ml Blut, welches über routinemäßig in eine Schlagader eingebrachte Kunststoffkanülen gewonnen wurde. D.h. die Menge an Blut war äußerst gering und es war keine Blutabnahme via Nadel notwendig.

Welche Risiken und Nebenwirkungen können auftreten?

Es existieren keine Risiken und Nebenwirkungen, die durch die Teilnahme an der Studie entstehen könnten. Die angesprochenen Blutentnahmen erfolgten durch routinemäßig im Rahmen der Intensivtherapie gelegte Katheter, so dass studienbedingte Infektionen, Blutergüsse oder Nervenschädigungen durch Punktionen nicht auftreten können. Auch war die Menge des entnommenen Blutes so gering, dass daraus keinesfalls die Gabe von Fremdblut (Transfusionen) resultierte.

Vorzeitige Beendigung der Studie

Die Teilnahme an der Untersuchung ist freiwillig, Sie können jederzeit, auch ohne Angabe von Gründen, Ihre Bereitschaft widerrufen, ohne dass Ihnen dadurch irgendwelche Nachteile für Ihre ärztliche Versorgung entstehen.

Wir hoffen, dass wir Ihnen mit Hilfe der Aufklärungsunterlagen und dem Gespräch mit dem Intensivmediziner alle Fragen beantworten konnten.

Ansprechpartner:

Dr. Alexander Koch

Oberarzt

Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie Tel.: 069-6301-87468

Prof. Dr. Dr. K. Zacharowski, FRCA

Direktor

Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie Tel.: 069-6301-5998

Einwilligungserklärung

zur Teilnahme an einer Untersuchung mit dem Thema

Systemische Endotoxin-Belastung bei septischen Patienten unter Pentaglobintherapie (DEEP-Trial)

Name: _____ Vorname: _____

Pat. Nr.: _____ Geburtsdatum: _____ Größe: _____ Gewicht: _____

1.) Ich habe die von Herrn/Frau Dr. _____ durchgeführte Aufklärung über Art und Durchführung sowie die möglichen Risiken der Untersuchung verstanden und hatte Möglichkeit, Fragen zu stellen. Ferner hatte ich die Gelegenheit, die „Patienteninformation“ durchzulesen und Fragen dazu zu stellen. Die von mir gestellten Fragen wurden beantwortet. Ich konnte mir genügend Zeit nehmen, bevor ich meine Entscheidung zur Teilnahme an dieser klinischen Untersuchung getroffen habe.

2.) Die Teilnahme an dieser klinischen Untersuchung ist freiwillig. Ich kann jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne Nachteile meine Einwilligung zurückziehen. Eine derartige Entscheidung hat keinen Einfluss auf die weitere medizinische Behandlung.

3.) Eine Kopie dieser Einwilligungserklärung habe ich von dem die Untersuchung durchführenden Arzt erhalten. Eine schriftliche Patienteninformation wurde mir ausgehändigt.

4.) Eine Kompensation erfolgt nicht.

Ich bin mit der Aufzeichnung der im Rahmen der Studie erhobenen Krankheitsdaten und ihrer anonymisierten Verwendung, z. B. für Veröffentlichungen einverstanden.

Ich erkläre mich bereit an der Studie teilzunehmen.

Eine Kopie der Patienteninformation und Einwilligungserklärung habe ich erhalten. Das Original verbleibt beim Prüfarzt.

(Datum / Unterschrift des Patienten)

(Datum / Unterschrift des aufklärenden Arztes)

Endotoxin-Studie (DEEP-Trial)

Pentaglobingabe nach folgendem Schema:

Für den Patienten _____

erfolgt die Gabe von Pentaglobin

mit einer Laufrate von _____ ml/h

am _____ von _____ bis _____ Uhr

am _____ von _____ bis _____ Uhr

am _____ von _____ bis _____ Uhr

Bei Fragen bitte an die Study Nurses unter Tel. 87420
wenden.

Endotoxin-Studie (DEEP-Trial)

Pentaglobingabe nach folgendem Schema:

Für den Patienten _____

erfolgt die Gabe von Pentaglobin

mit einer Laufrate von _____ ml/h

am _____ von _____ bis _____ Uhr

am _____ von _____ bis _____ Uhr

am _____ von _____ bis _____ Uhr

Bei Fragen bitte an die Study Nurses unter Tel. 87420
wenden.

SIRS-Kriterien	Tag 1 (6h)	Tag 2 (6h)	Tag3 (6h)	Tag 4 (6h)
Temp [6:30-7:30AM]				
HR [6:30-7:30AM]				
RR [6:30-7:30AM]				
WBC [6:30-7:30AM]				
SIRS [6:30-7:30AM]				

Laborparameter	Tag 1 (4h)	Tag 1 (16h)	Tag 2 (4h)	Tag 2 (16h)	Tag 3 (4h)	Tag 3 (16h)	Tag 4 (4h)	Tag 4 (16h)
Lactat								
CRP								
IL-6								
LBP								
Leukozytenzahl								
Thrombozytenzahl/nl								
INR								
PTT								
Fibrinogen [mg/dl]								
AT III								
Thrombinzeit								
Kreatinin [mg/dl]								
Harnstoff [mg/dl]								
Bilirubin [mg/dl]								
AST								
ALT								
gGT								
GLDH								

Scoring-Parameter (Schlechtester Wert in 24h)				
Datum				
MAP				
RR sys				
Katecholamin A				
Dosis				
Katecholamin B				
Dosis				
Herzfrequenz				
Temperatur				
Atemfrequenz				
paO2/FiO2				
Kreatinin				
Harnstoff				
pH				
Kalium				
Natrium				
Bicarbonat				
Hb				
Hämatokrit				
Diuresemenge				

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4
Pentaglobindosis mg/d				
Verabreichungsdauer				

9 Eigene Veröffentlichungen

10 Lebenslauf

11 Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. habil. Alexander Koch danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die kontinuierliche Unterstützung als Doktorvater. Ein besonderes Dankeswort möchte ich an meine Betreuerin Dr. med. Saskia Wand richten für die tatkräftige und freundschaftliche Unterstützung bei allen Belangen während der Studienphase und der Erstellung meiner Arbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei den Patientinnen und Patienten für ihre Bereitschaft zur Teilnahme an der Studie bedanken.

Einen herzlichen Dank richte ich an meine Eltern für ihre emotionale Unterstützung während meines gesamten Ausbildungsweges und zu jeder Zeit auf meinem bisherigen Lebensweg.

Für seine uneingeschränkte Liebe und den grenzenlosen Glauben an meine Fähigkeiten danke ich meinem Ehemann Manuel von ganzem Herzen.

12 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Systemische Endotoxinbelastung bei septischen Patienten unter Pentaglobintherapie

in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie unter Betreuung und Anleitung von Priv.-Doz. Dr. Alexander Koch mit Unterstützung durch Dr. Saskia Wand ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Wand S, Klages M, Kirbach C, et al. IgM-Enriched Immunoglobulin Attenuates Systemic Endotoxin Activity in Early Severe Sepsis: A Before-After Cohort Study. *PLoS One*. 2016;11(8):e0160907. doi:10.1371/journal.pone.0160907.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)