

Effekte von humanem i.v. Immunglobulin auf die Bakterien-Clearance und Granulozytenfunktion bei Endotoxinämie

Thea Koch¹, S. Heller¹, K. Weber, A. Heller¹, R. Urbaschek²

¹ Institut für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin,

² Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Zusammenfassung. Ziel: Der Einsatz von humanen Immunglobulinpräparaten als adjuvante Therapie bei der Sepsis wird zur Zeit kontrovers diskutiert. Ziel dieser Studie war die differenzierte Untersuchung der Effekte von i.v. Immunglobulin der IgG-Klasse (ivIG) auf Mechanismen der bakteriellen Abwehr und Granulozytenfunktion beim Kaninchen. **Methodik:** Nach Instrumentierung der anästhesierten und ventilierten Kaninchen erfolgte bei allen Tieren ein kontinuierliches Monitoring des arteriellen Druckes. Intermittierend wurden die Blutgase, Blutbild und Proben für die flowzytometrische Messung der respiratorischen Burst-Aktivität der Granulozyten entnommen. Zur quantitativen Bestimmung der Bakterien-Clearance im Blut wurde den Tieren eine standardisierte Anzahl ($1,3 \times 10^8$) koloniebildender Einheiten (CFU) *Escherichia (E.) coli* intravenös injiziert. Die Applikation der Bakterien erfolgte entweder bei unbehandelten Versuchstieren (Kontrollen, n = 10) oder 60 min nach Induktion einer Endotoxinämie (LPS: 40 µg/kg/h) bei Tieren mit (n = 10) und ohne Vorbehandlung mit ivIG (Sandoglobulin®, 0,5 g/kg KG, n = 10). Zur Ermittlung der Eliminationskinetik der Bakterien aus dem Blut und der Endotoxin-Clearance wurden in kurzen Zeitintervallen bis 180 min nach *E. coli*-Injektion Blutproben entnommen. Gewebeentnahmen von Leber, Milz, Lunge und Niere erfolgten zur bakteriologischen Aufarbeitung nach Tötung des Tieres drei Stunden nach Bakterieninjektion. **Ergebnisse:** Im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich unter Endotoxinämie eine verzögerte Bakterienelimination aus dem Blut und eine signifikant erhöhte Organbesiedlung ($p < 0,01$). Die Vorbehandlung mit ivIG resultierte in einer beschleunigten LPS-Clearance und einer signifikant ($p < 0,01$) geringeren bakteriellen Besiedlung von Lunge und Niere, die mit einer erhöhten PMN-Burst-Aktivität ($p < 0,05$) korrelierte. **Schlussfolgerung:** Die verminderte Organbesiedlung und die erhöhte Burst-Aktivität der Granulozyten unter ivIG-Behandlung weisen auf protektive Effekte von humanem Immunglobulin bei Endotoxinämie hin.

Schlüsselwörter: Immunglobulin – Endotoxinämie – Bakterien-Clearance – Endotoxin-Clearance – PMN Respiratory burst

Effects of Human I.V. Immunoglobulin on Bacterial Clearance and Granulocyte Function in Endotoxaemia. Purpose: The therapeutic impact of intravenous immunoglobulins (ivIG) in septic patients remains controversial. Until now, the mechanisms of action have not been fully elucidated. Since polymorphonuclear neutrophils (PMN) play a key role in host

defence, this study focuses on the effects of ivIG on bacterial clearance and PMN respiratory burst activity during endotoxaemia. For this purpose, it was investigated whether ivIG improves blood clearance and organ colonisation as well as PMN functions after experimentally induced bacteraemia in rabbits. **Methods:** The experiments were performed in 30 anaesthetised rabbits. To determine quantification of bacterial killing in vivo, defined numbers of exogenous *Escherichia (E.) coli* 1.3×10^8 CFU were injected intravenously in untreated animals (n = 10) or 60 min after infusion of endotoxin (LPS: 40 µg/kg/h) in groups without (n = 10), and after pretreatment with ivIG (Sandoglobulin®, 0.5 g/kg body weight, n = 10), respectively. Parameters monitored were rates of bacterial elimination from the blood, LPS clearance, arterial pressure, blood gases and white blood cell counts. PMN burst activity was determined using a flow cytometry assay. Samples of liver, kidney, spleen and lung were collected for bacterial counts 180 min following *E. coli* injection. **Results:** Compared to controls, endotoxaemia resulted in a prolonged elimination of the injected *E. coli* out of the blood associated with a significantly ($p < 0.01$) higher colonisation of all organs. Pretreatment with ivIG improved LPS clearance and significantly reduced bacterial colonisation of lung and kidney ($p < 0.01$). This was paralleled by an enhanced PMN respiratory burst activity compared to untreated animals ($p < 0.05$). **Conclusion:** The reduced bacterial colonisation of lung and kidney in correlation with an increased PMN bactericidal activity in endotoxaemia suggest an improved granulocyte-dependent bacterial killing due to ivIG application.

Key words: Immunoglobulin – Endotoxaemia – Bacterial clearance – LPS clearance – PMN respiratory burst

Einleitung

Trotz differenzierter Antibiotikatherapie stellt die infektionsbedingte Letalität noch immer ein Hauptproblem bei kritisch Kranken dar. Experimentelle Befunde sowie eine Reihe klinischer Studien weisen auf eine beeinträchtigte humorale und zelluläre Abwehr bei Hochrisikopatienten z. B. mit Polytrauma oder Verbrennungen hin. So wurde bei Patienten mit Sepsis eine eingeschränkte Opsonierungsaktivität und erniedrigte Immunglobulinspiegel festgestellt [1]. Eine verminderte bakterielle Phagozytose und Lyse nach Hämorrhagie, Hypoxie oder Endotoxinämie wurde in eigenen Untersuchungen am Kaninchen belegt [2,3]. Vor dem Hintergrund, daß durch Antibiotika der Effekt bereits ausgeschwemmter Toxine unbeeinflusst bleibt, bzw. es unter Antibiose durch raschen Bakte-

rienuntergang zu einem vermehrten Anfall von Endotoxin kommt, ist eine additive „Anti-Toxin-Therapie“ ein sinnvoller Ansatz. Nach den enttäuschenden Ergebnissen der klinischen Studien mit spezifischen monoklonalen Endotoxinantikörpern (HA-1A) [4–6] bei gram-negativer Sepsis, erlangt der Einsatz von polyvalenten Immunglobulinen als adjuvante Therapie wieder zunehmende Bedeutung. In tierexperimentellen Studien wurde eine gute Verträglichkeit von intravenös applizierten Immunglobulinen (ivIG) und positive Effekte auf die Überlebensrate bei induzierter Sepsis belegt [7]. Ferner wurde bei Mäusen eine beschleunigte Endotoxin-Clearance und ein Anstieg der Endotoxin-neutralisierenden Kapazität im Plasma nach ivIG-Applikation beobachtet [8]. Klinische Erfahrungen zur therapeutischen Wirksamkeit von polyvalenten Immunglobulinen liegen bisher nur aus Studien an kleineren Patientenkollektiven vor. Daher wird der klinische Einsatz von ivIG zum jetzigen Zeitpunkt noch kontrovers diskutiert. Positive Effekte auf das Überleben der Patienten wurden in verschiedenen Studien bei Sepsis [9–11] und Polytrauma [12] Anfang der 90er Jahre publiziert. Ferner resultierte die prophylaktische Applikation von ivIG bei Hochrisikopatienten, die sich kardiochirurgischen Eingriffen [13] und großen abdominalen Operationen [14,15] unterziehen mußten, in einer signifikanten Reduktion der Pneumonierate und anderer infektiöser Komplikationen. Diese Ergebnisse ermutigen zu differenzierten Untersuchungen der Wirksamkeit von polyvalenten Immunglobulinen in der Sepsistherapie. Ausgehend von den postulierten pharmakologischen Eigenschaften der ivIG wie Antigenerkennung und Neutralisation, Phagozytostimulation durch Opsonierung und spezifische Komplementaktivierung sowie antikörperabhängige Zytotoxizität sind das Ziel dieser Studie die differenzierte Untersuchung der Effekte von humanem Immunglobulin auf Mechanismen der bakteriellen Infektabwehr und Granulozytenfunktion unter standardisierten experimentellen Bedingungen. Im Tierexperiment soll überprüft werden, ob die intravenöse Applikation von Immunglobulinen der IgG-Klasse (Sandoglobulin®, Fa. Sandoz, Nürnberg) einen Einfluß auf die Elimination von in die Blutbahn applizierten Bakterien und die Organbesiedlung hat. Ferner wird der Effekt auf die Freisetzung von toxischen Sauerstoffspezies (Burst-Aktivität) polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN), die einen wesentlichen Mechanismus der bakteriellen Abtötung darstellen, getestet. Die Analyse der PMN-Burst-Aktivität parallel zu der Bakterien-Clearance aus dem Blut und Gewebe erlaubt Aussagen, inwiefern Effekte auf die Granulozytenfunktion mit der bakteriellen Clearance und Organbesiedlung korrelieren. Zusätzlich wird durch engmaschige Endotoxinbestimmungen im Blut die systemische Endotoxin-Clearance untersucht.

Methoden

Tiermodell

Als Versuchstiere dienten 30 Kaninchen (Chinchilla Bastard) beiderlei Geschlechts mit einem Körpergewicht von 2,5–3,5 kg Körpergewicht (KG). Die Durchführung der Versuche entsprach den Forderungen des Tierschutzgesetzes und wurde vom Regierungspräsidium in Karlsruhe genehmigt.

Die Versuchstiere wurden mit Ketamin (25 mg/kg KG) und Xylazine (2 mg/kg KG) über eine aseptisch plazierte Venenverweilkanüle in der Ohrdrandvene anästhesiert und mit 1000 IE

Heparin/kg KG antikoaguliert. Nach Einleitung der Narkose wurden die Tiere auf einem beheizten Präpariertisch gelagert und steril abgedeckt. Nach Lokalanästhesie mit 10 ml Lidocainhydrochlorid 2% erfolgte unter aseptischen Kautelen die Tracheotomie. Zur Beatmung wurde ein steriler Kunststofftubus (Innendurchmesser 3,5 mm) in die Trachea eingeführt und sofort mit der volumenkontrollierten Ventilation (Atemzugvolumen 30 ml, Atemfrequenz 30/min, FIO₂ 0,21) über einen Servo-Ventilator 900C (Fa. Siemens Elema) begonnen. Anschließend wurde die rechte Arteria carotis auf einer Strecke von 4 cm freipräpariert und ein steriler PVC-Katheter (Innendurchmesser 1,4 mm) zur kontinuierlichen blutigen Druckmessung und wiederholten Blutentnahmen in das Gefäß eingebunden. Die Anästhesie wurde durch die Applikation von Ketamin (5–10 mg/kg/h) und Xylazine (1–2 mg/kg/h) unter hämodynamischem Monitoring aufrechterhalten. Zusätzlich zum Erhaltungsbedarf von ca. 3–4 ml/kg KG wurden Flüssigkeitsverluste durch Blutentnahmen isovolämisch mit physiologischer Kochsalzlösung ersetzt.

Experimentalprotokoll

Nach Instrumentierung der anästhesierten und ventilierten Kaninchen erfolgte bei allen Versuchstieren ein kontinuierliches Monitoring des arteriellen Druckes. Intermittierend wurden Blutproben für Blutgase (ABL 300, Radiometer, Kopenhagen), Blutbild und die flowzytometrische Messung der PMN-Burst-Aktivität entnommen. Zur quantitativen Bestimmung der Bakterien-Clearance im Blut wurde stellvertretend für die Einschwemmung von Bakterien aus unterschiedlichen Kompartimenten (z. B. Urogenitaltrakt, infizierte Wundflächen, implantierte Fremdmaterialien oder Translokation aus dem Intestinum) die intravenöse Injektion einer standardisierten Anzahl koloniebildender Einheiten (CFU) *Escherichia coli* (*E. coli*) in unserem experimentellen Ansatz gewählt. Als bakterielles Inoculum wurde ein bekapselter, serumresistenter, nicht hämolysierender *E. coli* Wildtyp eingesetzt. Der Keim wurde aus Blutkulturen eines septischen Patienten isoliert und auf Blut-Agar-Platten kultiviert. Die gewachsenen Kolonien wurden in TSB (tryptic soy broth) Bouillon homogenisiert und anschließend aliquotiert. Die Bakterienkonzentrationen wurden auf ca. $1,3 \times 10^8$ CFU pro ml eingestellt und bis zur Verwendung bei -70°C aufbewahrt. Die Applikation der Bakterien erfolgte entweder bei unbehandelten Versuchstieren (Kontrollen, n=10) ohne Endotoxinämie oder 60 min nach Induktion einer Endotoxinämie bei Versuchstieren mit (n=10) und ohne Vorbehandlung mit ivIG (n=10). Die Endotoxinämie wurde durch kontinuierliche Infusion einer in Pilotstudien getesteten nicht letalen Dosis (40 µg/kg/h) Endotoxin (Boivin Trichloressigsäure Extrakt aus *E. coli* 0111) über den gesamten Versuchszeitraum aufrechterhalten. Als ivIG wurde das Präparat Sandoglobulin® (Sandoz AG, Nürnberg) eine Stunde vor Induktion der Endotoxinämie in einer Dosierung von 0,5 g/kg KG über 30 min infundiert. Zur Ermittlung der Endotoxin-Clearance und der Eliminationskinetik der Bakterien aus dem Blut wurden zunächst in kurzen Zeitintervallen nach 1, 5, 10, 15, 25, 30, 40, 50 und 60 Minuten sowie nachfolgend in halbstündigen Abständen bis 180 Minuten unter sterilen Kautelen Blutproben entnommen. Um Effekte auf die Organbesiedlung zu untersuchen, erfolgten die Gewebeentnahmen von Leber, Milz, Lunge und Niere zur bakteriologischen Aufarbeitung nach Tötung des Tieres durch eine Überdosis Barbiturat drei Stunden nach Bakterieninjektion.

Mikrobiologische Verfahren

Blutkulturen

Die während des Versuches entnommenen Blutproben wurden sofort gekühlt und unmittelbar nach Versuchsende mikrobiologisch aufgearbeitet. Von den Proben wurden Verdünnungsreihen mit steriler 0,9%iger NaCl-Lösung angelegt. 100 µl jeder Verdünnung sowie 100 µl der Nativprobe wurden mit einem sterilen Glasspatel auf einem CLED (Cysteine Lactose Electrolyte Deficient) Agar nach Sandys [16] ausplattiert und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Bakterienkonzentrationen im Gewebe

Von den aseptisch entnommenen Organen Leber, Milz, Nieren und Lunge wurden repräsentative Proben von 0,8–2 g eines jeden Organs in einem Ultra-Turrax in 5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung unter sterilen Kautelen homogenisiert. Von den Organhomogenaten wurden wiederum Verdünnungsreihen angelegt und 100 µl dieser Suspensionen auf CLED-Nährböden ausplattiert. Anschließend wurden die Kulturplatten für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert und schließlich die Bakterienzahlen als CFU von *E. coli* abgelesen. Die Bakterienkonzentrationen im Blut und in den Geweben werden als CFU/ml Blut bzw. CFU/g Gewebe angegeben.

Endotoxin (LPS)

Die Messung der Endotoxinkonzentration im Plasma wurde mit einem automatischen, kinetischen, turbidimetrischen LAL (*Limulus* amoebocyte lysate) Microtiter Test mit interner Standardisierung nach einer Methode, die im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Klinikum Mannheim entwickelt wurde, durchgeführt [17, 18].

PMN-Burst-Aktivität

Um quantitative Aussagen über den oxidativen Burst von polymorphkernigen-neutrophilen Granulozyten (PMN) zu erhalten, wurde ein kommerziell erhältlicher Burst-Test-Kit (Orpegen Pharma, Heidelberg, FRG) verwendet. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Oxidation eines nicht fluoreszenten Substrates (Dihydrorhodamin 123), welches durch zell-eigene Enzymsysteme und Superoxidanionen zu dem grün-fluoreszenten Produkt Rhodamin 123 oxidiert wird. Diese Oxidation ist hochspezifisch für die respiratorische Burst-Aktivität und sensitiver als die konkurrierende Methode unter dem Einsatz von Dichlorofluorescein [19].

Probenvorbereitung für die Messung der respiratorischen Burst-Aktivität

Vollblut wurde in Ansätzen zu jeweils 100 µl mit *Escherichia coli* (2×10^7 CFU), die mit Antikörpern aus gepoolten Seren opsoniert wurden, bzw. im Kontrollansatz mit Pufferlösung inkubiert. Anschließend wurden 20 µl des zu oxidierenden Substrates Dihydrorhodamin 123 zugegeben und die Proben wiederum inkubiert, um schließlich die Erythrozyten mit Lysing-Solution zu lysieren sowie die Leukozyten zu fixieren und gegenzufärben. Die Intensität der Grünfluoreszenz als Maß für die Burst-Aktivität der PMN wurde mittels Durchflußzytometrie (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, FRG) ermit-

telt. Ausgewertet wurden der prozentuale Anteil der oxidierten Zellen (Recruitment) sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität (Menge an umgesetztem Substrat) pro Zelle.

Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Software-Pakets Statgraphics™ for windows (Statistical graphics Corporation, USA). Angegeben sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen (SEM). Zum Gruppenvergleich wurde die einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) angewandt und die Unterschiede mit dem Rangtest (LSD-Test: least significant difference) für den multiplen Mittelwertvergleich verifiziert. Die Werte der Bakterienkolonien im Blut und Gewebe wurden vor Anwendung der ANOVA logarithmiert. Unterschiede der Ergebnisse wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 5% als signifikant akzeptiert.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Bakterienelimination aus dem Blut während des Beobachtungszeitraumes von 180 min sind in Abb. 1 dargestellt. In den LPS-Gruppen zeigte sich eine signifikant verzögerte Clearance (Abb. 1), die durch eine Sättigungskinetik charakterisiert ist. Während in den Kontrollen die Bakterienzahlen rasch abfielen und nach 90 min keine Keime mehr nachweisbar waren, blieb unter Endotoxinämie ohne Vorbehandlung als auch nach Infusion von ivIG die Zahl der nachgewiesenen CFU bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 180 min bei ca. 10^2 CFU/ml Blut. Im Vergleich zu den Kontrollen war die verzögerte Bakterienelimination aus dem Blut unter Endotoxinämie mit einer signifikant höheren Besiedlung ($p < 0,01$) aller untersuchten Organe verbunden (Abb. 2). Während die Vorbehandlung mit ivIG keine Unterschiede in der Bakterien-Clearance aus dem Blut erbrachte, resultierte jedoch die Applikation von ivIG gegenüber den unbehandelten LPS-Tieren in signifikant ($p < 0,01$) geringeren Bakterienzahlen in den Organkulturen von Lunge und Niere (Abb. 2), die auf eine erhöhte Phagozytose und Lyse nach ivIG hinweisen. Im Vergleich zu der LPS-Gruppe mit Bakterienzah-

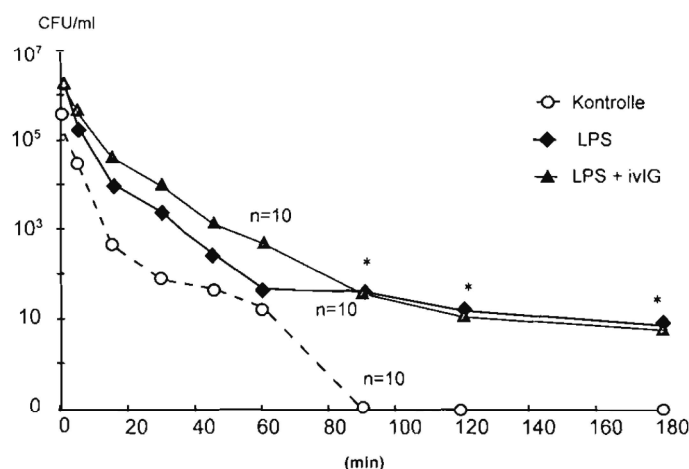


Abb. 1 Bakterien-Clearance aus dem Blut nach intravenöser Injektion von *E. coli* ($1,3 \times 10^8$ CFU). Semilogarithmische Darstellung der Mittelwerte der koloniebildenden Einheiten (CFU) im Blut aufgetragen gegen die Zeit in den verschiedenen Gruppen. (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle)

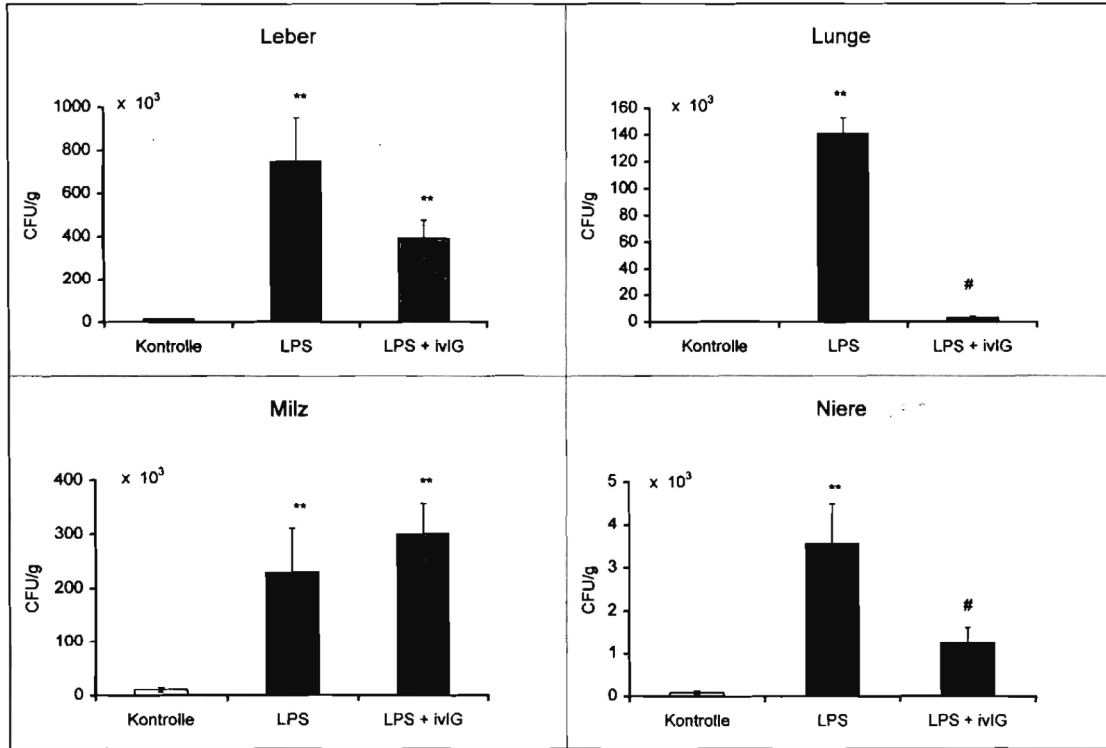


Abb. 2 Organbesiedlung gemessen als CFU pro Gramm Gewebe (Mittelwerte ± SEM) 180 min nach Injektion von $1,3 \times 10^8$ CFU *E. coli* in den Versuchsgruppen. (** p < 0,01 vs. Kontrolle, # p < 0,01 vs LPS)

len von $141 \times 10^3 \pm 11 \times 10^3$ CFU/g (Mittelwert ± SEM) in der Lunge und 3560 ± 910 CFU/g in der Niere, fanden sich in der ivIG-Gruppe lediglich 3258 ± 990 CFU/g in der Lunge und 1260 ± 360 CFU/g in der Niere. Die mittleren LPS-Konzentrationen im Blut 1 min nach *E. coli*-Injektion betragen 44 ± 11 ng/ml in den Kontrolltieren (ohne Endotoxininfusion) und 263 ± 58 ng/ml in der Endotoxin-Gruppe bzw. 234 ± 64 ng/ml in der ivIG-Gruppe. Zum Vergleich der Ergebnisse in den verschiedenen Gruppen, wurden die LPS-Konzentrationen als prozentuale Abweichungen des Wertes, der 1 min nach *E. coli*-Injektion gemessen wurde (entspricht 100%), angegeben. Unter LPS-Infusion kam es erwartungsgemäß gegenüber den Kontrollen zu weiteren Anstiegen der

Endotoxinkonzentrationen. Nach ivIG-Applikation wurden signifikant geringere LPS-Konzentrationen ($p < 0,05$) zu den Zeitpunkten 120 und 180 min gemessen als unter nicht vorbehandelter Endotoxinämie (Abb. 3).

Inwiefern die geringere Organbesiedlung nach ivIG-Infusion mit einer erhöhten granulozytären Abtötung der Bakterien korreliert, wurde durch die flowzytometrische Bestimmung der PMN-Burst-Aktivität untersucht. Hier zeigte sich eine signifikant ($p < 0,05$) gesteigerte PMN-Burst-Aktivität, gemessen an einer erhöhten Fluoreszenzintensität (FL-1 Hight), in den mit ivIG behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Gruppen mit und ohne Endotoxinämie (Abb. 4).

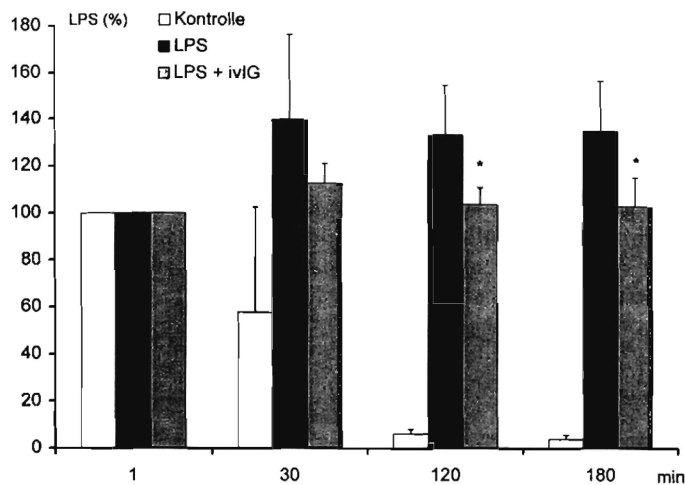


Abb. 3 Prozentuale Veränderungen der Endotoxinkonzentrationen (Mittelwert ± SEM) bezogen auf den Wert 1 min nach *E. coli*-Applikation in den Kontrollen und unter Endotoxininfusion mit und ohne ivIG-Vorbehandlung (* p < 0,05 vs. LPS)

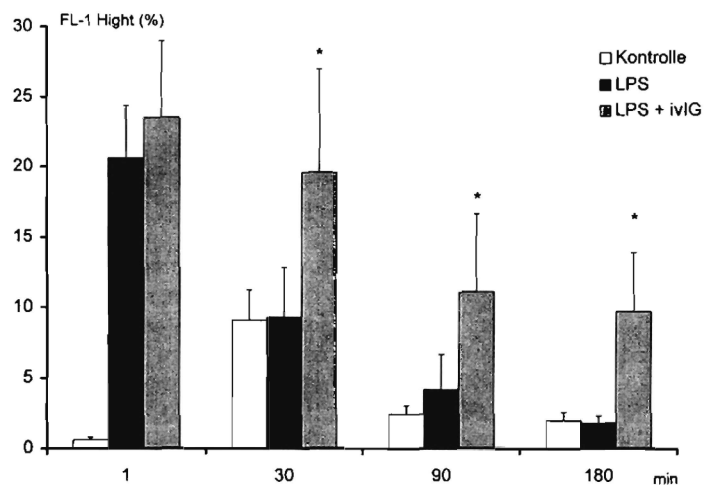


Abb. 4 PMN-Burst-Aktivität nach *E. coli*-Stimulation. Aufgetragen ist die prozentuale Fluoreszenzintensität (Mittelwert ± SEM) als Parameter für die respiratorische Burst-Aktivität nach *E. coli*-Stimulation zu verschiedenen Zeitpunkten. (* p < 0,05 vs. Kontrolle und LPS-Gruppe)

Die hämodynamischen und metabolischen Meßparameter zeigten in der Kontrollgruppe nur geringfügige Änderungen vom Ausgangswert während des Beobachtungszeitraumes. Unter Endotoxinämie kam es sowohl bei den unbehandelten als auch bei den ivIG-behandelten Tieren zu einem mittleren Blutdruckabfall von ca. 20–25% (83 ± 5 mmHg auf 63 ± 6 mmHg) bis zum Versuchsende. Parallel dazu fiel der pH im Mittel von 7,44 auf 7,28 ab.

Diskussion

Die Letalität der Sepsis und des septischen Schocks konnte in den letzten Jahrzehnten trotz neuer Antibiotikagenerationen nicht wesentlich gesenkt werden und liegt noch immer im Mittel bei 40–60%. Vor diesem Hintergrund werden zur Zeit zahlreiche additive Therapiemaßnahmen, die auf den unterschiedlichen Ebenen des komplexen inflammatorischen Reaktionsablaufes eingreifen, untersucht. Bei septischen Krankheitsbildern hat die Bekämpfung bakterieller Infektionen durch adäquate Antibiotika höchste Priorität. Da jedoch die Effekte bereits ausgeschwemmter Toxine, die durch Stimulierung von humoralen und zellulären Mediatorsystemen den inflammatorischen Prozeß perpetuieren, durch Antibiotika weitgehend unbeeinflusst bleiben, stellt eine adjuvante „Anti-Toxin-Therapie“ einen sinnvollen Ansatz dar. Klinische Studien mit spezifischen monoklonalen Endotoxinantikörpern (HA-1A) [4–6] erbrachten bisher enttäuschende Ergebnisse hinsichtlich des Outcome der Patienten bei gram-negativer Sepsis, während die Applikation von polyvalenten Immunglobulinen in Untersuchungen von Schedel u. Mitarb. [9] und Dominioni u. Mitarb. [10] an kleineren Patientenkollektiven die Überlebensrate erhöhten. Bei Patienten mit Sepsis wurden eine eingeschränkte Opsonierungsaktivität und reduzierte IgG-Spiegel festgestellt, denen nach einigen Untersuchungen auch ein prognostischer Charakter während des Krankheitsverlaufes beigemessen wird. Während nach Studien von Dominioni bei Überlebenden nach einiger Zeit wieder Normalwerte erreicht wurden, blieb ein Anstieg der IgG-Konzentrationen bei Nicht-Überlebenden aus. In verschiedenen Studien führte der prophylaktische hochdosierte Einsatz von ivIG bei chirurgischen Risikopatienten zu einer signifikanten Reduktion der postoperativen Infektionsrate und nachfolgender septischer Komplikationen [13–15,20]. Zur Zeit ist der prophylaktische und therapeutische Einsatz von Immunglobulinen im Rahmen der Sepsis jedoch noch umstritten. Gründe hierfür sind vor allem das Fehlen von groß angelegten prospektiv randomisierten placebokontrollierten Studien. Ferner sind die Mechanismen, die nach hochdosierter ivIG-Applikation zu einer erhöhten Überlebensrate führten, noch nicht vollständig geklärt.

Zu den postulierten Eigenschaften der Immunglobuline gehören die Antigenerkennung und Neutralisation, die Phagozytosestimulation durch Opsonisation und die Modulation der Zytokinfreisetzung [21–23]. Von besonderem therapeutischen Interesse ist die antikörperabhängige Zytotoxizität und die Stimulation neutrophiler Granulozyten. Darüberhinaus weisen Immunglobuline synergistische Wirkungen mit β -Laktantantibiotika auf.

Ziel der vorliegenden Studie war die differenzierte Untersuchung der Effekte von ivIG auf die Bakterien- und LPS-Clearance im Organismus und auf die Phagozytose und Lyse-

funktion von neutrophilen Granulozyten als wichtige Bestandteile der zellulären Immunabwehr. Um quantitative Analysen zu ermöglichen, wurde im Tierexperiment stellvertretend für die Einschwemmung von Bakterien aus verschiedenen Kompartimenten (z. B. Urogenitaltrakt, Darm, infizierte Wunden) eine definierte Anzahl von koloniebildenden Einheiten *E. coli* intravenös injiziert und anschließend die Elimination der applizierten Bakterien aus der Blutbahn und die Organbesiedlung sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Endotoxinämie bzw. zusätzlicher ivIG-Behandlung untersucht. Die Dosierung des humanen ivIG (Sandoglobulin®) wurde entsprechend den verwendeten tierexperimentell getesteten Mengen gewählt, die der Dosierung bei Intensivpatienten in der Studie von Dominioni u. Mitarb. [10] vergleichbar sind. Zur Klärung der Frage, inwieweit die zellulären Abwehrmechanismen mit der bakteriellen Abtötung im Blut und Gewebe korrelieren, wurden in dieser Studie erstmals parallel zu den mikrobiologischen Parametern auch die granulozytäre Burst-Aktivität untersucht.

Übereinstimmend mit Voruntersuchungen am gleichen Tiermodell [3] war unter Endotoxinämie eine verzögerte Elimination der Bakterien aus dem Blut und eine erhöhte Organbesiedlung nachweisbar, die mit einer reduzierten PMN-Burst-Aktivität korrelierte. Die Vorbehandlung mit ivIG zeigte in unserer Studie protektive Effekte auf die bakterielle Abwehr unter Endotoxinämie.

Die Applikation von ivIG führte zu einer beschleunigten Endotoxin-Clearance und einer geringeren bakteriellen Besiedlung der Lunge und Niere nach exogen induzierter Bakteriämie. Die im Rahmen der Endotoxinämie nachgewiesene Granulozytensequestration in der Lunge und in geringerem Ausmaß auch in der Niere resultiert in einem erhöhten Potential phagozytierender Zellen in diesen Organen. Darüberhinaus steigert ivIG die PMN-abhängige Bakterizidie durch eine verbesserte Leukozytenphagozytose und eine erhöhte Burst-Aktivität, die möglicherweise zu der geringeren Besiedlung von Lunge und Niere beiträgt. Diese positiven Effekte von ivIG bestätigen frühere in vitro Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Immunglobulin-Präparationen auf die Burst-Aktivität von isolierten humanen neutrophilen Granulozyten [24]. In Gegenwart von vergleichbaren 7S-IgG-Präparationen, zeigte sich im Gegensatz zu 5S- und 19S-Immunglobulinpräparationen eine signifikant erhöhte PMN-Burst-Aktivität nach LPS-Stimulation, die möglicherweise durch eine direkte Stimulation über den Fc-Rezeptor zu erklären ist.

Die beschleunigte LPS-Clearance ist klinisch von besonderem Interesse, da Endotoxinämien in der Frühphase nach schwerem Polytrauma ein häufiges Phänomen darstellen und den LPS-Konzentrationen ein prognostischer Wert hinsichtlich der Überlebensrate beigemessen wird. Nach neueren Untersuchungen von Pfeiffer u. Mitarb. [25] korreliert die Höhe der erreichten Endotoxinkonzentrationen mit der späteren Entwicklung eines Multiorganversagens und dem zu erwartenden Outcome der Patienten.

Zusammenfassend lassen die nachgewiesenen positiven Effekte von ivIG auf die Endotoxin-Clearance und Granulozytenfunktion den frühzeitigen Einsatz von humanem Immunglobulin als eine sinnvolle Therapiemaßnahme zur Unterstüt-

zung der bakteriellen Abwehrmechanismen erscheinen. Inwiefern durch die präventive Gabe von Immunglobulinen die Inzidenz bakterieller Infektionen und die Mortalität bei kritisch kranken Patienten reduziert werden kann, muß in prospektiv randomisierten Studien belegt werden.

Danksagung

Die Studie wurde vom Forschungsfond der Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Universität Heidelberg gefördert.

Literatur

- 1 Nishijima MK, Takezawa J, Hososubo KK, Takahashi H, Shimada Y, Yoshiya I: Serial changes in cellular immunity of septic patients with multiple organ-system failure. *Crit. Care Med.* 1986;14:87–91
- 2 Koch T, Duncker HP, Axt R, Schiefer HG, van Ackern K, Neuhofer H: Effects of hemorrhage, hypoxia, and intravascular coagulation on bacterial clearance and translocation. *Crit. Care Med.* 1993; 21:1758–1764
- 3 Koch T, Duncker HP, Axt R, Schiefer HG, van Ackern K, Neuhofer H: Alterations of bacterial clearance induced by endotoxin and tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* 1993;61:3143–3148
- 4 Calandra T, Glauser MP, Schellekens J, Verhoef J: Treatment of gram-negative septic shock with human IgG antibody to *Escherichia coli* J5: a prospective, double-blind, randomized trial. *J. Infect. Dis.* 1988;158:312–319
- 5 Ziegler EJ, Fisher CJ, Sprung CL, et al. HA-1A Sepsis Study Group: Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. *N. Engl. J. Med.* 1991;324:429–436
- 6 Greenman RL, Schein RMH, Martin MA, et al. XOMA Sepsis Study Group: A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. *J. Amer. Med. Ass.* 1991;266:1097–1102
- 7 McCuskey RS, Nishida J, McDonnell D, Baker GL, Urbaschek R, Urbaschek B: Effect of immunoglobulin G on the hepatic microvascular inflammatory response during sepsis. *Shock* 1996;5:28–33
- 8 Urbaschek R, Becker K-P, McCuskey RS, Urbaschek B: Influence of i.v. immunoglobulin on endotoxin-induced levels of endotoxin and of endotoxin-neutralizing-capacity. *Shock* 1995;5:193
- 9 Schedel I, Dreikhausen U, Nentwig B, Höckenschnieder M, Rauthmann D, Balikcioglu S, Coldewey R, Deicher H: Treatment of gram-negative septic shock with an immunoglobulin preparation: A prospective randomized clinical trial. *Crit. Care Med.* 1991;19:1104–1113
- 10 Dominioni L, Dionigi R, Zanella M, Chiaranda M, Dionigi R, Acquarolo A, Ballabio A, Sguotti C: Effects of high-dose IgG on survival of surgical patients with sepsis scores of 20 or greater. *Arch. Surg.* 1991;126:236–240
- 11 Pilz G, Käab S, Neeser G, Class J, Schweigart U, Brähler A, Bujdoso O, Neumann R, Werdan K: Supplemental immunoglobulin (ivIgG) treatment in 163 patients with sepsis and septic shock – an observational study as a prerequisite for placebo-controlled clinical trials. *Infection* 1991;19:216–227
- 12 Glinz W, Grob PJ, Nydegger UE, Ricklin T, Stamm F, Stoffel D, Lasance A: Polyvalent immunoglobulins for prophylaxis of bacterial infection in patients following multiple trauma – a randomized, placebo-controlled study. *Intensive Care Med.* 1985;11:288–294
- 13 Pilz G, Kreuzer E, Käab S, Appel R, Werdan K: Early sepsis treatment with immunoglobulins after cardiac surgery in score-identified high-risk patients. *Chest* 1994;105:76–82
- 14 Cafiero F, Gipponi M, Bonalumi U, Piccardo A, Sguotti C, Corbetta G: Prophylaxis of infection with intravenous immunoglobulins plus antibiotic for patients at risk for sepsis undergoing surgery for colorectal cancer; Results of a randomized, multicenter clinical trial. *Surgery* 1992;112:24–31
- 15 Cometta A, Baumgartner J-D, Lee ML, Hanique G, Glauser MP, the intravenous immunoglobulin collaborative study group: Prophylactic intravenous administration of standard immune globulin as compared with core-lipopolysaccharide immune globulin in patients at high risk of postsurgical infection. *N. Engl. J. Med.* 1992;327:234–240
- 16 Sandys GH: A new method for preventing swarming of *Proteus* sp. with a description of a new medium suitable for use in routine laboratory practice. *J. Med. Lab. Technol.* 1960;17:224–233
- 17 Ditter B, Becker K-P, Urbaschek R, Urbaschek B: Quantitativer Endotoxinnachweis. Automatisierter, kinetischer Limulus-Amöbozyten-Lysat-Mikrotiter-Test mit Messung probenabhängiger Interferenzen. *Drug Res.* 1983;33:681–687
- 18 Urbaschek R, Becker K-P: Endotoxinnachweis im Plasma. Spezifität und Aussagekraft für Entwicklung und Prognose einer Sepsis. *Infusionsther. Transfusionsmed.* 1993;1:16–20
- 19 Emmendorfer A, Hecht M, Lohmann-Matthes M-L, Roesler J: A fast and easy method to determine the production of reactive intermediates by human and murine phagocytes using dihydro-rhodamine 123. *J. Immunol. Methods* 1990;131:269–275
- 20 Nazzari C, Gaeta A, Lun MT, Raponi G, Antonelli M, Mancini C, Filadoro F: Effect of intravenous immunoglobulin on opsonic activity and TNF production in patients at high risk for sepsis syndrome. *Microbiologica* 1993;16:251–258
- 21 Shimoza T, Iwata M, Tamura N: Suppression of tumor necrosis factor alpha production by a human immunoglobulin preparation for intravenous use. *Infect. Immunol.* 1990;58:1384–1390
- 22 Andersson UG, Björk L, Skansen-Saphir U, Andersson JP: Down regulation of cytokine production and interleukin-2 receptor expression by pooled human IgG. *Immunology* 1993;79:211–216
- 23 Darville T, Tabor T, Simpson K, Jacobs RF: Intravenous immunoglobulin modulates human mononuclear phagocyte tumor necrosis factor- α production in vitro. *Pediatr. Res.* 1994;35:397–403
- 24 Wagner DR, Heinrich D: Influence of polyclonal immunoglobulins on the polymorphonuclear leukocyte response to lipopolysaccharide of *Salmonella enteritidis* as measured with luminol-enhanced chemiluminescence. *Infect. Immun.* 1994;62:4320–4324
- 25 Pfeiffer L, Ehrhardt N, Kretzschmar M, Urbaschek R, Schubert K, Schirrmeyer W: Endotoxinämie und Multiorganversagen nach Polytrauma. *Anaesthesiol. Reanimat.* 1996;21:91–96

Priv. Doz. Dr. med. Thea Koch

Institut für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin
Klinikum Mannheim
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim der Univ. Heidelberg
Theodor-Kutzer-Ufer
68167 Mannheim