

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie
- Direktor: Prof. Dr. med. B.E. Strauer -

Verlaufsbeobachtung
des septischen Schocks unter Berücksichtigung
des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christian Jürgen Buhn
2000

Als Inauguraldissertation gedruckt
mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger
Dekan

Referent: Prof. Dr. Kelm
Korreferentin: Prof. Dr. Kolb-Bachofen

Liste der Abkürzungen:

a	Ordinatenabschnitt einer Regressionsgeraden
ANOVA	Varianzanalyse
APACHE	Acute physiology and chronic health evaluation
b	Steigungsmaß einer Regressionsgeraden
CO	Herzminutenvolumen
CRP	C-reaktives Protein
CVVH	Kontinuierliche veno-venöse Hämofiltration
EDRF	Endothelabhängiger Relaxationsfaktor
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HZV	Herzzeitvolumen
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
KOH	Kaliumhydroxid
L-Arg	L-Arginin
L-Cit	L-Citrullin
L-HOArg	L-Hydroxyarginin
MAP	Arterieller Mitteldruck
NaPBS	Natriumphosphatpuffersystem
NO	Freies Radikal des Stickstoffmonoxids
NOS	NO-Synthase (EC 1.14.13.39)
NO _x	Summe der Gesamtstickoxide
OPA	ortho-Phthaldialdehyd
PVR	Pulmonaler vaskulärer Widerstand
PCWP	Pulmonaler Verschlußdruck
r	Korrelationskoeffizient
RES	Retikuloendotheliales System
SAPS	Simplified acute physiology score
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SSA	Sulfosalizylsäure
SV	Schlagvolumen
SVR	Systemischer vaskulärer Widerstand
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
ZVD	Zentraler Venendruck

Inhalt:

1.	Einleitung	1
2.	Patienten und Methoden	7
2.1.	Analysen	7
2.1.1.	Ultraviolett-Photometrie zur Bestimmung der Gesamtstickoxide	7
2.1.2.	Aminosäurenanalyse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie	9
2.1.3.	Bestimmung des Laktatspiegels	13
2.1.4.	Routinelaborbestimmungen	14
2.2.	Intensivstationäre Überwachung	14
2.2.1.	Meßmethoden der Intensivstation	14
2.2.2.	Blutentnahme und Probenaufarbeitung	15
2.3.	Patientenkollektive	15
2.3.1.	Gesamtkollektiv	15
2.3.2.	Sepsis-Score	17
2.4.	Mathematisch-statistische Methoden	19
3.	Ergebnisse	21
3.1.	Evaluierung der analytischen Methoden	21
3.1.1.	Ultraviolett-Photometrie nach Griess zur Bestimmung der Gesamtstickoxide	21
3.1.2.	Hochdruckflüssigkeitschromatographie	22
3.2.	Validierung des Sepsis-Score	24
3.3.	Konzentrationen der Gesamtstickoxide (NO _x)	29
3.4.	Aminosäurenkonzentrationen der septischen Patienten	39
4.	Diskussion	42
4.1.	Patientenkollektive und Studienprotokoll	42
4.2.	Sepsis-Score	42
4.3.	Gesamtstickoxide	45
4.3.1.	Einflußfaktoren der Plasmakonzentration von NO _x	45
4.3.2.	NO _x als Parameter zur Abschätzung der NO-Produktion	49

5.	Literaturverzeichnis	52
6.	Danksagung	57
7.	Lebenslauf	58
8.	Zusammenfassung	59

1. Einleitung

Der Begriff Sepsis bezeichnet die systemische Antwort des Körpers auf eine Infektion. Sepsis ist definiert als eine „Allgemeininfektion mit Krankheitserscheinungen, die infolge konstanter oder periodischer Mikrobenaussaat von einem Herd aus in die Blutbahn auftreten“⁹⁵. Die wesentlichen Kennzeichen sind entweder Hyperthermie oder Hypothermie, Leukozytose, Tachypnoe, Tachykardie, arterielle Hypotension und eine gestörte Organfunktion mit Stoffwechselentgleisungen infolge Minderperfusion der Organe. Gefährliche Komplikationen der schweren Sepsis sind der septische Schock und das Multi-Organ-Versagen, die nicht selten zum Tode des Patienten führen. Da die beschriebenen Symptome auch ohne die Reaktion des Körpers auf eine Infektion auftreten können (z.B. bei Pankreatitis, Polytrauma oder hämorrhagischem Schock), wurde auf der Konsensus-Konferenz im Jahre 1991 der Begriff SIRS (Systemic inflammatory response syndrome) eingeführt. SIRS beschreibt den inflammatorischen Prozeß unabhängig von der Ursache. Die Sepsis ist demzufolge ein Sonderfall des SIRS, bei dem die klinischen Veränderungen durch eine Infektion hervorgerufen werden. Der septische Schock ist definiert als Sepsis, bei der ein Blutdruckabfall auf einen systolischen Blutdruck von < 90 mmHg oder ein Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks ausgehend vom Durchschnittswert um > 40 mmHg zu beobachten ist⁴.

Die Sepsis ist mit 75.000 Todesfällen in Deutschland jährlich eine der häufigsten Todesursachen auf chirurgischen und medizinischen Intensivstationen⁹³. Es treten bei geschätzten 300.000 - 500.000 Bakteriämien pro Jahr in den USA⁷ ungefähr 175.000 Todesfälle durch Sepsis auf. Die Letalität der Sepsis beträgt 30-80%^{6,7,3} und die Inzidenz soll in den kommenden Jahren noch weiter ansteigen^{93,12}.

Bakterienbestandteile wie Endotoxin und die durch sie freigesetzten Zytokine bewirken über eine Aktivierung von Kaskadensystemen (Gerinnung, Fibrinolyse, Kinin- und Komplementsystem) eine ischämisch-hypoxische und metabolisch-toxische Störung der Zellfunktion der Organe. In tierexperimentellen Studien konnten in der Vergangenheit die molekularbiologischen Veränderungen in der Sepsis näher entschlüsselt werden. So bedeutet Sepsis die unkontrollierte Freisetzung der proinflammatorischen Mediatorsubstanzen Tumornekrosefaktor- α ⁵⁶ und Interleukin 1 und 6^{15,35}. Die Bildung sowie Aktivierung von Mediatoren wie Lipidmediatoren (Plättchenaktivierender Faktor [PAF], Thromboxane, Prostaglandine, Leukotriene)^{9,73}, Sauerstoffradikalen (Peroxid, Hydroxyl), Proteasen und insbesondere Stickstoffmonoxid (NO) bewirken eine negative Beeinflussung des Kreislaufzustandes mit Blutdruckabfall bis hin zum

septischen Schock, der häufig selbst durch hochdosierte Katecholaminzufuhr nicht mehr korrigiert werden kann.

Patienten im septischen Schock sind hypoton und haben eine blasse und kaltfeuchte Haut, die in der Frühphase des Schocks aber auch rosig und gut durchblutet sein kann. Durch eine eingeschränkte Nierendurchblutung wird die Urinproduktion eingestellt, so daß es zur Oligurie und zum Nierenversagen kommt. Eine Minderperfusion des Gehirns kann zu Verwirrtheit und Bewußtseinsstörungen führen. Mögliche hämodynamische Veränderungen des septischen Schocks sind eine normale oder erhöhte Auswurfleistung des Herzens (CO) ^{66,11}, ein intravasaler Flüssigkeitsmangel ⁴⁵ und ein Abfall des systemischen vaskulären Widerstandes (SVR) ³¹. Eine arteriovenöse Shuntbildung führt zur gestörten Aufnahme von Sauerstoff ins Gewebe ⁸³ und resultiert in einer Fehlverteilung des Blutes mit Sammlung im venösen Stromgebiet. Die gestörte Sauerstoffaufnahme in die Zelle behindert die Bildung von energiereichen Phosphaten mit der Folge, daß die Zelle ihren Stoffwechsel von aerober nach anaerober Oxidation wechselt ²³. Dadurch fallen vermehrt saure Stoffwechselprodukte wie das Laktat an, das bei den Patienten im Blut nachweisbar ist und eine Laktatazidose verursachen kann ^{6,68}. Der Glukose- und der Lipidstoffwechsel werden im septischen Schock ebenfalls beeinflusst. Im Sinne einer maximalen Energiebereitstellung ist die Katecholaminfreisetzung stark erhöht, die Glukoseeinschleusung in die Zelle durch Insulinmangel gehemmt und die Glukosefreisetzung dagegen durch Glukagon und Kortison stark erhöht ⁸³.

Zu Beginn des septischen Schocks besteht fast immer eine Hypotension und eine Hypovolämie durch die Fehlverteilung des Blutes und die gestörte Kapillarfunktion mit Flüssigkeitsverlust ins Interstitium ⁶⁸. Nach Korrektur des Flüssigkeitsmangels durch intravenöse Flüssigkeitssubstitution ist das Fortbestehen der Hypotension bei erhöhtem Herzzeitvolumen und erniedrigtem systemischen vaskulären Widerstand zu beobachten ^{78,68,11,12}. Diese Veränderungen der hämodynamischen Parameter während der Sepsis können mittels Rechtsherzkatheter über die Bestimmung des Herzzeitvolumens und der abgeleiteten Größen wie systemischer vaskulärer Widerstand (SVR), pulmonaler vaskulärer Widerstand (PVR) und Schlagvolumen (SV) nachgewiesen werden. Ein erhöhtes Herzzeitvolumen und besonders ein erniedrigter SVR sind hämodynamische Veränderungen, die charakteristisch für das Vorliegen eines septischen Schocks sind ^{31,71,68}.

Sepsis und ihre Folgeerscheinungen stellen demzufolge kein starres Krankheitsbild dar, sondern sind viel mehr ein fließender Krankheitsprozeß, dessen klinische und pathophysiologischen Symptome sich mit der Schwere der Erkrankung verändern. Die frühzeitige Diagnosesicherung und genaue Verlaufsbeobachtung der Sepsis ist aufgrund des Schweregrades der Erkrankung mit

einer hohen Letalität von entscheidender Bedeutung, um rechtzeitig mit der Therapie beginnen zu können.

Um den Schweregrad einer Erkrankung und das Risiko eines fatalen Ausgangs abschätzen zu können, wurden eine Vielzahl von Klassifikationssystemen für Intensivpatienten wie der APACHE I und II ^{41,42}, der Simplified Acute Physiology Score ^{49,79,80}, der Trauma Score ⁸ oder der Hannover Intensive Score ⁵¹ entwickelt. Diese als Score bezeichneten Punktesysteme beschreiben den Allgemeinzustand des Patienten, eignen sich jedoch nur bedingt zur Verlaufsbeobachtung einer Sepsis, da sie die krankheitstypischen Veränderungen der Sepsis nicht berücksichtigen ⁸¹. Im Gegensatz dazu sind an chirurgischen Patienten entwickelte spezielle Scoresysteme, wie z.B. der Sepsis Severity Score ⁸⁴, spezifisch für das Krankheitsbild der Sepsis anwendbar. Sie beinhalten aber bestimmte Kriterien, wie etwa Zustand nach operativem Eingriff oder postoperative Wundinfektion, die von einem internistischen Patientenkollektiv nicht erfüllt werden können. Aus diesem Grund wurde für die vorliegende Studie zunächst ein einfach zu erhebender Sepsis-Score speziell für ein internistisches Patientenkollektiv entwickelt, der die Verlaufsbeobachtung der Kreislaufveränderungen im septischen Schock ermöglicht. Mit Hilfe dieses Sepsis-Score konnten die Veränderungen des im folgenden beschriebenen L-Arginin-NO-Stoffwechselweges im septischen Schock näher untersucht werden.

Den Grundstein für die Erforschung der Ursachen des Blutdruckabfalles im septischen Schock lieferten 1980 Furchgott et al. Sie wiesen erstmals nach, daß die Endothelzellen der Gefäße eine wesentliche Rolle bei der Gefäßerweiterung spielen ²¹. Nur bei intakten Endothelzellen konnte eine Dilatation der isolierten Gefäße durch Acetylcholin und Bradykinin gezeigt werden. In darauffolgenden Arbeiten wurde eine vom Endothel kontinuierlich freigesetzte gefäßerweiternde Substanz entdeckt, der man die Bezeichnung EDRF gab. Sie wird durch die Stimulation vasoaktiver Mediatoren von den Endothelzellen gebildet und bewirkt eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur sowie eine Hemmung der Thrombozytenanlagerung an der Gefäßwand. Die weitere Untersuchung von EDRF zeigte, daß diese Substanz unter basalen und stimulierten Bedingungen mit NO identisch ist ^{20,37,64}. Der Stoffwechselweg, der zur Freisetzung von NO führt, konnte in den Jahren 1988 bis 1991 aufgedeckt werden: NO entsteht substratspezifisch aus der Aminosäure L-Arginin durch enzymatische Umwandlung der terminalen Guanidingruppe mit Hilfe des Enzyms NO-Synthase ^{65,74}. Dieser sogenannte L-Arginin-NO-Stoffwechselweg ist in **Abbildung 1** dargestellt. In einem ersten Oxidationsschritt wird aus L-Arginin und molekularem Sauerstoff zunächst das Zwischenprodukt L-Hydroxyarginin gebildet, das dann in einem zweiten Oxidationsschritt wieder unter Verbrauch von Sauerstoff zu L-Citrullin und NO umgewandelt wird.

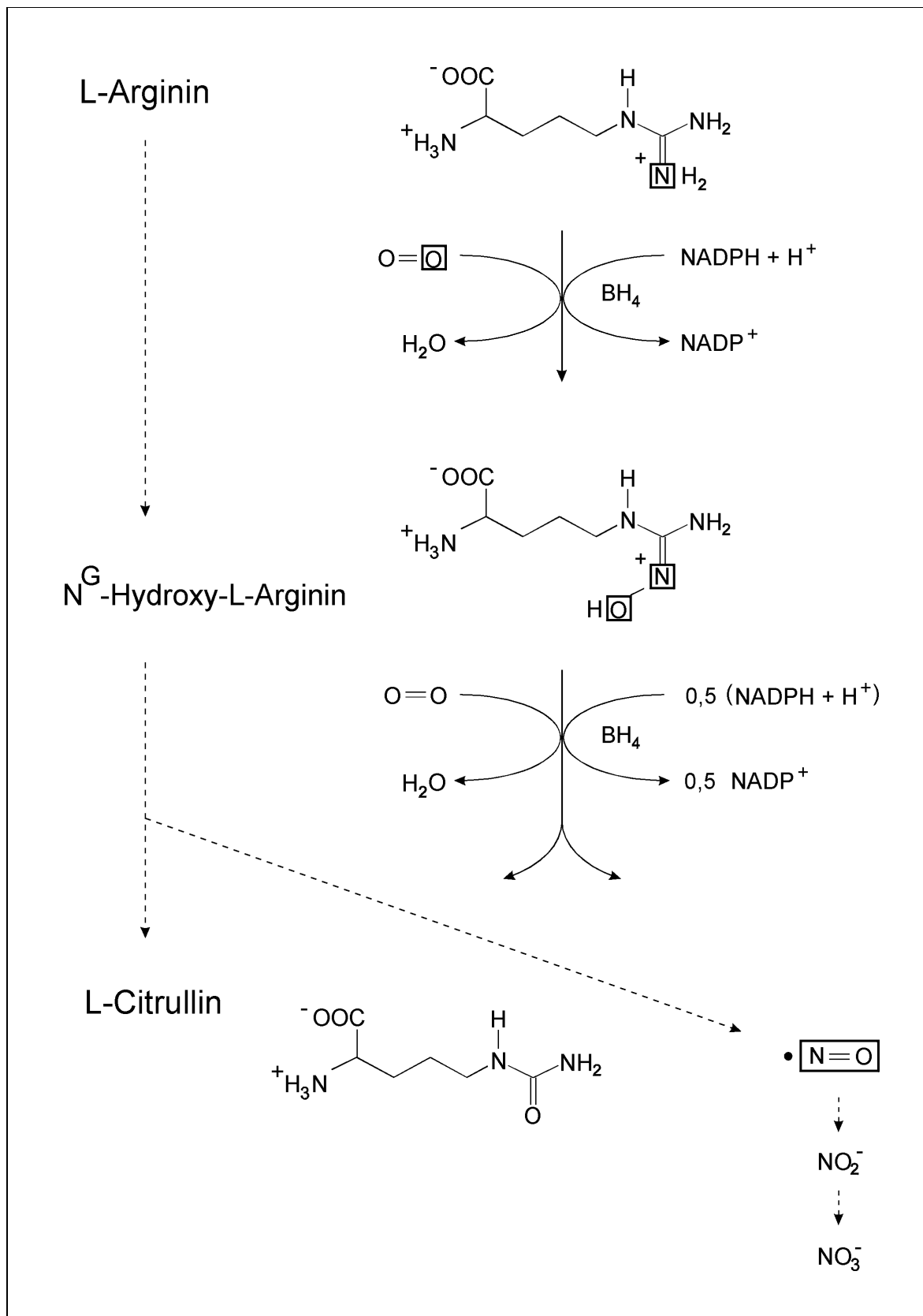


Abbildung 1: Reaktionsweg des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges.

Dargestellt ist die Umwandlung der Aminosäure L-Arginin als Substrat des Stoffwechselweges durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) in die Produkte L-Citrullin und NO unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff. Als Intermediärprodukt entsteht das instabile L-Hydroxyarginin, das bei hohem Umsatz der iNOS im Plasma nachweisbar ist. Unter physiologischen Umsatzraten der iNOS kann L-Hydroxyarginin dagegen nicht detektiert werden. Kofaktoren des Syntheseweges sind Tetrahydrobiopterin (BH_4) und $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Das freie Radikal NO wird im Plasma zunächst zu Nitrit und schließlich in den Erythrozyten weiter zu Nitrat oxidiert, das dann über die Nieren ausgeschieden wird.

Tetrahydrobiopterin und NADPH sind Kofaktoren der beiden Reaktionsschritte.

NO wird in vivo durch drei verschiedene Isoformen der NO-Synthase (NOS) gebildet (Übersicht siehe bei ^{43,54,60}): Typ I als konstitutive Form (nNOS) nachgewiesen im neuronalen Gewebe, Typ II (iNOS) als durch Zytokine induzierbare Isoform in Makrophagen, Hepatozyten, Epithelzellen, glatten Muskelzellen und makrovaskulären Endothelzellen und Typ III (eNOS) als konstitutive Isoform nachgewiesen in Zellen des vaskulären Endothels. Das von den drei Isoformen produzierte NO beeinträchtigt in höheren Konzentrationen in vielfältiger Weise die biologische Funktion und Autoregulation von Zellen. Einerseits hilft es dem Organismus durch seine potente antivirale und antibakterielle Aktivität bei der Abwehr von Krankheitserregern, andererseits kann es an der Fehlregulation und der Zerstörung von körpereigenen Zellen beteiligt sein ^{46,47}. Es konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, daß NO bei der Zerstörung der Inselzellen des Pankreas beim Diabetes mellitus Typ 1 eine entscheidende Rolle spielt ⁴⁴.

Von besonderem Interesse für die Untersuchung der septischen Hypotension ist die Isoform II der NOS, da die Umsatzraten der aktivierten iNOS um den Faktor 100-1000 über denen der beiden konstitutiven NO-Synthasen liegen. Eine quantitative Messung der NO-Produktion ist in vivo allerdings nicht möglich, da NO als Radikal eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt ³⁸ und im Blutplasma und in den Erythrozyten sofort zu den Stoffwechselendprodukten Nitrit und Nitrat weiteroxidiert wird.

Tierexperimentelle Studien zeigten, daß als Ursache für den erniedrigten systemischen Gefäßwiderstand im septischen Schock die vermehrte Bildung von NO durch die iNOS betrachtet werden kann (Übersicht bei ^{67,88,57}). In den meisten dieser Studien wurde versucht, die NO-Produktion indirekt über die Bestimmung der Endprodukte des NO-Stoffwechsels Nitrit und Nitrat (in der Summe als NOx bezeichnet) zu beurteilen. In darauffolgenden Studien an Patienten waren die Ergebnisse bezüglich der NOx-Konzentration teilweise uneinheitlich: In sehr kleinen Studienkollektiven konnte bei Patienten mit Sepsis ^{63,62}, postoperativem Status ^{19,90} und septischem Schock ^{19,25} eine erhöhte NOx-Konzentration gemessen werden. Dagegen fielen die NOx-Konzentrationen bei posttraumatischen Patienten mit Sepsis signifikant ab ^{63,36}. Zusätzlich konnten durch den Einsatz von Substanzen, die die NO-Synthase hemmen, die NOx-Konzentrationen bei Patienten im septischen Schock nicht gesenkt werden ^{2,52,70}. All dies zeigt, daß die diagnostische Wertigkeit der NOx-Konzentration als Maß für die überschießende NO-Produktion bei Patienten im septischen Schock bisher nicht gänzlich geklärt werden konnte. Kenntnisse darüber, ob die NOx-Konzentration bei Betrachtung des individuellen Schockverlaufes eine Veränderung, d.h. eine Abnahme oder eine Zunahme der NO-Produktion, anzeigen kann, fehlen bisher in der Literatur.

Das Ziel dieser Studie war die statistische Auswertung eines 424 Patienten umfassenden internistischen Patientenkollektives und die Etablierung eines Sepsis-Score zur Beurteilung der Kreislauftsituation im septischen Schock. Mit Hilfe dieses neu entwickelten Sepsis-Score sollten die Veränderungen der Parameter des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges im septischen Schock beurteilt werden: Untersucht wurden das Substrat L-Arginin, das Intermediärprodukt L-Hydroxyarginin, das sich in experimentellen Studien an Ratten als sensitiver und spezifischer Marker der Aktivität der iNOS erwies ³³, und das Endprodukt NOx (vgl. Abb. 1). Es galt insbesondere die Wertigkeit von NOx für die Verlaufsbeurteilung des septischen Schocks zu bestimmen und mögliche Einflußfaktoren auf den Plasmaspiegel von NOx zu identifizieren.

2. Patienten und Methoden

Zunächst werden die beiden analytischen Meßmethoden zur Bestimmung der Gesamtstickoxide (NO_x) und der Aminosäuren im humanen Plasma sowie die intensivmedizinische Betreuung der Patienten und die Blutentnahmetechnik näher erläutert. Danach werden das Gesamtkollektiv an Patienten und das Kollektiv zur Auswertung der gemessenen Konzentrationen an NO_x vorgestellt. Auf die Erstellung und die Validierung des neuentwickelten Sepsis-Score an einem Subkollektiv wird in Kapitel 2.3.2. eingegangen.

2.1. Analysen

2.1.1. Ultraviolett-Photometrie zur Bestimmung der Gesamtstickoxide

Für jeden Beobachtungstag eines jeden Patienten wurden die Gesamtstickoxide (Summe von Nitrit und Nitrat) im Plasma mit einer modifizierten Meßmethode nach Griess ²⁹, eine der gebräuchlichsten Methoden für die Nitritdetektion, bestimmt. Dieses Meßverfahren beruht auf einer Reaktion von Nitrit mit Sulfanilamid, Griess Reagenz 1, und einer Azokopplung des Produktes an N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin, Griess Reagenz 2 (beide Cayman Chemical Company, Ann Arbor, U.S.A.). Der bei dieser Diazotierung entstehende violette Azofarbstoff kann bei einer Absorptionswellenlänge von 540 nm mit dem Photometer quantitativ bestimmt werden und entspricht äquimolar der Konzentration an Nitrit. Nitrat kann die beschriebene Reaktion nicht eingehen und muß deshalb vorab zu Nitrit reduziert werden. Zur Reduktion von Nitrat wurde eine enzymatische Methode ⁷⁶ verwendet, die das Enzym Nitratreduktase von *Aspergillus sp.* (EC 1.6.6.2.) ^{55,58} einsetzt. NADPH, das für die Funktion der NO-Synthase ein wichtiger Kofaktor ist, beeinflußt die Reaktion der Griessreagenzien mit Nitrit. Um die NADPH Konzentration unter der Beeinflussungsgrenze zu halten, kam ein Enzymkofaktorsystem zur Anwendung. Teil dieses Systems sind NADP⁺ und Glukose-6-phosphat, die den niedrigen NADPH-Spiegel durch chemische Umwandlung gewährleisten. Die Konzentration von NADPH betrug 1 µM während der Reduktion mit Nitratreduktase und 0,5 µM nach Zugabe der beiden Griessreagenzien.

Das aus der arteriellen Verweilkanüle gewonnene Patientenplasma wurde zur Deproteinisierung mittels Ultrafiltrationsröhrchen (Sartorius, Göttingen, Deutschland, cut-off 10 kDA) bei 2500 g für 30 Minuten ultrafiltriert. Das wasserklare Ultrafiltrat wurde dekantiert und der photometrischen Analyse zugeführt. Zur photometrischen Bestimmung wurden Mikrotiterplatten, die gleichzeitig als Reaktionsgefäße für die Farbreaktion dienten, verwendet. Jeweils 20 µl des wasserklaren Ultrafiltrates des Patientenplasmas wurden als nächstes auf 80 µl verdünnt und danach mit jeweils 10 µl Nitratreduktase und Enzymkofaktor versetzt. Eine Inkubationszeit von

drei Stunden bei abgedeckter Titerplatte und Raumtemperatur zur Reduktion des Nitrates wurde für alle Proben eingehalten. Zum Starten der Azoreaktion wurden nacheinander 50 µl Sulfanilamid und 50µl N-(1-Naphthyl)ethyldiamin dazugegeben und eine Reaktionszeit von 10 Minuten zur vollen Entwicklung der Farbreaktion bei Zimmertemperatur eingehalten. Die anschließende Messung der Proben erfolgte im Photometer (Labsystems® iEMS Reader MF, Frankfurt) bei λ 540 nm. Für jede Messung wurden mit den für die jeweilige Meßreihe angesetzten Reagenzien externe Standardreihen für Nitrat und Leerwerte mitbestimmt. Sowohl die Patientenproben als auch die Standardreihen für Nitrat und die Leerwerte wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt und zur Berechnung der Konzentrationen die entsprechenden Mittelwerte gebildet.

Die Verwendung des Enzyms Nitratreduktase und die Bestimmung mit Mikrotiterplatten und Photometer erwiesen sich als ein geeignetes Meßverfahren, um eine hohe Probenzahl schnell analysieren zu können. Bei der Analyse verschlüsselte eine Kodierung die Identität der Patientenprobe für den Untersucher.

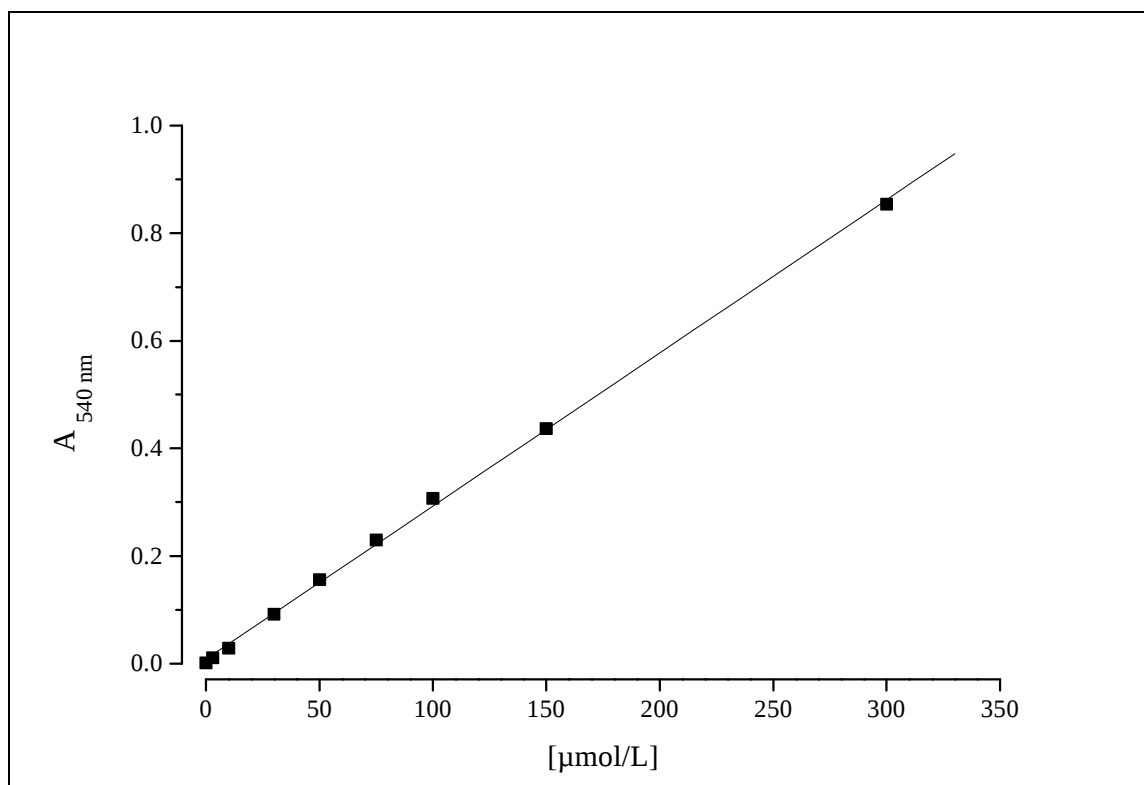


Abbildung2: Standardreihegerade zur Berechnung der Gesamtstickoxide

Die Berechnung der Konzentration der Gesamtstickoxide erfolgte für jede Meßreihe über die zugehörigen Standardeichreihen für Nitrat, indem die aufsteigenden Konzentrationen der Eichung in einer Grafik auf der Abszisse und die entsprechenden Absorptionswerte auf der Ordinate eingetragen wurden (**Abbildung 2**).

Die durch die einzelnen Punkte gelegte Regressionsgerade ($Y=a+b \cdot X$) dieser externen Eichreihe ermöglichte die Umrechnung der Absorptionswerte der Plasmaproben. Zuvor wurde für jede Probe die Leerwertabsorption subtrahiert. Eine Verdünnung der ursprünglichen Patientenprobe durch die verschiedenen Reagenzien wurde bei der Berechnung der Konzentrationen mit einem entsprechenden Faktor ausgeglichen. Als Qualitätskriterium der einzelnen Messungen galt der Korrelationskoeffizient r der Regressionsgeraden, der stets größer 0,98 sein mußte.

2.1.2. Aminosäurenanalyse mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Beurteilung des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges wurden die Aminosäuren L-Arginin (L-Arg) und L-Citrullin (L-Cit) sowie das Intermediärprodukt L-Hydroxyarginin (L-HOArg) durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie in ihren Konzentrationen bestimmt. Als Meßverfahren wurde eine modifizierte hochdruckchromatografische Methode in Anlehnung an Fürst et al.²² verwendet, bei der die Aminosäuren in einer Vorsäulenderivatisierung fluoreszenzmarkiert werden. Als Derivatisierungsreagenz wurde o-Phthaldialdehyd (Sigma, Deisenhofen) eingesetzt, das im alkalischen pH-Bereich mit den Aminosäuren reagiert und intensiv fluoreszierende thiol-substituierte Isoindolkomplexe bildet. Nach der Trennung der Aminosäuren durch die analytische Trennsäule erfolgte die Fluoreszenzdetektion. Um zu gewährleisten, daß sich die Konzentration der freien Aminosäuren im Plasma durch Zerfall der Plasmaproteine nicht verändern, wurde vorher eine Eiweißfällung des Patientenplasmas mit dem Deproteinisierungsreagenz 5-Sulfosalizylsäure (Merck, Darmstadt) durchgeführt²⁴. Zur Bestimmung der L-HOArg Konzentration wurde ein zweiter Fluoreszenzdetektor verwendet, der durch eine modifizierte Einstellung die niedrigeren Konzentrationen im Plasma besser auflösen konnte. Die Auswahl der Meßanordnung ermöglichte bei nur einem Meßdurchgang und einer Analysendauer von ca. 50 Minuten einen sensitiven Nachweis der interessierenden Aminosäuren, eine vollständige chromatographische Trennung und eine automatisierte Probenaufgabe auf die Trennsäule.

Die HPLC-Anlage zur Aminosäurenmessung setzte sich aus einer Doppelhub-Pumpe S 1100, einer vorgeschalteten aktiven Niederdruckmischkammer (beide Sykam, Gilching, Deutschland) und einem kühlbaren Probenaufgeber Triathlon (Spark Holland, Emmen, Niederlande) zusammen. Die Detektion erfolgte mit zwei identischen hintereinandergeschalteten Fluoreszenzdetektoren Typ LC 304 (Linear Instruments, Reno NE, USA), die mit einer

Extinktionswellenlänge von 330 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm arbeiteten und über einen 1 Volt-Ausgang angeschlossen wurden. Die Messungen wurden mit einer 3,1 µL Durchflußzelle und einer gepulsten Xenon-Lampe (4 W, Lampenfrequenz 20 Hz) durchgeführt. Der erste Detektor wurde auf den Meßbereich 5,0 FUFs (Fluoreszenz Units, Full Scale) und der zweite Detektor für die L-HOArg-Bestimmung auf 0,1 FUFs eingestellt. Die digitale Filterkonstante betrug bei beiden 2,0 Sekunden und der Photomultiplier (PMT) wurde auf jeweils 600 Volt eingestellt. Die Steuerung der Pumpe und des Lösungsmittelgradienten der Niederdruckmischkammer sowie die digitale Datenaufnahme erfolgte mit dem Axxiom-System 727 (Moorpack, CA, USA). Als analytische HPLC-Säule wurde eine Hypersil ODS 125*4,6 mm mit einer Körnungsgröße des Trennungsmaterials von 3 µm und einer entsprechenden Vorsäule 20*4,6 mm, 3 µm verwendet (Grom, Herrenberg, Deutschland). Durch einen temperierbaren Säulenofen S 4010 (Sykam, Gilching, Deutschland) wurde die Temperatur der HPLC-Säule über einen Column Thermo Controller S 4010 (Sykam) auf konstant 10°C eingestellt.

Zur Elution der Aminosäuren von der stationären Phase wurde ein binäres Puffersystem verwendet. Der Eluent A bestand aus einem 12,5 mM Natriumphosphatpuffer (NaPBS) pH 7,2 und 1% (v/v) Tetrahydrofuran LiChrosolv[®] (Merck), der Eluent B aus 12,5 mM NaPBS pH 7,2, 15% (v/v) Acetonitril LiChrosolv[®] (Riedel-de Häen, Seelze) und 35% (v/v) Methanol LiChrosolv[®] (Merck). Der Natriumphosphatpuffer wurde vor der Zugabe der organischen Lösungsmittel mit einem 0,20 µm Membranfilter (Sartorius) filtriert. Die Lösungsmittelbehälter wurden anschließend 10 Minuten mit Helium 5.0 (Linde, Höllriegelskreuth) begast. Im Verlauf einer HPLC-Analyse wurde die Eluentenzusammensetzung ausgehend von 100% Eluent A entlang eines für die optimale Trennung der Aminosäuren festgelegten Gradienten schrittweise (0 bis 50 Minuten) auf 100% Eluent B verändert und die Flußgeschwindigkeit im HPLC-System auf 0,65 mL/min eingestellt. Die Detektion der Aminosäuren mittels Fluoreszenzmethode machte eine Derivatisierung der Proben mit o-Phthaldialdehyd (OPA) notwendig. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte, indem 50 µL des Patientenplasmas bzw. des wässrigen Aminosäurenstandards mit 1 mL Chromatographie-Wasser LiChrosolv[®] und 200 µL Kaliumboratpuffer (1 mmol/L Borsäure, pH 10,4 mit KOH) versetzt wurden. Die auf diese Weise aufgearbeiteten Proben wurden bis zur Messung bei 4°C inkubiert. Der Probenaufgeber versetzte 115 µL des Gemisches, mit 50 µL einer OPA-Lösung, die sich aus 50 mg OPA in 4,5 ml Methanol LiChrosolv[®] (Merck), 50 µL 3-Mercaptopropionsäure (Fluka, Buchs, Schweiz) und 0,5 mL Kaliumboratpuffer zusammensetzte. Eine festgelegte Reaktionszeit von 90 Sekunden wurde für alle Proben

eingehalten. Der Probenaufgeber injizierte abschließend ein Aliquot der derivatisierten Probe in die HPLC-Anlage. Einen schematischen Aufbau der HPLC-Anlage zeigt **Abbildung 3**.

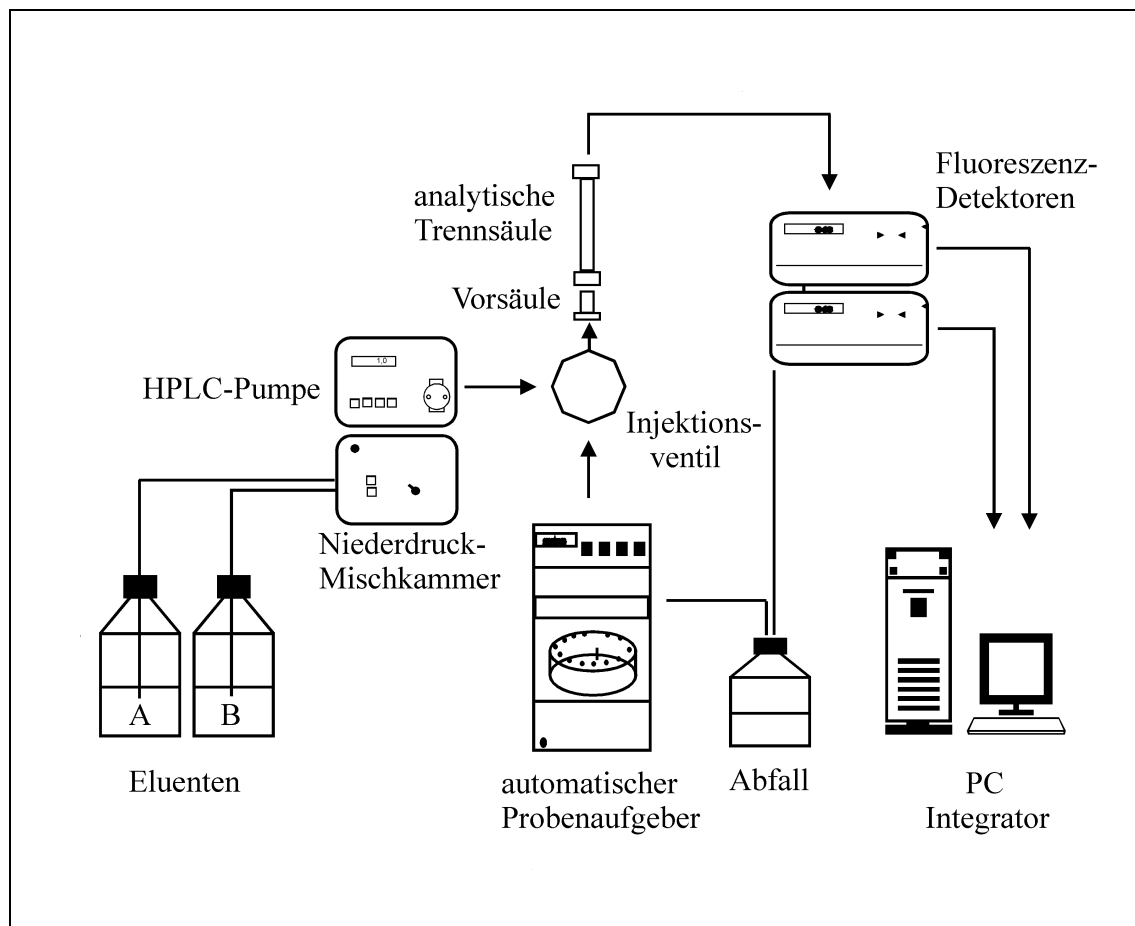


Abbildung 3: Schematische Darstellung der HPLC-Anlage zur Aminosäurenanalytik

Die Eluenten werden in der Niederdruckkammer gemischt und anschließend von der Hochdruckpumpe über die analytische Trennsäule geleitet. Der automatische Probenaufgeber injiziert die aufgearbeiteten Proben über ein Ventil in das Hochdrucksystem und auf die Säule. Die getrennten Aminosäuren werden mit zwei Fluoreszenzdetektoren detektiert. Die Datenverarbeitung leistet ein Computer.

Der automatische Probenaufgeber wurde für die Mischung der Derivatisierungsreagenzien eingesetzt, um die Variabilität der Probenaufarbeitung möglichst gering zu halten. Zusätzlich wurde den Proben und den wässrigen Standards, um den Einfluß der Probenaufarbeitung und die variable Bindung des Derivatisierungsreagenz OPA an die Aminosäuren zu ermitteln, als interner Standard Norvalin (Sigma, Deisenhofen) zugesetzt. Diese Substanz ist eine unphysiologische Aminosäure und bindet ebenso wie die physiologischen Aminosäuren an OPA. Die Zugabe von

Norvalin erfolgte bei der Deproteinisierung, die Endkonzentration betrug 91 $\mu\text{mol/L}$. Der Boratpuffer und die OPA-Lösung wurden bei $+4^{\circ}\text{C}$ bzw. -20°C gelagert.

An jedem Meßtag wurden vor der Vermessung der Plasmaproben Kalibrierungsläufe mit Standardlösungen durchgeführt. Aus den erhaltenen Chromatogrammen konnten die einzelnen Konzentrationen durch Integration der Flächen unter den Kurven und Flächenvergleich mit den Standardkurven ermittelt werden. Bei der Berechnung wurde ein Korrekturfaktor, der sich über den internen Standard Norvalin ermitteln ließ, berücksichtigt. Chromatogramme für einen wässrigen Aminosäurenstandard und eine Patientenplasmaprobe sind in **Abbildung 4 und 5** dargestellt.

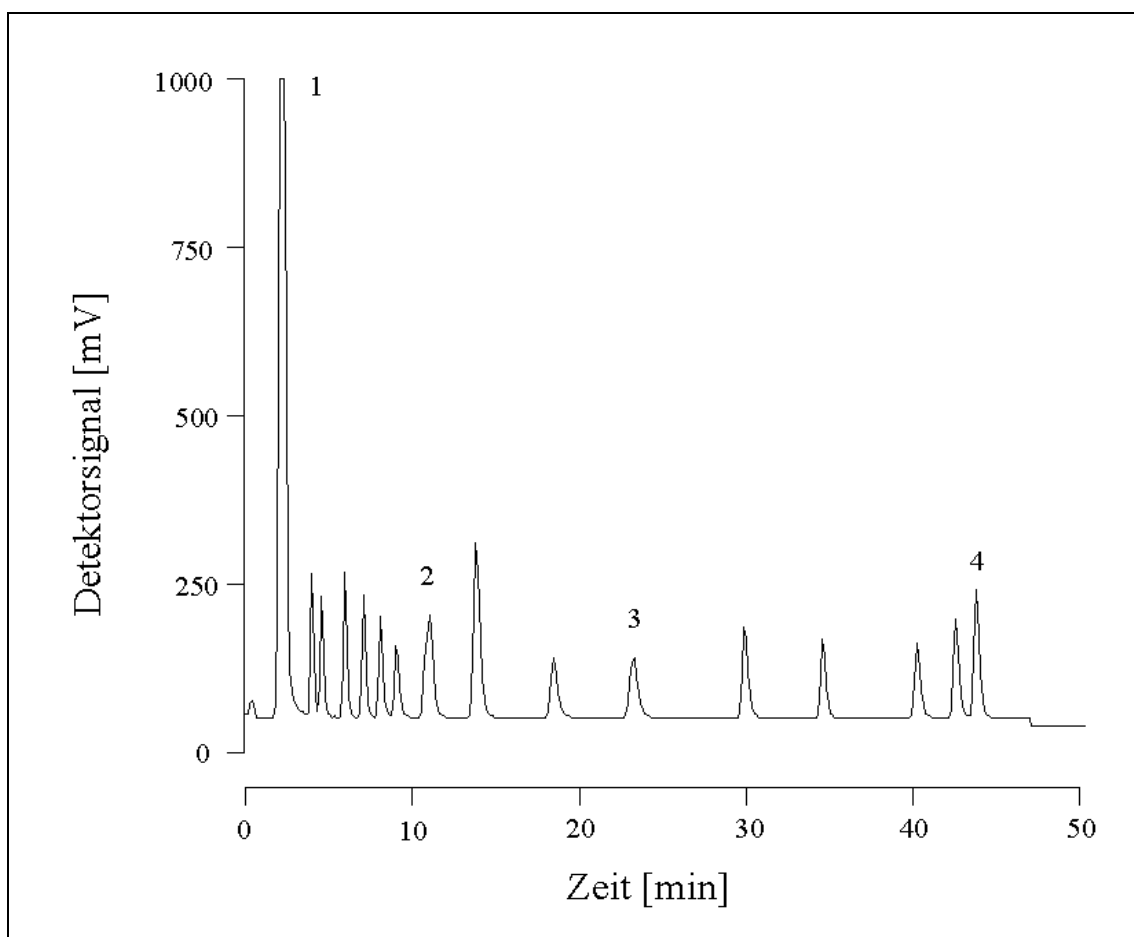


Abbildung 4: Repräsentatives Chromatogramm einer wässrigen Aminosäuren-Standard-Lösung (100 $\mu\text{mol/L}$ je Aminosäure)

Die Identifizierung erfolgte durch Zugabe einzelner Aminosäuren. (alle Aminosäuren: Sigma, Deisenhofen). Die Peaks für L-Citrullin (2), für L-Arginin (3), für die zur Deproteinisierung verwendete Sulfosalicylsäure (1) und für den internen Standard Norvalin (4) sind in der Abbildung markiert.

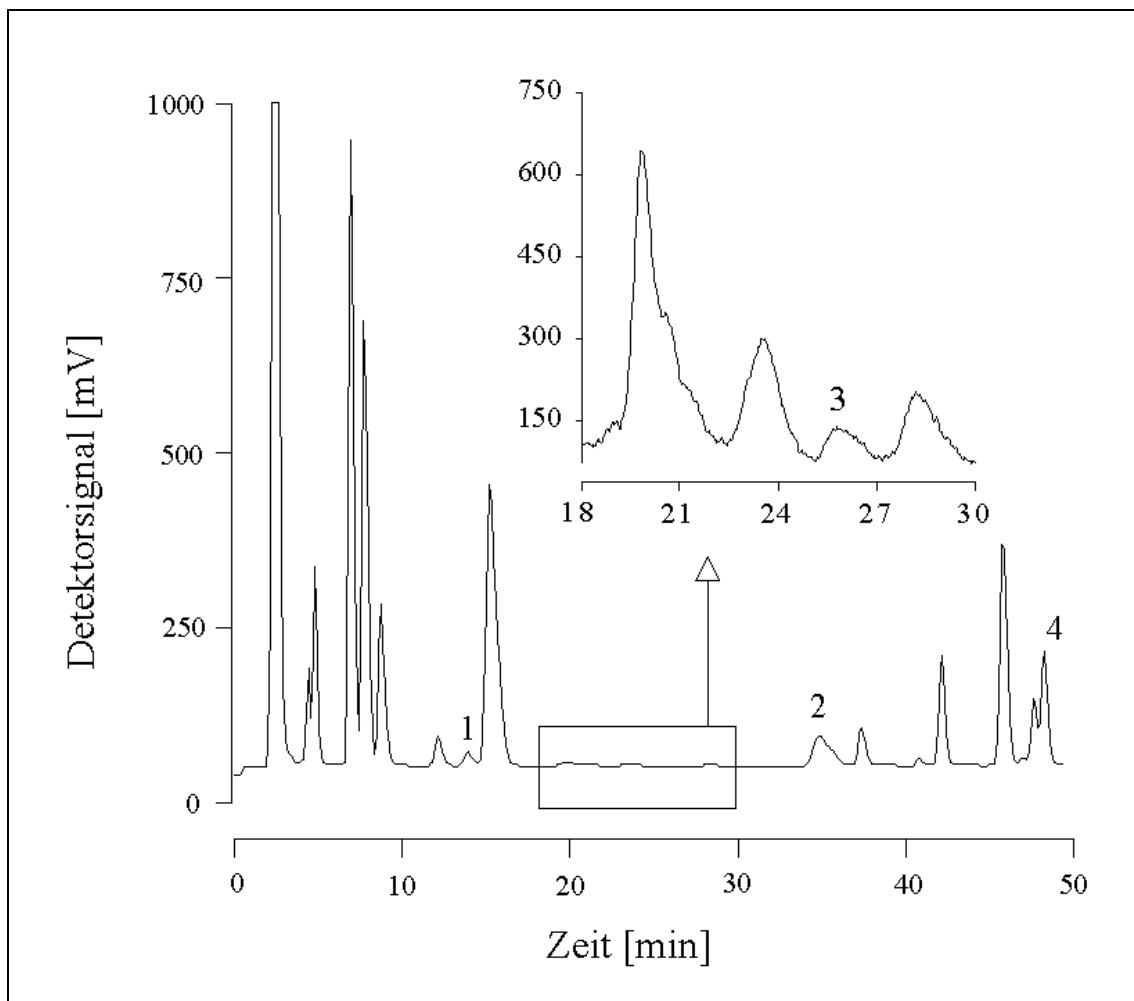


Abbildung 5: Repräsentatives Chromatogramm der Plasmaprobe eines Patienten in der septischen Phase.

Mit Hilfe der Hochdruckflüssigkeitschromatographie konnten die Konzentrationen folgender Komponenten des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges gemessen werden: das Substrat L-Arginin (2), das Reaktionsprodukt L-Citrullin (1) und das Intermediärprodukt L-Hydroxyarginin (3) sowie der interne Standard Norvalin (4). Der Ausschnitt zeigt die Aufzeichnung des zweiten empfindlicheren Fluoreszenzdetektors für die Bestimmung von L-Hydroxyarginin, das durch diesen Detektor und die Wahl geeigneter Trennbedingungen mit hoher Sensitivität ($0,5 \mu\text{mol/L}$) bei einem Signalrauschverhältnis von 3:1 bestimmt werden konnte. Über eine externe Eichung wurden die Konzentrationen von L-Hydroxyarginin berechnet.

2.1.3. Bestimmung des Laktatspiegels

Da der Serumlaktatspiegel nicht zu den Routineparametern der täglichen Laborbestimmungen gehörte, wurde eigens für alle Beobachtungstage der Patienten der Laktatspiegel mittels eines Analysegerätes (Stat profile 7, Nova Medical, USA), das sich im Herzkatheterlabor der Universitätsklinik befand, ermittelt. Aus der arteriellen Verweilkanüle der Patienten wurden jeden

Tag zusätzlich zur Blutentnahme für die Aminosäuren- und Gesamtstickoxidsmessung 2 mL Blut in ein heparinisiertes Vacutainer-Röhrchen (Becton Dickinson, USA) entnommen. Nach Zentrifugation bei 420 g über 15 Minuten wurde aus dem überstehenden Plasma jeweils eine Doppelbestimmung mit dem Analysegerät durchgeführt und anschließend der Mittelwert gebildet.

2.1.4. Routinelaborbestimmungen

Für die Untersuchungen wurden die täglich bestimmten laborchemischen Routineparameter Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl sowie die Messung des Plasmakreatinins und des C-reaktiven-Proteins berücksichtigt.

2.2. Intensivstationäre Überwachung

Die Betreuung und Behandlung der 424 konsekutiv aufgenommenen Patienten erfolgte durch das intensivmedizinische Team der Medizinischen Klinik B der Heinrich-Heine-Universität. Die Erhebung der klinischen und der laborchemischen Parameter und die Einteilung der Patienten anhand des entwickelten Sepsis-Score erfolgte ohne diagnostische oder therapeutische Einflußnahme.

2.2.1. Meßmethoden der Intensivstation

Mit Hilfe der Rechtsherzkatheteruntersuchung bei liegendem Swan-Ganz-Katheter⁸⁵ konnten folgende hämodynamische Parameter bestimmt werden: das Herzzeitvolumen (CO o. HZV), der Mitteldruck in der A. pulmonalis (MAP), Strömungswiderstände im großen Körperkreislauf (SVR), Strömungswiderstände im kleinen Kreislauf (PVR), das Auswurfvolumen des linken Ventrikels (SV), der pulmonalkapilläre Verschußdruck (PCWP) und der zentrale Venendruck im rechten Vorhof (ZVD). Die Messung des Herzminutenvolumens erfolgte über die Thermodilutionsmethode, bei der 10 mL einer 4°C kalten NaCl-Lösung über das proximale Lumen des Swan-Ganz-Katheters injiziert und die Temperaturerniedrigung in der A. pulmonalis mit Hilfe eines Temperaturfühlers ermittelt werden. Die Datenverarbeitung leistete ein Computer, alle Parameter wurden von dem Überwachungsgerät „Patient Data Processor 560 A“ (FA Kone, Espoo, Finnland) erfaßt und ausgewertet. Das HZV ermittelte sich aus drei aufeinanderfolgenden Bestimmungen, aus denen der Mittelwert gebildet wurde. Die Patientenüberwachung auf der Intensivstation beinhaltete ein bipolares Oberflächen-EKG, die Bestimmung der Atemfrequenz mittels Impedanzmessung und die kontinuierliche arterielle Blutdruckmessung über einen intraarteriellen Verweilkatheter. Die Temperaturmessung mit einem temperaturempfindlichen Widerstand und die Ermittlung der peripheren Sauerstoffsättigung des

Blutes mittels LED vervollständigten die Überwachung. Beatmungspflichtige Patienten wurden mit den Respiratoren Evita I bzw. II (FA Dräger, Lübeck) mechanisch ventiliert. Benötigte ein Patient ein Nierenersatzverfahren, erfolgte dieses in der Regel über eine Hämofiltration (kontinuierliche veno-venöse Hämofiltration = CVVH) mittels des Filtrationsgerätes BSM 20 (FA Hospital Medizintechnik, Nürnberg).

2.2.2. Blutentnahme und Probenaufarbeitung

Aus der bereits liegenden arteriellen Verweilkanüle wurde jeden Tag zusätzlich zum Routineprogramm von allen Patienten 10 mL arterielles Blut unter sterilen Bedingungen in ein heparinisertes Vacutainerröhrchen (Becton Dickinson, USA) für die Aminosäuren- und Gesamtstickoxidsmessung und weitere 3 mL arterielles Blut zur Laktatbestimmung in ein zweites heparinisertes Vacutainerröhrchen entnommen. Um eventuelle Verdünnungseinflüsse durch die Spülflüssigkeit aus dem Kathetersystem zu vermeiden, wurden die ersten Blutropfen verworfen. Die Blutproben wurden anschließend ohne zwischenzeitliche Lagerung mit 420 g bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Eine zügige Aufarbeitung der Proben ist wichtig, weil sich die Aminosäurenkonzentrationen in Vollblutproben bei verzögerter Aufarbeitung verändern^{69,75}. Das Plasma der beiden Röhrchen wurde anschließend in Reaktionsgefäße abpipettiert.

Für die Aminosäurenanalyse wurden zu einem Milliliter Plasma 100 µL einer 30%-igen 5-Sulfosalizylsäurelösung (w/v) (Merck, Darmstadt) zur Deproteinisierung zugegeben, die 1mmol/L Norvalin als internen Standard enthielt. Nachdem das Gemisch geschüttelt worden war, wurde zur vollständigen Denaturierung eine Inkubationszeit von einer Stunde (Lagerung auf Eis) eingehalten. Die Proben wurden danach bei 2500 g für 15 Minuten zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Dieser mußte bei –80°C bis zur Analyse aufbewahrt werden (Revco Scientific Inc, Ashville, NC, USA), weil sich bei einer Lagerungstemperatur von –20°C die Konzentrationen der Aminosäuren in wässrigen Lösungen verändern^{14,89}.

Das Patientenplasma für die photometrische Bestimmung der Gesamtstickoxide wurde zur Deproteinisierung ultrafiltriert und anschließend bis zur Analyse ebenfalls bei –80°C aufbewahrt. Die Konzentration von NOx ist in gefrorenem Plasma mindestens für 1 Jahr stabil⁵⁸. Die Plasmaproben für die Laktatbestimmung wurden bis zur Messung bei –20°C gelagert.

2.3. Patientenkollektive

2.3.1. Gesamtkollektiv

Das Ziel dieser Studie war die Bewertung von NOx im menschlichen Plasma als Parameter zur Beurteilung des Schweregrades der septischen Kreislagsituation. Hierfür wurden in dieser prospektiven Studie alle Patienten, die innerhalb von 6 aufeinanderfolgenden Monaten auf die internistischen Intensivstationen MI 01 und MI 02 der Medizinischen Klinik B der Heinrich-Heine-Universität aufgenommen wurden, erfaßt und hinsichtlich ihrer klinischen und laborchemischen Parameter untersucht. Die Gesamtpopulation bestand aus 424 konsekutiven nicht selektierten Patienten, die an insgesamt 2274 Beobachtungstagen untersucht wurden.

Es existiert eine Vielzahl von Definitionen für Sepsis und für septischer Schock^{4,5,17}. Um für diese Untersuchung die Diagnose septischer Schock stellen zu können, mußten nach Bone et al.⁶ folgende Kriterien erfüllt sein: Arterielle Hypotension (syst. Blutdruck < 90mmHg) mit oder ohne Vasokonstriktorzusatz, Hypothermie (<35,5°C) oder Hyperthermie (>38°C), Tachykardie (>90/min), respiratorische Insuffizienz mit Tachypnoe (>20/min oder maschinelle Ventilation), erhöhtes Serumlaktat und die Minderperfusion von wenigstens einem Endorgan. Bei allen Patienten wurde für jeden Tag des Aufenthaltes auf den Intensivstationen zu einer festgelegten Uhrzeit (6.00 Uhr) folgende Parameter zur Beurteilung der Schwere des septischen Schocks erhoben bzw. protokolliert: Atemfrequenz, Herzfrequenz, Körpertemperatur, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl, Laktatwert und C-reaktives-Protein. Aus diesen sieben Parametern konnte ein neues Scoresystem⁷⁷ zur Diagnosestellung und Verlaufsbeobachtung einer Sepsis erstellt und anhand eines Rechtsherzkatheterkollektivs (p=20) validiert werden. Über die invasive Methode der Herzzeitvolumenmessung mittels Rechtsherzkatheter konnte die Diagnose septischer Schock sicher gestellt resp. verworfen werden. Des weiteren wurden neben der Identität des Patienten, d.h. Name, Geburtsdatum und Geschlecht, noch weitere wichtige Zusatzparameter erhoben: Aufnahmediagnose, Blutdruck, Medikation (insb. Katecholamin- und Kortikoidzufuhr, Antipyretika), Körpergewicht, Kreatininwert, Ernährungsmodus (enteral oder parenteral), Einsatz von mechanischer Kühlung, Einsatz einer CVVH und Blutkulturstatus. Außerdem wurde zur festgelegten Zeit neben der Routineblutentnahme an jedem Tag zusätzliches Blut für die Analyse der Aminosäuren und der Gesamtstickoxide aus einer arteriellen Verweilkanüle entnommen.

Die Patienten auf den Intensivstationen rekrutierten sich aus den Abteilungen Kardiologie, Pulmonologie, Angiologie, Nephrologie, Hämatologie, Gastroenterologie, Rheumatologie, Endokrinologie und Neurologie. Aufgrund der großen Variabilität des Patientengutes und der unterschiedlichen Aufenthaltsdauer, manche Patienten verblieben nur ein oder zwei Tage auf der Intensivstation, wurden für die Beurteilung der biochemischen Analysen kleinere Kollektive

ausgewählt. Um eine ausgeglichene Verteilung für die Anzahl der Beobachtungstage der einzelnen Patienten zu gewährleisten, wurden nur diejenigen Patienten in die statistische Auswertung einbezogen, die eine Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation von mindestens drei Tagen hatten. Dies ergab ein Studienkollektiv von 237 Patienten mit insgesamt 1999 Beobachtungstagen für die Beurteilung der Gesamtstickoxide. Die Aminosäurenkonzentrationen im Plasma wurden von 41 Patienten bestimmt; davon hatten 21 Patienten eine gesicherte Sepsis, 20 nichtseptische Patienten wurde als Kontrolle definiert. Eine Übersicht über die einzelnen Kollektive gibt **Tabelle 1**. Um störende Einflüsse auf den L-Arginin-NO-Stoffwechsel durch andere Erkrankungen bzw. Faktoren zu verhindern, galten als Ausschlußkriterien: (1) Patienten mit einer immunsuppressiven Therapie wegen der Unterdrückung der iNOS, (2) Patienten mit einer chronischen oder akuten Leukämie und (3) Patienten mit einem Tumorleiden.

Tabelle 1: Kollektivübersicht

	Patientenanzahl	Anzahl der Beobachtungstage
Gesamtpopulation	424	2274
Studienkollektiv für die Analyse von NOx	237	1999
Subkollektiv für die Aminosäureanalytik	41	198
Subkollektiv für die Validierung des Sepsis-Score	20	150

2.3.2. Sepsis-Score

In dem Untersuchungszeitraum von 6 Monaten wurden insgesamt 20 Patienten der internistischen Intensivstationen aus klinischer Indikation bei unklarer Kreislagsituation mit einem Rechtsherzkatheter (Swan-Ganz) zur Bestimmung des Herzzeitvolumens und der abgeleiteten hämodynamischen Parameter versorgt. Jeder Einschwemmkatheter wurde für maximal drei Tage belassen und dann in Abhängigkeit vom klinischen Verlauf entfernt oder gegen ein neues Kathetersystem gewechselt. Pro Patient fanden nur die Tage Eingang in die Bewertung, an denen der Patient mit einem HZV-Katheter versorgt war. Als Ausschlußkriterien für dieses Rechtsherzkatheterkollektiv galten:

- (1) Patienten mit einer chronischen oder akuten Leukämie
- (2) Patienten mit einer immunsuppressiven Therapie

- (3) Patienten mit einem Tumorleiden, wegen einer möglichen Beeinflussung der Einzelparameter des Sepsis-Score durch die Grunderkrankung
- (4) Patienten mit einer Grunderkrankung, die die mittels Rechtsherzkatheter ermittelten hämodynamischen Parameter beeinflusst, wie z.B. eine Lungenarterienembolie oder ein kardiogener Schock
- (5) Patienten mit einer nicht septischen Grunderkrankung, die eine Katecholamintherapie erforderlich macht, wie z.B. eine dekompensierte Herzinsuffizienz.

Als Goldstandard zur Beurteilung einer septischen Kreislagsituation wurde die HZV-Katheteruntersuchung gewählt, weil sie die im septischen Schock auftretende ausgeprägte septische Hypotension anzeigt und sich die veränderten hämodynamischen Parameter direkt messen lassen. Die Phase des arteriellen Blutdruckabfalls ist durch ein erhöhtes Herzzeitvolumen bei erniedrigtem systemischen Gefäßwiderstand (SVR) gekennzeichnet. Von den hämodynamischen Parametern im septischen Schock hat der SVR die größte Bedeutung für eine prognostische Aussage des Krankheitsverlaufes ⁷¹. Katecholamine werden in dieser Krankheitsphase zur Erhöhung des arteriellen Drucks in hohen Dosen eingesetzt.

Tabelle 2: Bewertung der Einzelparameter des neu validierten Sepsis-Score

Score-Punkte	Atem-Frequenz [min ⁻¹]	Herz-Frequenz [min ⁻¹]	Körper-Temperatur [°C]	C-reaktives Protein [mg/dL]	Laktat [mmol/L]	Leukozyten [10 ⁹ /L]	Thrombozyten [10 ⁹ /L]
0	0-24	0-109	36,0-37,4	0- 5,0	0-2,0	2,5-12,0	150-450
1	25-34	110-139	37,5-38,4	5,1-12,0	2,1-4,3	12,0-30,0	100-149
2	35-50	150-180	38,5-39,0	12,1-18,0	4,4-8,8	>30,0	20-99
3	>50	>180	>39,0 <36,0	>18,0	>8,8	<2,5	<20

Die Diagnose des septischen Schocks wurde entsprechend der Bewertung der Sepsis nach hämodynamischen Parametern bei den Patienten gestellt, wenn der SVR weniger als 900 dyn · s · cm⁻⁵ betrug oder wenn der SVR mehr als 900 dyn · s · cm⁻⁵ betrug, die Patienten aber eine Katecholaminzufuhr von mindestens 15 mg/h Dopamin oder von Norfenefrin in jeder Dosierung benötigten ^{31,66,71,78}.

Der Sepsis-Score wurde aus sieben Einzelparametern gebildet: Aus drei klinischen Parametern: (1) Atemfrequenz, (2) Herzfrequenz und (3) Körpertemperatur und aus vier Laborwerten: (4) C-reaktives-Protein, (5) Laktat, (6) Leukozyten und (7) Thrombozyten. Jeder Einzelparameter wurde entsprechend seiner Klassifizierung mit Punktwerten von 1 bis 3 Punkten bewertet (**Tabelle 2**).

Die Punktwerte der Einzelparameter wurden zu dem Gesamtscore addiert, der eine Höchstpunktzahl von 21 Punkten erreichen konnte.

Die Erhebung der Einzelparameter erfolgte täglich an jedem Patienten des Kollektivs zur jeweils gleichen Uhrzeit um 6.00 Uhr, um eine tageszeitliche Schwankung der Parameter zu vermeiden. Bei offensichtlicher Beeinflussung der Einzelparameter durch therapeutische Eingriffe wurden die entsprechenden Einzelparameter mit der maximalen Punktzahl bewertet: (1) höchste Punktzahl für den Einzelparameter Körpertemperatur bei mechanischer Kühlung, bei Anwendung von Antipyretika und bei Einsatz einer CVVH ohne Wärmespule; (2) höchste Punktzahl für den Einzelparameter Atemfrequenz bei künstlicher Beatmung. Für die anderen fünf Einzelparameter ergab sich keine Korrekturindikation.

2.4. Mathematisch-statistische Methoden

Alle Daten sind als Mittelwerte ($\bar{x}$) $\pm$ Standardfehler (SEM) angegeben. Die Signifikanzprüfungen erfolgten mittels Student-t-Test für unabhängige Stichproben, wobei eine Signifikanz bei einem $p < 0,05$ angenommen wurde. Mittels Shapiro Wilk's konnte eine Normalverteilung des Patientenkollektivs bezüglich der hämodynamischen Parameter und der Einzelparameter des Sepsis-Score gesichert werden. Die Sensitivität, Spezifität, der positive und der negative Vorhersagewert des Score zur Sicherung der Diagnose septischer Schock im Vergleich zu den hämodynamischen Parametern (SVR) der Rechtsherzkatheteruntersuchung wurde anhand des Vierfelder- χ^2 -Tests mit einem $p < 0,05$ bestimmt.

Zur Überprüfung der prognostischen Wertigkeit des Scoresystems wurde folgendes statistisches Modell gewählt. Der Score des Patienten (y) und der weitere zeitliche Verlauf des Score (x) konnten bei jedem einzelnen Patienten durch das lineare Regressionsmodell mit der Formel: $Y = b \cdot x + a$ beschrieben werden. Der Eingangsscore wird dabei durch den Abstand (a) des Schnittpunktes der Geraden mit der Y-Achse vom Ursprung und der zeitliche Scoreverlauf durch den Steigungskoeffizienten (b) bestimmt, d.h. der Änderung des Score [Punkte] pro Zeitverlauf [Tage]. Mit dieser mathematischen Beschreibung des Krankheitsverlaufes durch die beiden Variablen Eingangsscore und zeitlicher Scoreverlauf konnte mittels des logistischen Regressionsmodells vergleichend zum realen Ausgang des Krankheitsverlaufes des Patienten mit einem Vertrauensintervall von 95% eine Prognose über die Überlebenswahrscheinlichkeit anhand des Score getroffen werden.

Die Sensitivität, Spezifität, der positive und der negative Vorhersagewert des NOx -Wertes zur Bestätigung der Diagnose septischer Schock wurde anhand des χ^2 -Tests bestimmt. Eine

multivariate lineare Regressionsanalyse wurde durchgeführt, um den Einfluß von Ernährungsmodus, Kreatininwert, Geschlecht, Alter und Körpergewicht auf den NOx-Spiegel zu untersuchen. Die relativen Veränderungen der Variablen NOx und des Sepsisscore wurden gegeneinander mit Hilfe einer univariaten linearen Regressionsanalyse bewertet. Der individuelle Verlauf des Sepsis-Score und des NOx-Wertes der Patienten während des Untersuchungszeitraumes wurden durch ANOVA für wiederholte Messungen beurteilt. Die Mortalität errechnete sich aus dem Verhältnis der verstorbenen Patienten zu der Gesamtzahl der Patienten innerhalb des jeweiligen Scorepunktbereiches und des jeweiligen NOx -Bereiches. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software SPSS für Windows (Statistical Package for Analysis and Social Sciences, Version 6.1.; SPSS-Inc., Chicago, ILL, USA). Die statistischen Methoden wurden vom Institut für Statistik und Informatik, Biomathematik und Epidemiologie der Heinrich-Heine-Universität überprüft. Die nach dem Modell der linearen Regression erstellten Korrelationen wurden mit dem Graphikprogramm Origin 4.0 (scientific and technical grafics in windows, Microsoft, USA) berechnet.

3. Ergebnisse

3.1. Evaluierung der analytischen Methoden

3.1.1. Ultraviolett-Photometrie nach Griess zur Bestimmung der Gesamtstickoxide

Die Linearität für die Messung der Gesamtstickoxide (Summe aus Nitrit und Nitrat) in wässrigen Lösungen für den interessierenden Bereich von 1-300 $\mu\text{mol/L}$ ist in **Abbildung 6** dokumentiert. Die für jeden Meßtag bestimmten Nitratreihen wurden für die Griessreaktion in gleicher Weise wie die ultrafiltrierten Plasmaproben mittels Nitratreduktase behandelt, so daß sich der Linearitätsnachweis auf das zu Nitrit reduzierte Nitrat bezieht. Nitrit selbst konnte mit der Methode nicht gemessen werden, da die Konzentration von Nitrit in humanem Plasmaproben unter der Nachweisgrenze der Methode liegt. Die Sensitivität dieser photometrischen Meßmethode beträgt 1 $\mu\text{mol/L}$, berücksichtigt man die Verdünnung durch die Reagenzien beträgt sie für wässrige Standardproben 2,5 $\mu\text{mol/L}$ und für Plasmaproben 5

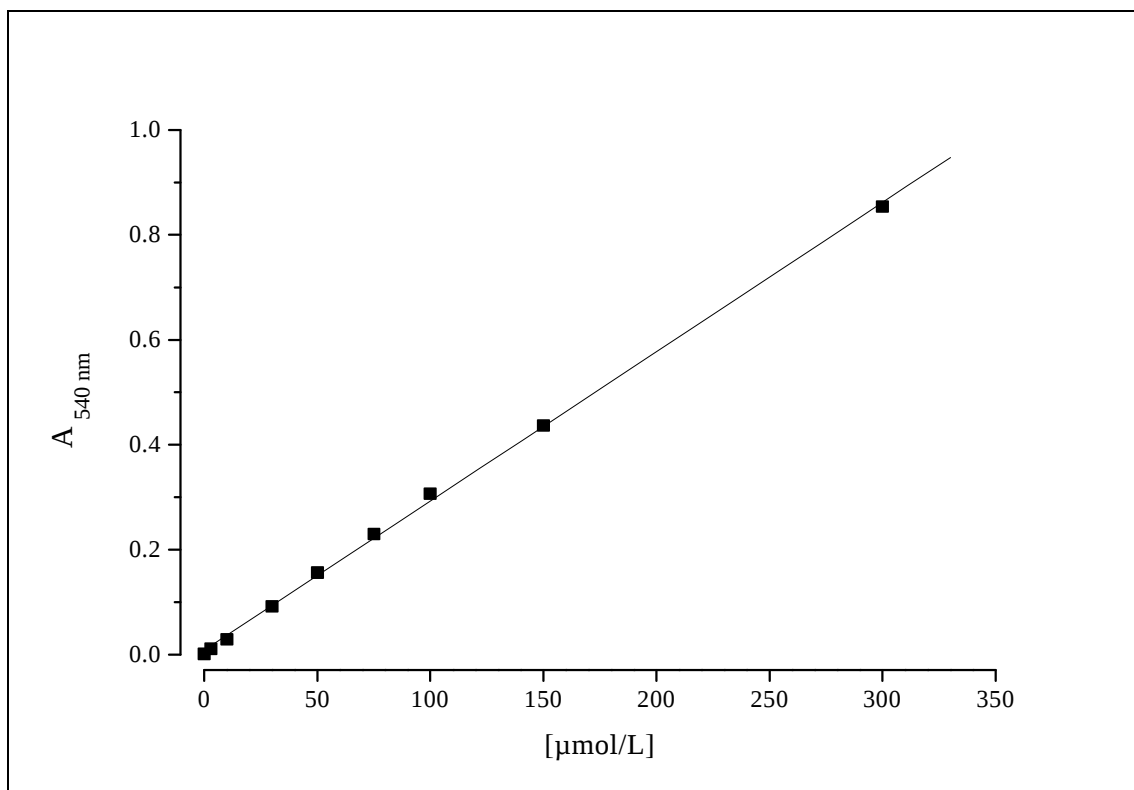


Abbildung 6: Photometrische Bestimmung von Nitrit

Die Graphik zeigt die Absorption bei 540 nm als Funktion der Nitritkonzentration einer wässrigen Eichreihe. Die Lineare Regression ergibt eine Regressionsgerade für den Konzentrationsbereich 1-300 $\mu\text{mol/L}$: $a = 0,0063$, $b = 0,0275$ und $r = 0,99$.

$\mu\text{mol/L}$. Der Variationskoeffizient für die wiederholte Messung wässriger Standards und Plasmaproben (bezogen auf die enzymatische Aufarbeitung von Nitrit und Nitrat plus die anschließende Vermessung) lag bei 2,1 bzw. 6,2%. Für wiederholte Bestimmungen der Wiederfindungsraten in humanem Plasma lag der Variationskoeffizient zwischen 1,6 und 3,7%. Die Tag-zu-Tag-Variabilität eines $100 \mu\text{M}$ wässrigen Standards ließ sich mit 4,8% ($n = 5$) bestimmen.

3.1.2. Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Für die Aminosäuren L-Arginin und L-Citrullin konnte die Linearität der HPLC-Analyse für die Konzentrationsbereiche 3-300 $\mu\text{mol/L}$ bzw. 1-300 $\mu\text{mol/L}$ nachgewiesen werden. Die Linearität zwischen Detektorsignal und Konzentration von L-Hydroxyarginin ist für eine wässrige Eichreihe im Bereich von 0,5 – 30 $\mu\text{mol/L}$ in **Abbildung 7** dargestellt.

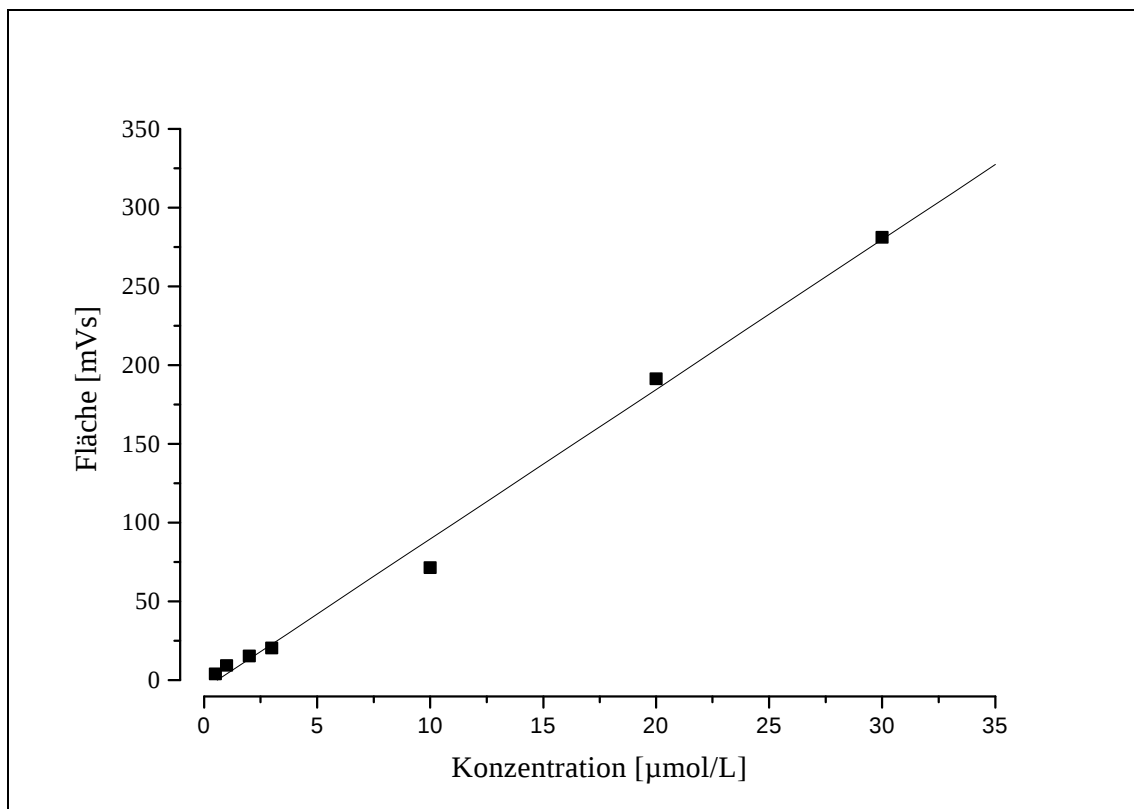


Abbildung 7: HPLC-Bestimmung von L-Hydroxyarginin einer wässrigen Eichreihe.

Dargestellt ist die Fläche unter der Kurve des Detektorsignals als Funktion der Konzentration von L-Hydroxyarginin. Durch lineare Regression ließ sich zum Nachweis der Linearität und der Sensitivität eine Eichgerade für den Meßbereich 0,5 – 30 $\mu\text{mol/L}$ erstellen. Die Eichgerade wurde durch die Funktion $y = a + b \cdot x$ beschrieben, mit $a = -5612,5$ (Ordinatenabschnitt), $b = 9514,7$ (Geradensteigung) und $r = 0.99$ (Korrelationskoeffizient). Mit der Meßmethode konnten somit die im Patientenplasma auftretenden Konzentrationen bestimmt werden.

Für alle drei Aminosäuren ergaben sich Korrelationskoeffizienten von $r \geq 0,99$ bezüglich der Linearität der Analyse. Die Sensitivität der Meßmethode betrug bei einem Signalrauschverhältnis von 3:1 für L-Hydroxyarginin 0,5 $\mu\text{mol/L}$, für L-Arginin und L-Citrullin 3 bzw. 1 $\mu\text{mol/L}$.

Die Berechnung der Tag-zu-Tag-Variabilität eines aliquotierten Aminosäurenstandards (Arginin und Citrullin je 100 mmol/L, Hydroxyarginin 10 mmol/L) ergab für die Konzentrationen folgende Werte: 5,5% für Arginin, 1,8% für Citrullin und 4,4% für Hydroxyarginin. Die Variabilität der Retentionszeiten dieser Standards lag zwischen 1,7 und 4,7%.

Humanes Plasma wurde zur Bestimmung der Wiederfindungsrate mit vorgegebenen Konzentrationen der drei Aminosäuren versetzt und anschließend analysiert (**Abbildung 8**). Dabei ließen sich Variationskoeffizienten für die Wiederfindung zwischen 0,9 und 4,6% ermitteln. Die dargestellten Analysemethoden (vgl. 2.1.1. und 2.1.2.) ermöglichten die Bestimmung der vier Parameter des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges L-Arginin, L-Citrullin, L-Hydroxyarginin und Gesamtstickoxide im humanen Plasma.

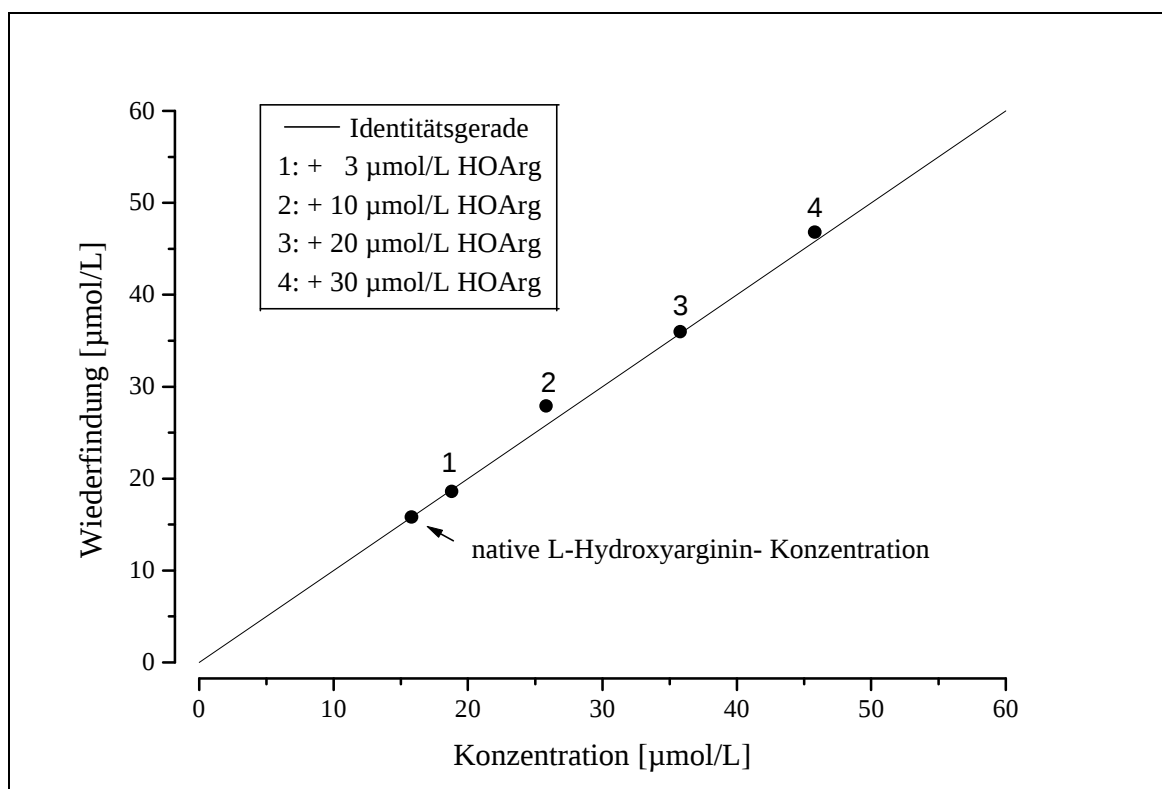


Abbildung 8: Wiederfindung von L-Hydroxyarginin im Plasma eines Patienten nach Zugabe wässriger Lösungen mit L-Hydroxyarginin (3, 10, 20, 30 $\mu\text{mol/L}$).

Zum Plasma eines Patienten im septischen Schock mit einem meßbaren L-Hydroxyargininanstieg wurden wässrige Gemische bekannter Konzentration an L-Hydroxyarginin zugegeben und in gleicher Weise aufgearbeitet wie alle anderen Plasmaproben. In der Abbildung ist zu erkennen, daß die zugegebenen Konzentrationen nahezu vollständig in der Plasmaprobe wiedergefunden wurden.

3.2. Validierung des Sepsis-Score

Das Rechtsherzkatheterkollektiv zur Validierung des Sepsis-Score umfaßte 20 Patienten. Aufgrund der Ergebnisse der HZV-Katheteruntersuchung wurden 15 Patienten mit insgesamt 105 Beobachtungstagen in das septische Patientenkollektiv eingeteilt und 7 Patienten mit 45 Untersuchungstagen in das nicht septische Patientenkollektiv.

Tabelle 3: Übersicht über das Patientenkollektiv mit Alter, Geschlecht und Diagnose. * Patienten, die im Verlauf vom septischen in den nicht septischen Kreislaufzustand wechselten.

Patient	Kreislaufsituation	Alter [Jahre]	Geschlecht [m/w]	Diagnose
1.	nicht septisch	75	m	Z.n. Aortenaneurysma-OP
2.	nicht septisch	73	m	koronare Herzerkrankung
3.	nicht septisch	79	m	koronare Herzerkrankung
4.	nicht septisch	36	m	Z.n. Beinahe-Ertrinken
5.	nicht septisch	60	m	Pneumonie
6.	nicht septisch/septisch*	55	w	Mediainsult
7.	nicht septisch/septisch*	39	m	koronare Herzerkrankung
8.	septisch	48	w	Pneumonie
9.	septisch	78	m	koronare Herzerkrankung
10.	septisch	57	w	Z.n. Lungenblutung
11.	septisch	43	m	koronare Herzerkrankung
12.	septisch	73	m	Uro-Sepsis
13.	septisch	77	m	Pneumonie
14.	septisch	57	w	Karzinoid
15.	septisch	52	w	Pneumonie
16.	septisch	62	m	Maligne Hypertonie
17.	septisch	64	w	Pneumonie
18.	septisch	42	w	Myasthenia gravis
19.	septisch	62	w	Malaria tropica
20.	septisch	36	w	Pneumonie

Bei 2 Patienten besserte sich während des Beobachtungszeitraums die Kreislaufsituation vom septischen zum nicht septischen Zustand, so daß diese beiden Patienten sowohl in die septische als auch in die nicht septische Patientengruppe aufgenommen wurden. Die Zusammenfassung des Patientenkollektivs hinsichtlich des Patientenalters, des Geschlechts und der Diagnose ist in **Tabelle 3** dargestellt.

Bezüglich der hämodynamischen Parameter unterschied sich das septische Patientenkollektiv im SVR mit $727 \pm 178 \text{ dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$ vs $1098 \pm 166 \text{ dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$ und in der Herzfrequenz mit $107 \pm$

9,8 min⁻¹ vs 87 ± 9,2 min⁻¹ signifikant (p<0,05) vom nicht septischen Patientenkollektiv. Die übrigen Parameter zeigten nur tendenzielle Unterschiede (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Übersicht über die hämodynamischen Parameter, 15 Patienten mit septischer Kreislauftsituation an 105 Beobachtungstagen und 7 Patienten ohne septische Kreislauftsituation an 45 Beobachtungstagen. * Bestimmung des systemischen vaskulären Widerstandes (SVR) unter begleitender, kreislaufunterstützender Katecholamintherapie. SV: Schlagvolumen, CO: cardiac output (Herzminutenvolumen), PVR: pulmonaler vaskulärer Gefäßwiderstand, RR: Blutdruck nach Riva-Rocci (systolisch und diastolisch). ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, Statistik: Student-t-Test).

Parameter	Patientenkollektiv		Statistik
	mit septische	ohne Kreislauftsituation	
Beobachtungstage [n]	105	45	
SVR [dyn · s · cm ⁻⁵]	727 ± 178 *	1098 ± 166	p <0,05
SV [mL/Schlag]	69 ± 16,2	60 ± 20,4	n.s.
CO [L/min]	7,7 ± 1,5	5,6 ± 1,8	n.s.
PVR [dyn · s · cm ⁻⁵]	117 ± 24,3	143 ± 25,4	n.s.
RR syst. [mmHg]	118 ± 17,3	125 ± 14,1	n.s.
RR diast. [mmHg]	60 ± 10	61 ± 9	n.s.
Herzfrequenz [min ⁻¹]	107 ± 10	87 ± 9	p <0,05
Scorepunkte	10,2 ± 1,0	2,8 ± 1,0	p <0,05

Tabelle 5: Übersicht über die Einzelparameter des Sepsis-Score, 15 Patienten mit septischer Kreislauftsituation an 105 Beobachtungstagen und 7 Patienten ohne septische Kreislauftsituation an 45 Beobachtungstagen. * Durch eine therapeutische Beeinflussung, wie z.B. künstliche Beatmung und antipyretische Therapie, war eine numerische Bewertung dieser Parameter nicht möglich. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, Statistik: Student-t-Test für unabhängige Stichproben):

Parameter	Patientenkollektiv		Statistik
	mit septische	ohne Kreislauftsituation	
Beobachtungstage [n]	105	45	
Herzfrequenz [min ⁻¹]	107,4 ± 9,8	86,8 ± 9,2	p <0,05
Atemfrequenz [min ⁻¹]	*	22,0 ± 3,0	/
Temp. [°C]	*	37,2 ± 0,3	/
CRP [mg/dL]	16,9 ± 4,8	8,5 ± 3,4	p <0,05
Laktat [mmol/L]	2,8 ± 1,1	1,6 ± 0,3	p <0,05
Leukozyten [10 ⁹ /mL]	13,3 ± 3,6	11,5 ± 1,9	n.s.
Thrombozyten [10 ⁹ /mL]	141,8 ± 54,5	333,4 ± 85,2	p <0,05
Scorepunkte	10,2 ± 1,0	2,8 ± 1,0	p <0,05

Der Sepsis-Score wurde anhand der Ergebnisse der hämodynamischen Messung mittels HZV-Katheter validiert (**Abbildung 9**). Er unterschied signifikant ($p < 0,0001$) zwischen septischer und nicht septischer Kreislauftsituation mit einer durchschnittlichen Punktzahl von $10,2 \pm 1,0$ bei dem septischen Kollektiv vs $2,8 \pm 1,0$ bei dem nicht septischen Kollektiv. Die Einzelparameter unterschieden ebenfalls außer den Zahlen für Leukozyten im Blut signifikant zwischen septischer und nicht septischer Kreislauftsituation (siehe **Tabelle 5**).

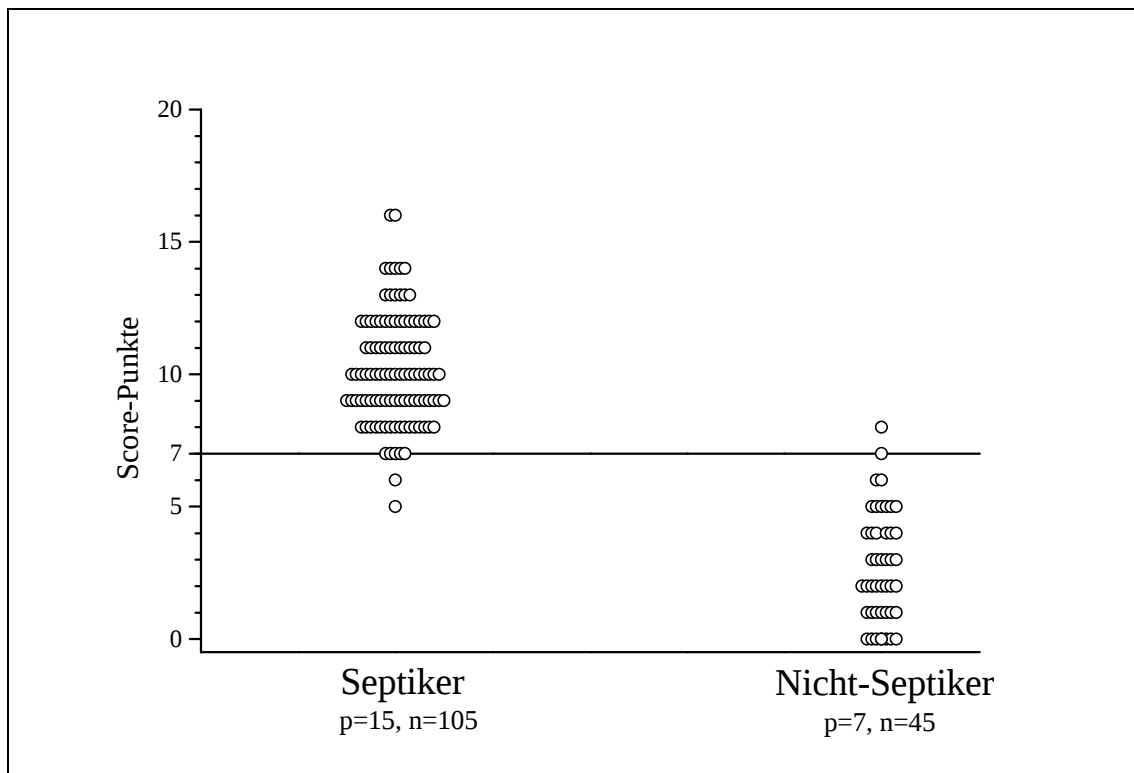


Abbildung 9: Validierung des Sepsis-Score

Anhand der hämodynamischen Parameter konnte das Rechtsherzkatheterkollektiv in Septiker und Nicht-Septiker unterteilt werden. In der Graphik sind die Beobachtungstage der Patienten in der septischen und in der nicht septischen Phase gegen die entsprechenden Score-Punkte aufgetragen (p = Patientenzahl, n = Anzahl der Beobachtungstage). Bei einer Punktzahl des Score von 7 Punkten zeigte sich die beste Auftrennung zwischen septischen und nicht septischen Patienten.

Bei getrennter Auftragung des septischen und des nicht septischen Patientenkollektivs gegen den Sepsis-Score, zeigte sich bei einer Score-Punktezahl von 7 Punkten die beste Auftrennung zwischen septischen und nicht septischen Patienten. Bei insgesamt 105 Beobachtungstagen des septischen Patientenkollektivs zeigte sich an nur 2 Beobachtungstagen ein Score von weniger als 7 Punkten, bei den insgesamt 45 Beobachtungstagen des nicht septischen Patientenkollektivs ergab sich an 2 Beobachtungstagen ein Score von 7 oder mehr Punkten (vgl. Abbildung 10). Die

bei einem Trennwert von 7 Scorepunkten erreichte Sensitivität und Spezifität bezüglich der Diagnosesicherung einer Sepsis mittels Sepsis-Score betrug 98% bzw. 96%. Im Vergleich zeigte die Diagnosesicherung mittels der Bone-Kriterien ⁶ eine Sensitivität von 78% und eine Spezifität von 95% (**Abbildung 10**). Als Goldstandard für die Diagnose Sepsis liegt diesem Vergleich wiederum der SVR zugrunde. Zur Diagnosesicherung einer Sepsis nach Bone müssen alle vier Hauptkriterien: (1) Erregernachweis, (2) Hyper- oder Hypothermie, (3) Tachykardie, (4) Tachypnoe und mindestens eines der vier Nebenkriterien: (1) Veränderung des mentalen Zustandes, (2) Hypoxämie, (3) erhöhter Plasmalaktatspiegel oder (4) Oligurie erfüllt sein.

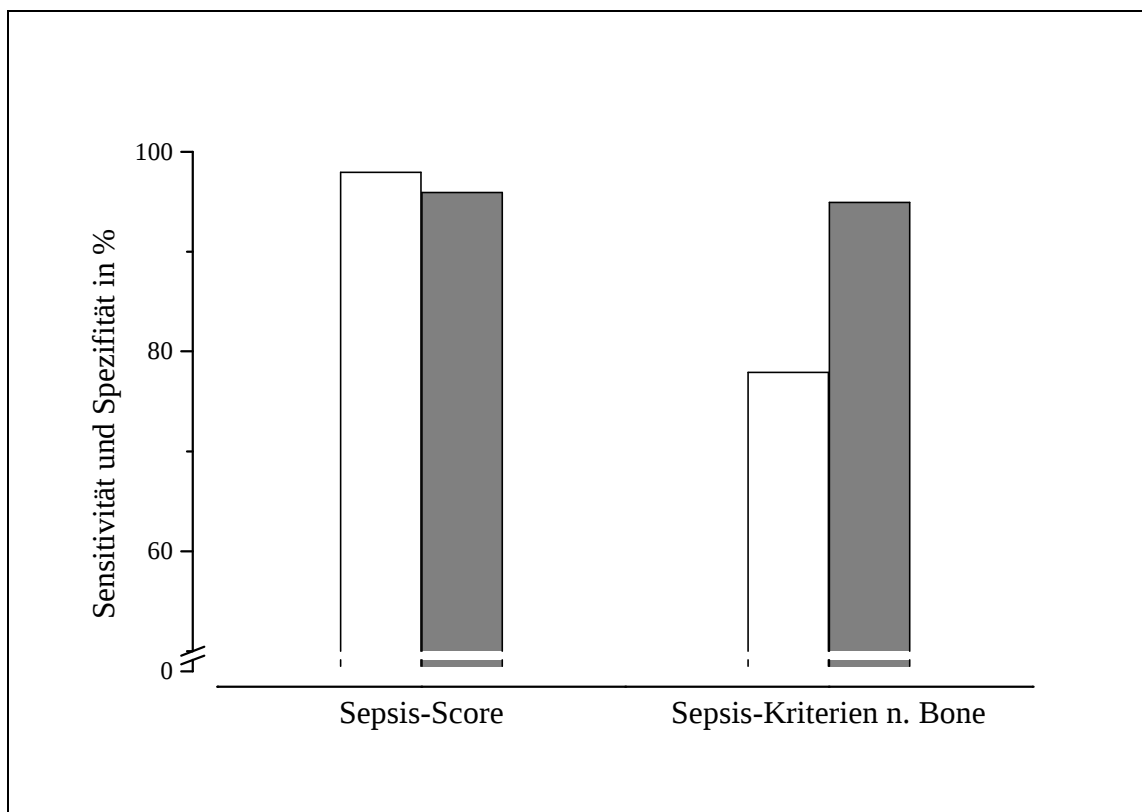


Abbildung 10: Vergleich der Sensitivität und Spezifität des Sepsis-Score und der Sepsiskriterien nach Bone bezüglich der Diagnosesicherung einer Sepsis (weiß = Sensitivität, grau = Spezifität).

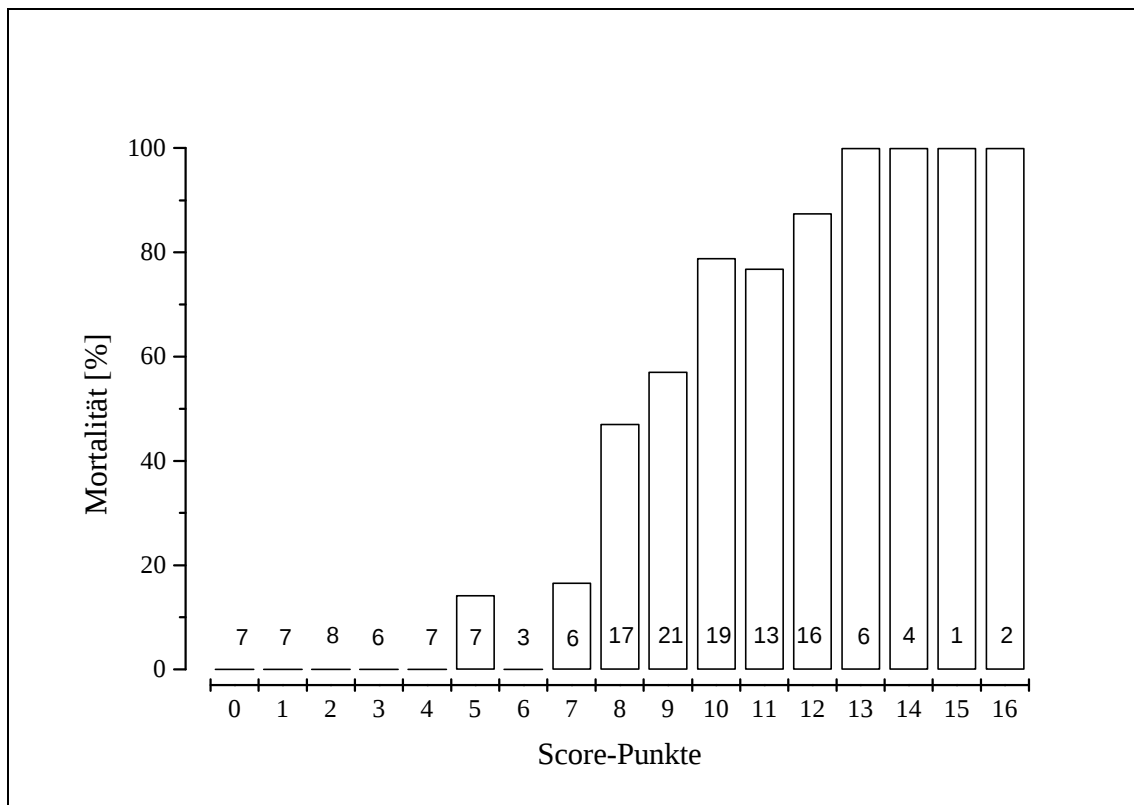


Abbildung 11: Angegeben ist die Anzahl der Beobachtungstage mit den auf der X-Achse aufgetragenen Score-Punkten. Der prozentuale Anteil der Beobachtungstage, der den letztlich verstorbenen Patienten zuzurechnen ist, ist gegen die Y-Achse aufgetragen. Es zeigt sich, daß die Mortalität in dem Intervall der Scorepunktezahl von 7 bis 16 stark ansteigt.

Bei deskriptiver Darstellung der einzelnen Scorepunkte mit ihrem jeweiligen Anteil an Patienten, die in der Folge verstarben, zeigte sich mit der Zunahme der Scorepunktezahl eine Zunahme der Sterblichkeit (**Abbildung 11**). Von den insgesamt 20 Patienten verstarben 11 Patienten. Von den Patienten, die während des Untersuchungszeitraumes einen Sepsis-Score von 0-4 Punkten hatten, verstarb kein Patient; alle Patienten mit einem Sepsis-Score größer oder gleich 13 Punkten verstarben. Eine Berechnung der Prognose des Patienten anhand des Scoreverlaufes mittels des logistischen Regressionsmodells zeigte im Vergleich zum realen Ergebnis eine Übereinstimmung von 91%. Die Spezifität betrug 82%, die Sensitivität 100%, der positive Vorhersagewert 85% und der negative Vorhersagewert 100%. Der Sepsis-Score zeigte eine signifikante, lineare und inverse Korrelation zum systemischen vaskulären Widerstand (SVR) entsprechend der Formel: $Y = (-0,01343) \times X + 18,6$ mit einem Regressionskoeffizienten von $r = -0,85$ und einer Standardabweichung von 2,12 bei einem $p < 0,0001$ (**Abbildung 12**).

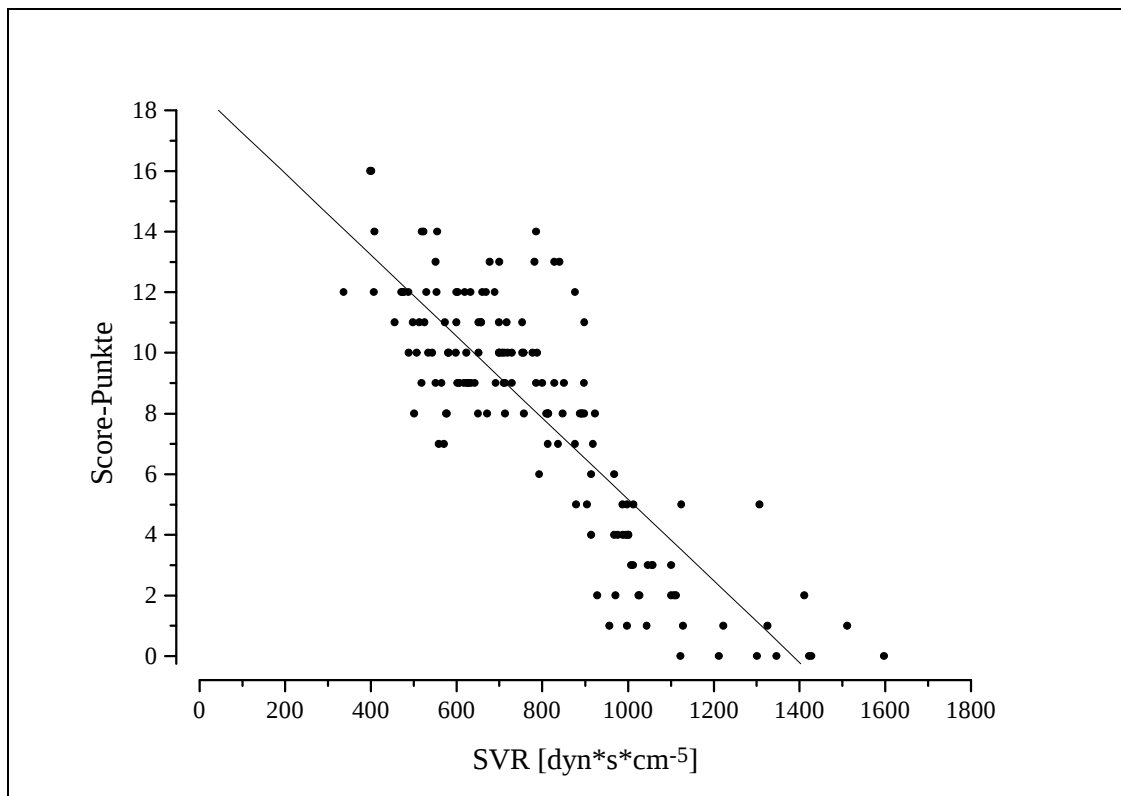


Abbildung 12: Korrelation zwischen dem systemischen vaskulären Widerstand (SVR) und dem Sepsis-Score

Die Graphik zeigt den inversen Zusammenhang zwischen der Höhe des SVR und des Sepsis-Score mit einer Regressionsanalyse von: $r = -0,85$, $p = 20$ und $n = 150$. r = Regressionskoeffizient, p = Anzahl der Patienten, n = Anzahl der Beobachtungstage.

Der entwickelte Sepsis-Score ermöglichte die Einteilung der Patienten nach dem Schweregrad der septischen Kreislauflage, die für die im folgenden dargestellten Untersuchungen der Veränderungen der Parameter des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges im septischen Schock notwendig war.

3.3. Konzentrationen der Gesamtstickoxide (NO_x)

Das Studienkollektiv für die Analyse von NO_x umfaßte 237 Patienten an insgesamt 1999 Beobachtungstagen. Die statistische Auswertung dieses Kollektives ergab folgende Daten: Die Geschlechtsverteilung bezüglich der Beobachtungstage war nahezu ausgeglichen (männlich : weiblich = 51% : 49%). Alter und Körpergewicht waren normalverteilt, von den 1999 Beobachtungstagen entfielen 1143 Tage auf Patienten mit parenteraler und 856 Tage auf Patienten

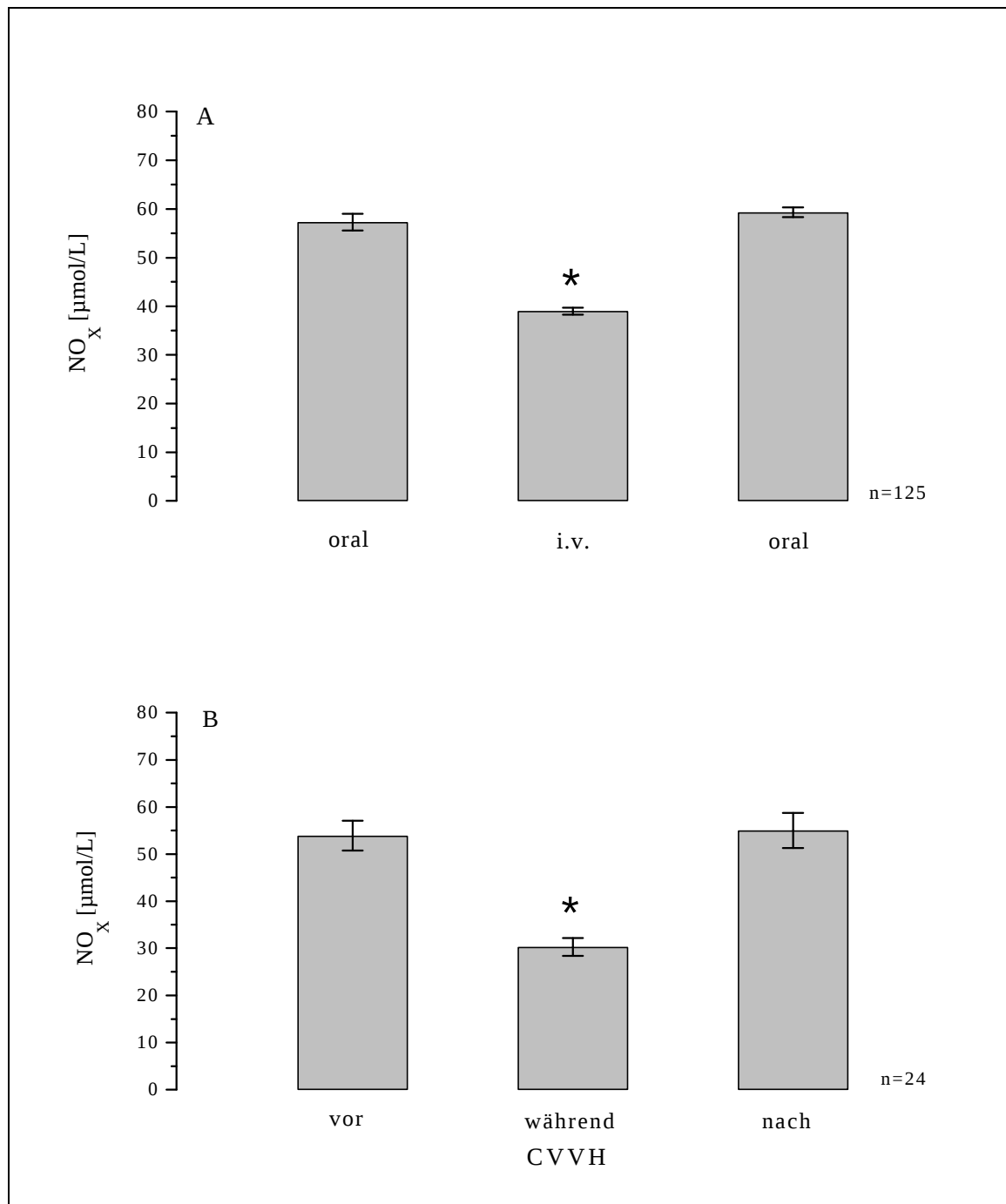


Abbildung 13: Beeinflussung der Konzentration von NO_x.

Die Veränderung der Konzentrationen bei dem Wechsel der Ernährungsform von enteraler (oral) nach parenteraler (i.v.) Nahrungszufuhr und umgekehrt sind zusammengefaßt in A dargestellt. Bei parenteraler Ernährung zeigt sich ein signifikant (*) niedrigerer NO_x-Wert als bei oraler Nahrungszufuhr. B veranschaulicht in ähnlicher Weise den Zusammenhang zwischen Nierenersatzverfahren (CVVH) und NO_x-Konzentration. Nach dem Beginn einer CVVH fällt die NO_x-Konzentration und nach Beendigung der CVVH steigt sie wieder an. Bei beiden Untersuchungen galt ein konstanter Scorepunktwert als Voraussetzung für den Vergleich. Die Differenz der Mittelwerte erreicht das Signifikanzniveau $p < 0,05$ (*). (n=Anzahl der Beobachtungstage, $\bar{x} \pm \text{SEM}$).

mit oraler Ernährung. Die Serum-Kreatininwerte stiegen mit zunehmendem Alter der Patienten an. Der Mittelwert der Konzentration von NOx im Plasma betrug für das Gesamtkollektiv $47,1 \pm 1,4$ $\mu\text{mol/L}$. Eine multivariate Analyse zeigte eine signifikante Beeinflussung der NOx-Spiegel durch den Sepsis-Score, den Serum-Kreatininwert und die Ernährungsform. Der Einsatz einer Nierenersatztherapie (CVVH) beeinflusste ebenfalls signifikant die Konzentration von NOx. Im Gegensatz dazu konnte eine signifikante Beeinflussung durch das Geschlecht, das Körpergewicht und das Alter ausgeschlossen werden.

Abbildung 13 veranschaulicht den Einfluß der Ernährungsform und den Einfluß der Nierenersatztherapie CVVH auf die Plasmakonzentration von NOx. Der NOx-Wert fiel signifikant um 37% bei dem Wechsel von oraler zu kontinuierlicher parenteraler Ernährung unter der Voraussetzung eines konstanten Sepsis-Scorepunktwertes ab. Im Gesamtkollektiv zeigten Patienten mit kontinuierlicher parenteraler Ernährung einen signifikant niedrigeren NOx-Wert als oral ernährte Patienten: $34 \pm 1,2$ (n=1143) versus $54 \pm 3,5$ $\mu\text{mol/L}$ (n=856). Bei einigen Patienten

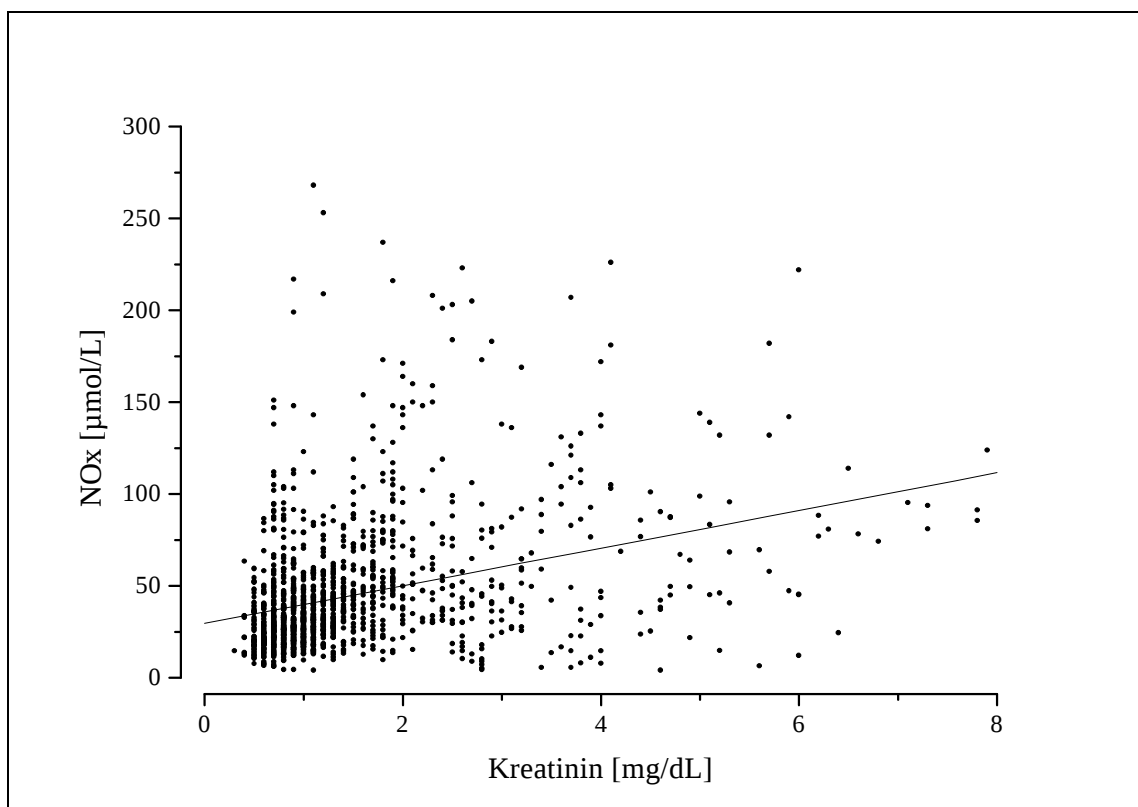


Abbildung 14: Korrelation zwischen den Gesamtstickoxiden und dem Serum-Kreatinin.

Dargestellt ist die plasmatische Konzentration an Gesamtstickoxiden als Funktion des Serum-Kreatinin im Gesamtkollektiv. Es besteht eine positive Beziehung zwischen diesen beiden Parametern (n= 1443, $a=29,76$, $b=10,24$, $r=0,367$ und $p<0,0001$). Bei einem Kreatininwert $\leq 1,4$ mg/dL ist diese Beziehung nicht mehr nachweisbar.

wurde über die Dauer mehrerer Tage eine CVVH durchgeführt. In diesem Zeitintervall fiel NOx unter der Voraussetzung eines konstanten Sepsis-Scorepunktwertes von $53,9 \pm 3,2$ auf $30,3 \pm 1,9$ $\mu\text{mol/L}$ ab und stieg nach Beendigung der CVVH wieder auf $55,0 \pm 3,7$ $\mu\text{mol/L}$ an ($p < 0,05$).

Als Maß für die Eliminationsleistung der Nieren gilt das Serum-Kreatinin. Mit steigendem Serum-Kreatinin, d.h. nachlassender Ausscheidungsfunktion der Niere, steigt der NOx-Spiegel an (**Abbildung 14**). Bei einem Serum-Kreatinin von $\leq 1,4$ mg/dL zeigte sich keine Einflußnahme auf die NOx-Konzentration im Plasma.

Für die Beurteilung des Zusammenhanges zwischen septischem Schock und Gesamtstickoxidkonzentration im Plasma als Marker des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges mußten im folgenden die aufgezeigten Einflußfaktoren auf den NOx-Spiegel ausgeschlossen werden. In die letztendliche Analyse wurden nur diejenigen Patienten aufgenommen, die über den gesamten Beobachtungszeitraum ausschließlich parenteral ernährt wurden und ein Serum-Kreatinin $\leq 1,4$ mg/dL aufwiesen. Es ergab sich ein Subkollektiv von 139 Patienten mit insgesamt 882 Beobachtungstagen (n). Von diesen 139 Patienten konnte bei 63 Patienten die Diagnose septischer Schock an allen oder an einem Teil der Beobachtungstage (insgesamt $n=329$) mit Hilfe des Sepsis-Score gestellt werden. Bei 76 Patienten konnte die Diagnose septischer Schock ausgeschlossen werden ($n=553$: enthalten sind die Beobachtungstage der septischen Patienten vor bzw. nach dem septischen Schock); sie wurden deshalb bei der Analyse als Kontrolle definiert. Die wesentlichen Charakteristika und die NOx-Konzentrationen dieses Subkollektivs sind in **Tabelle 6** aufgeführt:

Tabelle 6: Aufgeführt sind die wesentlichen Eigenschaften des um die Einflußgrößen bereinigten und 139 Patienten umfassenden Subkollektivs zur Beurteilung der Gesamtstickoxide (NOx) im septischen Schock. *: Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Konzentration an NOx im Plasma der Patienten im septischen Schock gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$). (n = Anzahl der Beobachtungstage, m = männlich, w = weiblich)

139 Patienten	Alter [a]	Körpergewicht [kg]	Geschlecht		S-Kreatinin [mg/dL]	Gesamtstickoxide (NOx) [mg/dL]	
			m	w		Septischer Schock	Kontrolle
	$59 \pm 0,5$	$73,4 \pm 0,8$	76	63	$0,9 \pm 0,01$	$45,6 \pm 6,3 *$	$34,0 \pm 1,1 *$
n = 882						n = 329	n = 553

Die Anzahl der Beobachtungstage pro Patient unterschied sich nicht signifikant beim Vergleich der Patienten im septischen Schock mit der Kontrollgruppe ($5,2 \pm 0,3$ versus $4,6 \pm 0,3$ Tage pro Patient). Die Gesamtstickoxide waren im Plasma der Patienten mit septischen Schock signifikant

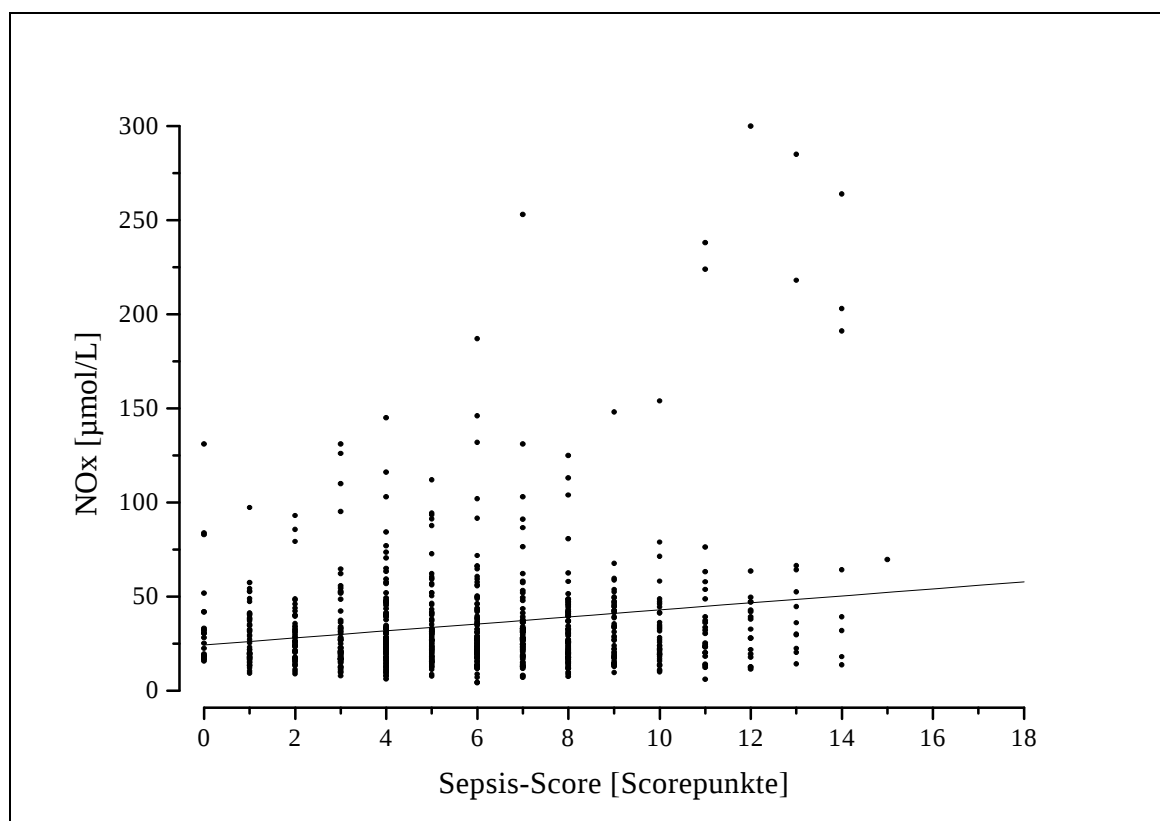


Abbildung 15: Korrelation zwischen den Gesamtstickoxiden und dem Sepsis-Score des Subkollektivs.

Dargestellt ist die plasmatische Konzentration an Gesamtstickoxiden (NOx) als Funktion der Scorepunktwerte des Sepsis-Score bei 139 Patienten, die zum Ausschluß einer Beeinflussung der NOx-Konzentration einen S-Kreatininwert $\leq 1,4$ mg/dL aufwiesen und über den gesamten Beobachtungszeitraum parenteral ernährt wurden ($r=0,18$, $p<0,001$, $n=882$).

höher als bei der Kontrollgruppe: $45,6 \pm 6,3$ versus $34,0 \pm 1,1$ µmol/L. Diese Werte sind mit den Ergebnissen ähnlicher Studien vergleichbar^{34,63}. Zusätzlich stieg die Konzentration an NOx bei diesen Patienten mit steigendem Sepsis-Scorepunktwert signifikant an. Bei den höchsten bestimmten Score-Punktwerten (14 Punkte) betrug der Mittelwert der NOx-Konzentration nahezu das Dreifache des Mittelwertes der Kontrollgruppe (98 ± 23 µmol/l). Wie in **Abbildung 15** dargestellt, korreliert die Konzentration der Gesamtstickoxide dennoch kaum mit dem Punktwert des Sepsis-Score. Somit ist die diagnostische Wertigkeit einer einzelnen Messung der Gesamtstickoxide im Plasma zur Diagnosesicherung des septischen Schocks äußerst gering. Setzt man die NOx-Konzentration im Plasma als Diagnoseparameter zur Sicherung der Diagnose septischer Schock ein, ergeben sich bei einem cut-off von 35 µmol/L die folgenden Werte für die Gütekriterien des Testverfahrens: Sensitivität 52%, Spezifität 63%, positiver Vorhersagewert 48% und negativer Vorhersagewert 66% ($n=882$).

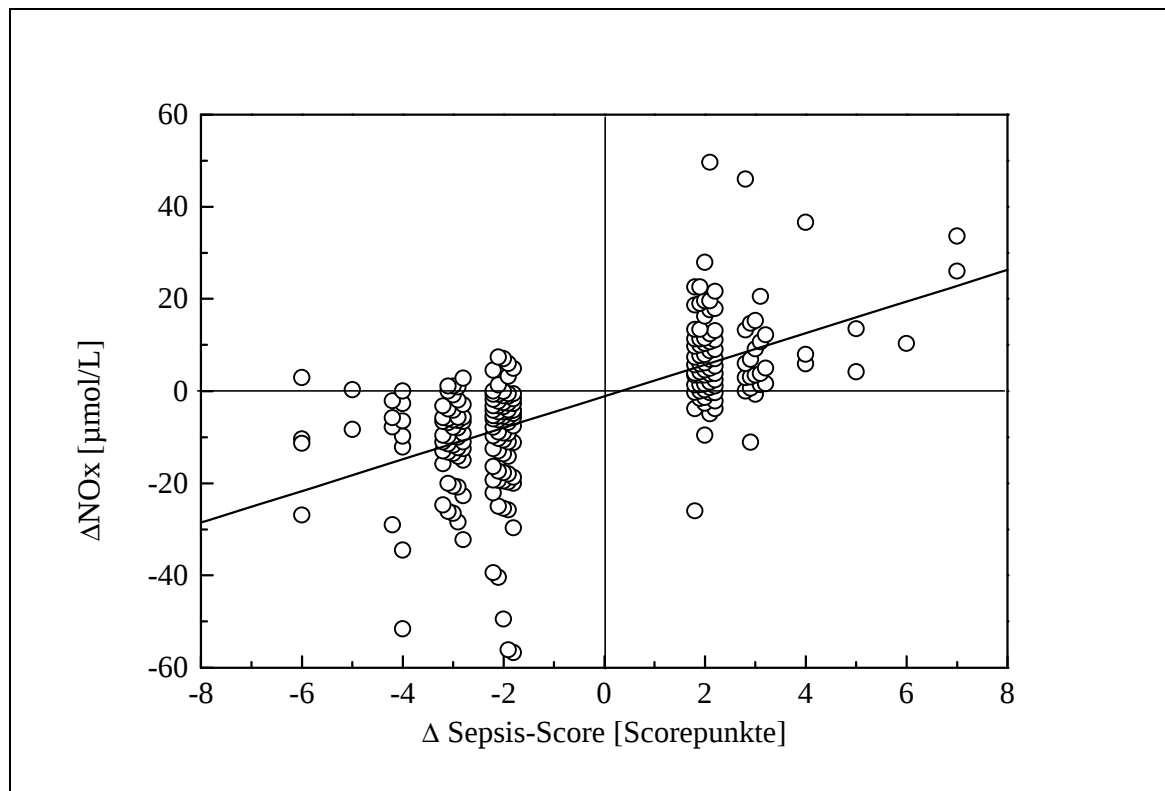


Abbildung 16: Intraindividuelle Korrelation zwischen der Änderung der Gesamtnitricoxide und der Änderung der Schwere des septischen Schocks.

Dargestellt ist die Änderung der plasmatischen Konzentration der Gesamtnitricoxide (ΔNOx) als Funktion der begleitenden Änderung des Scorepunktwertes ($\Delta \text{Sepsis-Score}$), die als Tag-zu-Tag Zunahme oder Abnahme der Scorepunktezahl um ≥ 2 Punkte definiert wurde ($r = 0,63$, $n=218$, $p < 0,0001$). Es zeigt sich eine intraindividuelle Korrelation zwischen der Änderung der Gesamtnitricoxide im Plasma und der Änderung der Schwere des septischen Schocks mit einer Sensitivität und einer Spezifität für die Änderung von NOx als Diagnoseparameter von 85% bzw. 89%.

Die Betrachtung der intraindividuellen Verläufe der plasmatischen Konzentrationen von NOx ausgedrückt als Tag-zu-Tag Änderung zeigte dagegen eine direkte Beziehung zur Änderung der Schwere des septischen Schocks, beschrieben als begleitende Scorepunkteänderung von ≥ 2 Punkten ($r=0,63$, $p<0,0001$, $n=218$). Ein Anstieg oder Abfall des Sepsis-Score um 2 oder mehr Punkte ging mit einer gleichgerichteten Veränderung von NOx im Plasma einher. Die Sensitivität, die Spezifität, der positive und der negative Vorhersagewert der Änderung von NOx als Testparameter für die genaue Anzeige der Änderung des Sepsis-Score wurden mit 85%, 89%, 85% bzw. 89% bestimmt (siehe **Abbildung 16**). Die Hypothese, daß die Änderung der NOx-Konzentration eine Änderung der septischen Kreislauftsituation anzeigen kann, wird durch die Betrachtung der individuellen zeitlichen Verläufe dieser beiden Parameter unterstützt. In **Abbildung 17** sind die Verläufe zweier Patienten mit septischen Schock dargestellt, der erste Patient verstarb, der zweite Patient überlebte den septischen Schock. Der Anstieg und der Abfall der NOx-Konzentration verlaufen nahezu parallel zur Zu- bzw. Abnahme des septischen Schocks.

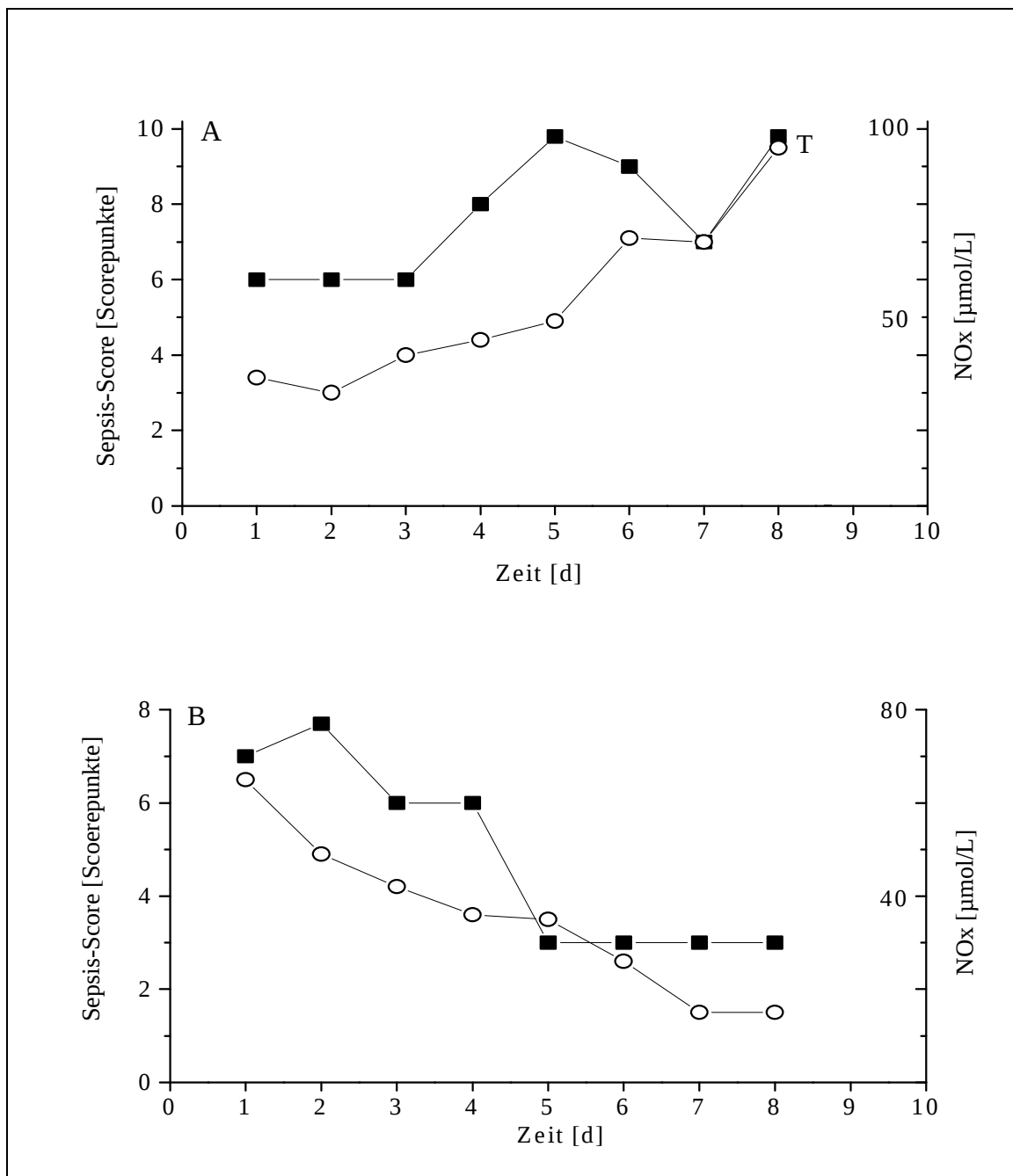


Abbildung 17: Repräsentative zeitliche Verläufe der Gesamtstickoxide und des septischen Schocks.

Dargestellt sind die plasmatische Konzentration der Gesamtstickoxide (NOx) und die Schwere des septischen Schocks im individuellen zeitlichen Verlauf bei zwei Patienten mit der Diagnose Pneumonie. (O) kennzeichnet den Verlauf der NOx-Konzentration und (v) den Verlauf der Scorepunkte des Sepsis-Score. Beide Patienten wurden parenteral ernährt, das S-Kreatinin betrug an allen Beobachtungstagen weniger als 1,3 mg/dL. A: 79 jähriger Patient (82 kg, 168 cm) mit Pneumonie, der im septischen Schock verstarb. B: 65 jähriger Patient (78 kg, 171 cm) mit Pneumonie, der sich vom septischen Schock wieder erholte. Deutlich wird der annähernd parallele Anstieg bzw. Abfall der NOx-Konzentration zum Verlauf des septischen Schocks. T markiert den Todestag von Patient A.

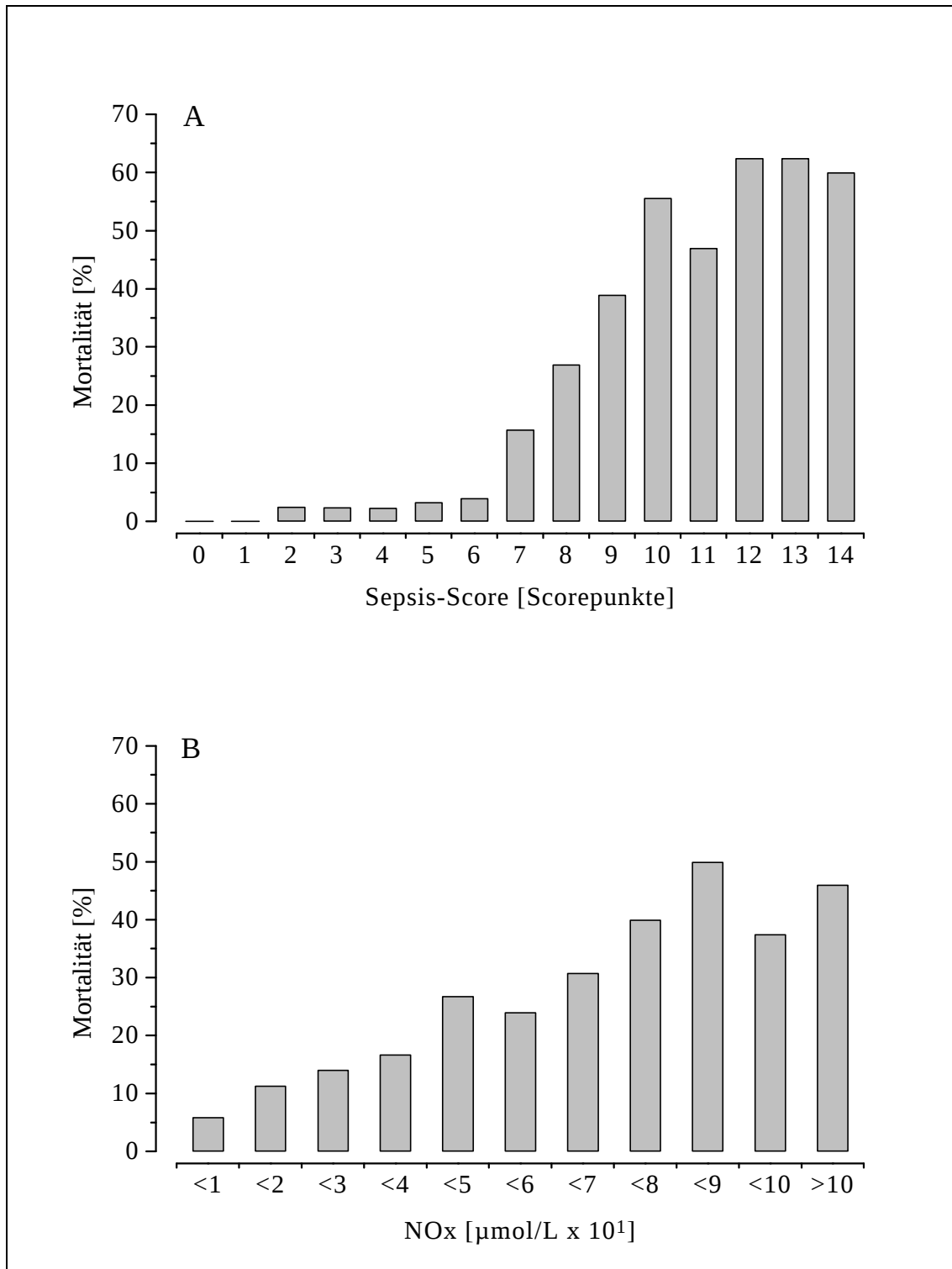


Abbildung 18: Beziehung zwischen Mortalität und Sepsis-Scorepunktwert (A) bzw. Konzentration der Gesamtstickoxide (B).

Zur Berechnung der Mortalität wurde bei den Patienten mit septischem Schock die Anzahl der am Schock verstorbenen durch die Gesamtzahl der Patienten innerhalb der einzelnen Kategorien für den Sepsis-Score und die Gesamtstickoxide (NOx) geteilt. Ebenso wie die Zunahme des Scorepunktwertes ist eine Zunahme der NOx-Konzentration mit einer erhöhten Mortalität verbunden.

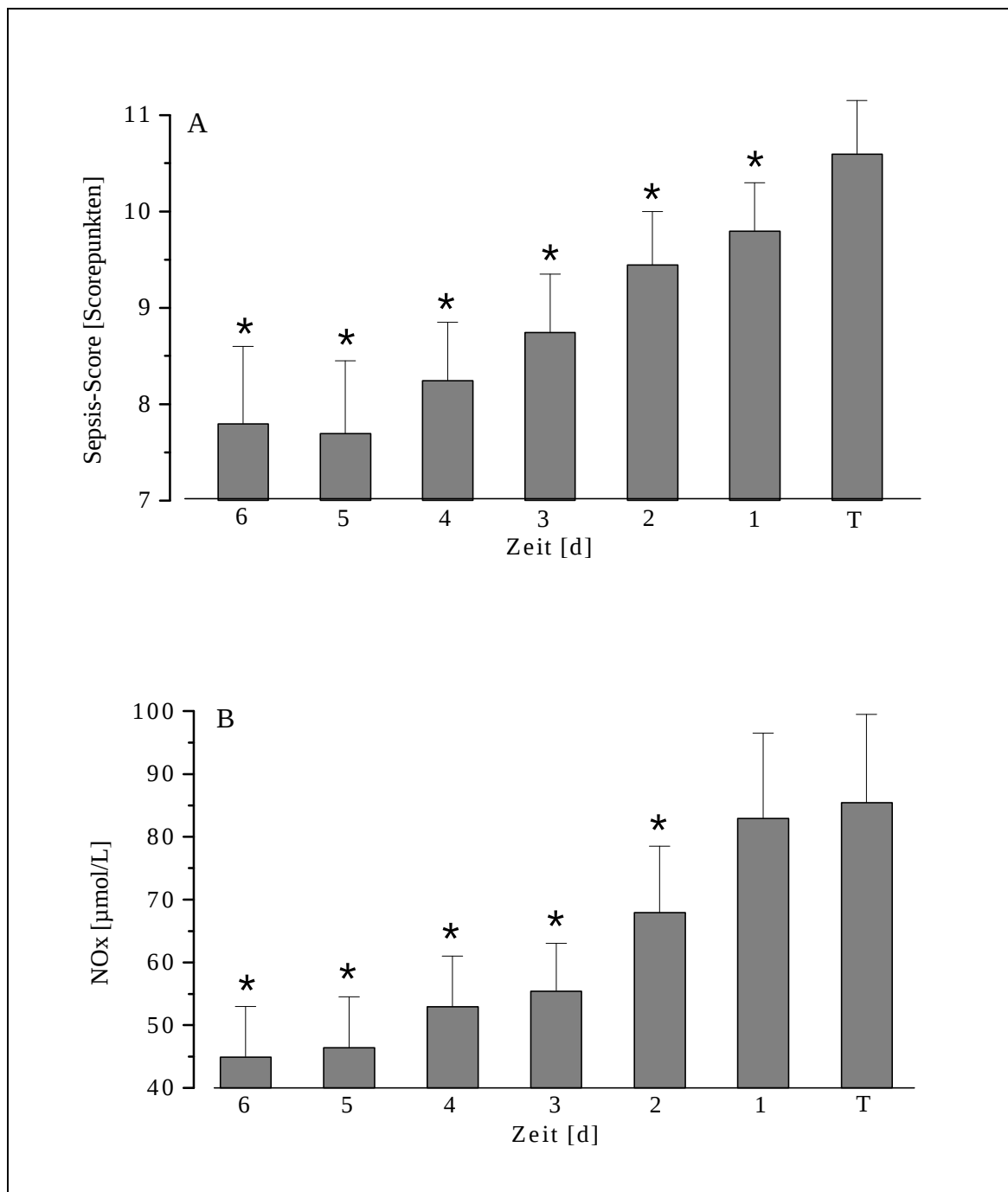


Abbildung 19: Veränderungen der Gesamtstickoxide und der Schwere des septischen Schocks vor dem Tod der Patienten.

Dargestellt sind die Veränderungen der Punktezahl des Sepsis-Score (A) und der Konzentration der Gesamtstickoxide (B) (NOx) an den sechs Tagen vor Eintritt des Todes und am Todestag bei Patienten, die im septischen Schock verstarben ($n=21$). T markiert den Todestag.* zeigt die entsprechenden Werte der Parameter mit signifikantem Unterschied zum Wert am Tage des Versterbens ($p<0,05, \bar{x} \pm \text{SEM}$).

Bei Patienten im septischen Schock stieg mit zunehmender Schwere des Schocks die Mortalität an. Ebenso wie der Sepsis-Score spiegelt die Zunahme der NOx-Konzentration diese Erhöhung der Mortalität wider (vgl. **Abbildung 18**). Stieg die Konzentration an NOx über 40 µmol/L an, konnte eine Zunahme der Mortalität um nahezu das Dreifache beobachtet werden. 21 Patienten, die im septischen Schock verstarben, zeigten an den Tagen vor dem Tod einen signifikanten kontinuierlichen Anstieg der Konzentrationen an NOx bei kontinuierlich zunehmender Schwere des septischen Schocks. Die NOx-Konzentrationen stiegen von $55,3 \pm 7,6$ auf $85,0 \pm 13,9$ µmol/L (**Abbildung 19**). Im Gegensatz dazu konnte bei 8 Patienten, die an einem Myokardinfarkt, einem kardiogenen Schock oder an einer zerebralen Blutung verstarben, keine signifikante Veränderung der Konzentration an Gesamtstickoxiden festgestellt werden.

3.4. Aminosäurenkonzentrationen der septischen Patienten

Die Konzentrationen der den L-Arginin-NO-Stoffwechselweg determinierenden Aminosäuren L-Arginin, L-Citrullin und L-Hydroxyarginin wurden im Plasma eines Subkollektives von 21 Patienten mit der klinischen Diagnose Sepsis und ansteigendem Sepsis-Score mit der dargestellten Methodik gemessen. Die Kontrolle bestand aus 20 nichtseptischen Patienten mit einem konstant niedrigen Sepsis-Score. Der Schweregrad der septischen Kreislauftsituation und die Diagnose Sepsis wurden anhand des entwickelten Sepsis-Score und der Sepsisdefinition nach Bone für alle Beobachtungstage während des Aufenthaltes auf der Intensivstation bestimmt. Die septischen Patienten ließen sich nach der jeweiligen Kreislauftsituation und anhand des klinischen Scoresystems einer septischen und einer nicht septischen Kreislauftsituation zuordnen. Von den 21 Septikern verstarben 7 Patienten in der Sepsis, 14 Patienten überlebten.

Bezüglich der Aminosäure L-Arginin fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den septischen Patienten und dem Kontrollkollektiv, L-Citrullin dagegen war bei den septischen Patienten signifikant niedriger. L-Hydroxyarginin zeigte einen Unterschied zwischen den Kontrollpatienten, bei denen es nicht nachweisbar war ($<0,5 \mu\text{mol/L}$), und den septischen Patienten, bei denen es nachweisbar war ($2,2 \pm 0,2$). Einen Überblick über die ermittelten Meßdaten gibt **Tabelle 7**:

Tabelle 7: Septiker- und Kontrollkollektiv

Angegeben sind die Meßwerte der einzelnen Parameter für die unterschiedlichen Kollektive. *: Diese Werte unterscheiden sich signifikant von den zugehörigen Werten der Kontrollgruppe. Bei den qualitativen Parametern wie Ernährung steht die 0 für eine orale Nahrungszufuhr, die 1 für eine parenterale Ernährung, bei dem Parameter Geschlecht kennzeichnet die 0 weibliches, die 1 männliches Geschlecht. ($\bar{x} \pm \text{SEM}$, Statistik: Student-t-Test).

Parameter	Septikerkollektiv				Kontrolle	Statistik
	mit septische Kreislauftsituation	ohne	verstorben	überlebt		
Patientenanzahl [p]	21	21	7	14	20	
Beobachtungstage [n]	96	82	62	116	20	
L-HOArg [$\mu\text{mol/L}$]	$2,2 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,2^*$	$1,8 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,0$	$p < 0,05$
L-Arginin [$\mu\text{mol/L}$]	$59,6 \pm 2,2$	$60,2 \pm 3,1$	$67,9 \pm 2,9$	$54,5 \pm 2,2$	$61,6 \pm 6,4$	n.s.
L-Citrullin [$\mu\text{mol/L}$]	$11,6 \pm 0,4^*$	$13,7 \pm 1,1^*$	$12,5 \pm 0,7^*$	$12,2 \pm 0,6^*$	$28,7 \pm 3,8$	$p < 0,05$
Kreatinin [mg/dL]	$1,5 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,1$	$1,2 \pm 0,1$	n.s.
Alter [a]	$55,9 \pm 0,5$	$61,8 \pm 0,6$	$52,8 \pm 0,6$	$62,0 \pm 0,5$	$58,8 \pm 1,4$	n.s.
Geschlecht	$0,61 \pm 0,03$	$0,47 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,03$	$0,54 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,06$	n.s.
Ernährung	$0,96 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,03$	$0,99 \pm 0,1$	$0,57 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,1$	$p < 0,05$

Mit zunehmender Schwere der Sepsis nahm die Konzentration an L-Hydroxyarginin zu ($r = 0,67$; $p < 0,0001$). Das Maximum der L-HOArg-Konzentrationen fand sich bei den 7 septischen Patienten, welche an den Folgen der Sepsis verstarben. Im Vergleich zu den die Sepsis überlebenden 14 Patienten waren die Konzentrationen um mehr als als den Faktor 2 erhöht: $4,2 \pm 0,2$ vs. $1,8 \pm 0,1 \mu\text{mol/L}$ (vgl. Tabelle 7). Geschlechtsspezifische und altersspezifische Einflüsse der Aminosäurenkonzentration konnten ausgeschlossen werden.

Zur Beurteilung der Korrelation zwischen den gemessenen Konzentrationen an L-Hydroxyarginin und den Stoffwechselendprodukten des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges Nitrit und Nitrat (NOx) erfolgte eine Standardisierung der Werte, um die Einflußfaktoren Ernährungsform und Kreatininwert - als Maß für die Eliminationsleistung von Nitrat durch die Nieren - zu berücksichtigen. **Abbildung 20** zeigt den Zusammenhang der Konzentrationen an L-HOArg und der NOx-Werte im Plasma der septischen Patienten, die über die angegebenen Beobachtungstage ausschließlich parenteral ernährt wurden und die einen Kreatininwert $\leq 1,2 \text{ mg/dL}$ aufwiesen.

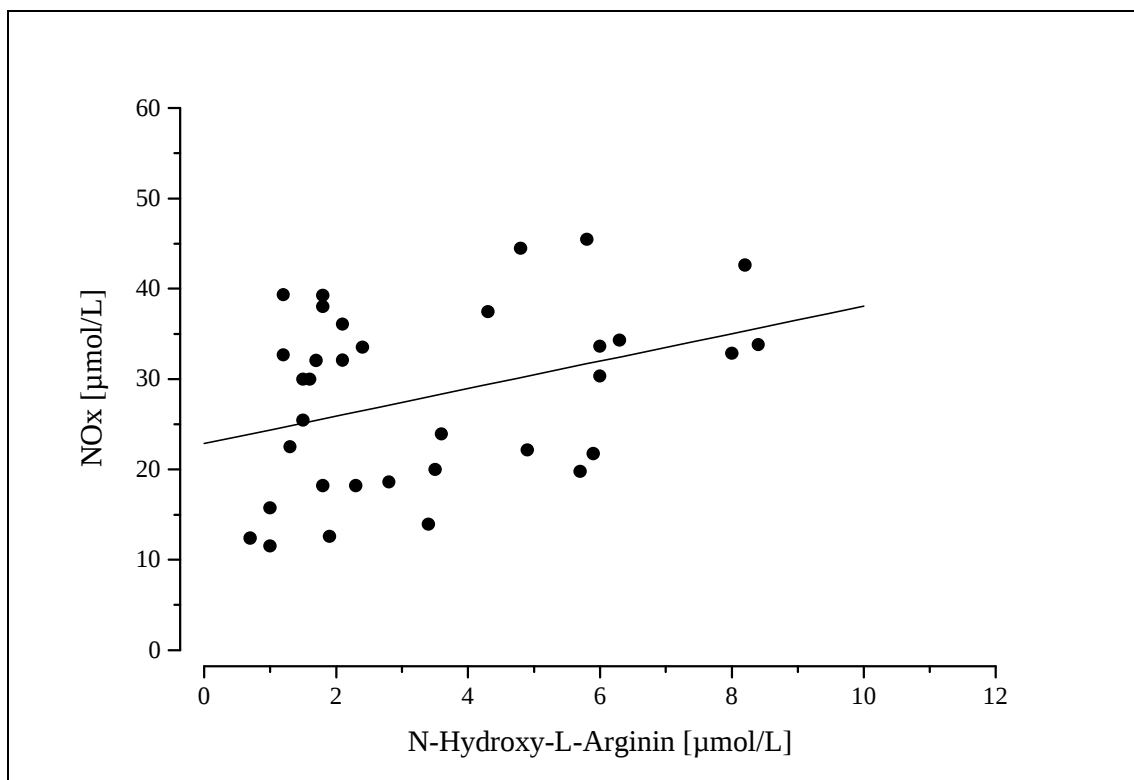


Abbildung 20: Vergleich der Konzentrationen von L-Hydroxyarginin und NOx im Serum von parenteral ernährten Patienten mit septischem Schock (S-Kreatinin $\leq 1,2 \text{ mg/dL}$).

Auf der Abszisse sind die Konzentrationen von L-Hydroxyarginin und auf der Ordinate die Konzentrationen von Nitrit/Nitrat der jeweils gleichen Plasmaproben gegeneinander aufgetragen ($r = 0,36$, $p < 0,0038$). An allen Beobachtungstagen ($n = 36$) wurden die Patienten parenteral ernährt und hatten einen Kreatininwert $\leq 1,2 \text{ mg/dL}$.

Aus der Korrelation wird die positive Beziehung zwischen dem spezifischen Intermediat des NO-Stoffwechselweges L-HOArg und dem Endprodukt NO_x deutlich. Es ist bisher keine andere Quelle für L-HOArg im menschlichen Körper identifiziert worden ³³, so daß der Anstieg der Konzentration für den erhöhten Umsatz der Reaktionskette in der Sepsis sprechen könnte.

4. Diskussion

4.1. Patientenkollektive und Studienprotokoll

Das Studienprotokoll sah vor, alle Patienten, die innerhalb von 6 aufeinanderfolgenden Monaten auf die beiden internistischen Intensivstationen aufgenommen wurden, zu erfassen und die angegebenen klinischen und laborchemischen Parameter für jeden Beobachtungstag zu dokumentieren. Die Patienten wurden entweder bis zu ihrer Verlegung auf die Normalstation oder bei letalem Ausgang der Erkrankung bis zu ihrem Ableben an jedem Aufenthaltstag auf der Intensivstation untersucht. Bei dem Gesamtkollektiv von 424 Patienten mit insgesamt 2274 Beobachtungstagen handelte es sich um ein sehr heterogenes Kollektiv, da sich die Patienten aus allen verschiedenen Fachrichtungen der Inneren Medizin zusammensetzten. Häufig gestellte Diagnosen auf diesen beiden Intensivstationen sind beispielsweise Myokardinfarkt oder Pneumonie bei chronischer Lungenerkrankung, es gehen aber auch hämatologische und neurologische Patienten in das Kollektiv ein. Die Patientenkollektive von chirurgischen Sepsisstudien setzen sich aus anderen Risikogruppen zusammen, sie beinhalten Patienten mit postoperativer Wundinfektion, abdominalen Komplikationen oder traumatisierte Patienten^{63,84}. In dieser Studie sollten Patienten, die nur für ein oder zwei Tage zur Beobachtung auf die Intensivstation aufgenommen wurden - z.B. Patienten nach Myokardinfarkt - , von vornherein aus der Untersuchung ausscheiden. Zusätzlich zu den generellen Ausschlußkriterien wurden aus diesem Grund nur diejenigen Patienten in die weitere Auswertung der Daten aufgenommen, die wenigstens für die Dauer von drei Beobachtungstagen auf der Intensivstation behandelt wurden. Da der Sepsis-Score und die Gesamtstickoxide dennoch als allgemeingültige Verlaufsparemeter einer Sepsis beurteilt werden sollten, war es notwendig, keine weiteren Einschränkungen der Patientenkollektive vorzunehmen. Deshalb wurden keine Patienten aufgrund ihres Alters oder aufgrund ihres Geschlechts aus der Studie ausgeschlossen.

4.2. Sepsis-Score

In dieser Studie wurde ein neuer Sepsis-Score zur Verlaufsbeobachtung der Sepsis und Einschätzung der Schwere der septischen Kreislaufbeeinträchtigung entwickelt. Dieser Sepsis-Score kann zur Diagnosesicherung der Sepsis bei internistischen Intensivpatienten eingesetzt werden und bei der Abschätzung der Prognose eines septischen Patienten hilfreich sein. Er wurde in dieser Untersuchung ebenfalls für den Vergleich der laborchemischen Analysen herangezogen.

Das charakteristische Bild des septischen Schocks besteht aus der hyperdynamen Kreislauftsituation, die aus einer schweren Hypotension, einer gesteigerten Herzauswurfleistung und einer ausgeprägten Reduktion des systemischen vaskulären Widerstandes (SVR) resultiert. Über die Bestimmung des SVR, der über die invasive Methode der HZV-Kathetermessung ermittelt werden kann, ist die Diagnose des septischen Schocks möglich ^{31,66,71,78}. Der SVR kann die Veränderung der Kreislauftsituation in der Sepsis anzeigen und hat ebenfalls einen prognostischen Wert ^{31,66}. Die frühzeitige Erhöhung des im Schock erniedrigten SVR kann die Prognose des Patienten entscheidend verbessern. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß die Erhöhung des SVR auch im Verlauf der Sepsis und des septischen Schocks seine günstigen prognostischen Auswirkungen beibehält ⁷¹. Ein Vergleich der hämodynamischen Parameter des in dieser Studie untersuchten Rechtsherzkatheterkollektivs zeigte eine signifikante Reduktion des SVR bei den 15 Patienten in der septischen Phase gegenüber den 7 Patienten in der nicht septischen Phase (Tabelle 4). Das Herzminutenvolumen (CO) und das Schlagvolumen (SV) waren tendenziell erhöht, der pulmonale Gefäßwiderstand leicht erniedrigt. Im septischen Schock kann somit in Übereinstimmung mit der Literatur der erniedrigte SVR als charakteristische Meßgröße der hämodynamischen Veränderungen betrachtet werden.

Die Diagnosesicherung mittels Rechtsherzkatheter ist zwar ein zuverlässiges diagnostisches Verfahren, belastet den Patienten aber aufgrund der Invasivität der Untersuchung. Der liegende Katheter stellt zudem eine zusätzliche Infektionsquelle für den Patienten dar, kann selbst eine Kathetersepsis verursachen und eignet sich wegen seiner zeitlich begrenzten Liegedauer nicht für die Verlaufsbeobachtung. Der einfach zu erhebende Sepsis-Score sollte deshalb als nichtinvasive Alternative zu diesem invasiven Verfahren der Kreislaufdiagnostik entwickelt werden. Die in der Sepsis veränderten Routineparameter wurden in dem Sepsis-Score zusammengefaßt, der anschließend durch die HZV-Messung an dem hämodynamischen Referenzparameter SVR validiert wurde.

Der vorliegende Sepsis-Score für ein internistisches Patientenkollektiv trennt mit hoher Sensitivität (98%) und Spezifität (96%) bei einem Trennwert von 7 Scorepunkten zwischen septischer und nicht septischer Kreislauftsituation (Abbildung 9). Eine zunehmende Schwere des septischen Schocks entspricht dabei einer Zunahme des Score-Punktwertes. Dieser Zusammenhang hat eine prognostische Bedeutung, da der Schweregrad der Erkrankung naturgemäß die Prognose mitbestimmt ^{61,81,82}. In dem untersuchten Patientenkollektiv ergab sich eine signifikante Abhängigkeit der Mortalität von der Höhe des Score und dem Scoreverlauf (Abbildung 11). Nach Schuster ⁸¹ läßt sich die prognostische Genauigkeit eines Score durch den Vergleich der vorausgesagten mit der tatsächlichen Mortalitätsrate im Krankengut ermitteln. Stellt

man diesen Vergleich an, zeigt der Sepsis-Score mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 82% eine gute Übereinstimmung zum realen Krankheitsausgang und eignet sich deshalb zur Prognosestellung bei septischen Patienten. Kein Patient mit einem Sepsis-Score von größer oder gleich 13 Punkten überlebte die Sepsis. Im Gegensatz zu den beiden existierenden chirurgischen Sepsis-Scores (s.u.) macht dieser neue Sepsis-Score zusätzlich eine Aussage über das Letalitätssrisiko des Sepsisstadiums. Für die Auswahl und Untergliederung der Einzelparameter des Score wurden die Definition der Sepsis nach Bone ⁶ und verschiedene bereits existierende allgemeine und spezielle Scoresysteme berücksichtigt. Die pathologische Beeinträchtigung der verschiedenen Organfunktionen in der Sepsis sollte in den Einzelparametern möglichst breit widerspiegelt werden. Der Score verwendet Parameter, die zum Routineprogramm fast aller Krankenhäuser zählen.

In dem untersuchten Patientenkollektiv besteht eine signifikante, lineare und inverse Korrelation zwischen der Höhe des SVR und der Score-Punktezahl des Sepsis-Score (Abbildung 12). Mit steigender Score-Punktezahl nimmt also der SVR kontinuierlich ab und damit die Schwere der septischen Kreislauftsituation zu. Dies ist als Hinweis dafür zu werten, daß der Sepsis-Score gut mit der Schwere der septischen Kreislaufbeeinträchtigung korreliert.

In der Vergangenheit wurden bereits Scoresysteme entwickelt, die die Prognose des Patienten anzeigen und eine Aussage über die Schwere der Erkrankung machen. Am weitesten verbreitet für die Beurteilung von Patienten auf Intensivstationen sind der APACHE I ⁴¹ und der SAPS ⁸⁴ und deren Weiterentwicklungen APACHE II ⁴² und SAPS II ⁵⁰. Diese Klassifikationssysteme sind allgemeine Prognosescores, die über die Höhe ihres Punktwertes den Grad der Beeinträchtigung des Gesundheitszustandes des Patienten beschreiben, ohne spezifisch für eine Erkrankung zu sein. Sie beschreiben hauptsächlich das Mortalitätsrisiko des Patienten bei Einweisung auf die Intensivstation, bilden indirekt aber auch bei wiederholter Anwendung den Krankheitsverlauf des Patienten ab. Im Gegensatz dazu wurden primär verlaufsorientierte krankheitsspezifische Scoresysteme für die Sepsis entwickelt, wie z.B. der Sepsis-Score nach Elebute und Stoner ¹⁷ und der Sepsis Severity Score ⁸⁴. Die Vermutung liegt nahe, daß diese spezifischen Schweregradscores eine noch bessere prognostische Wertigkeit haben, da sie diejenigen Variablen bewerten, welche die krankheitstypischen Veränderungen der Sepsis anzeigen ⁹¹. Es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, daß die Beurteilung der Krankheitsschwere durch die bisherigen spezifischen Schweregradscores genauer gelingt als durch die verbreiteten allgemeinen Prognosescores (APACHE II, SAPS II) ¹. Jeder einzelne Beobachtungstag eines septischen Patienten stellt eine Momentaufnahme des dynamischen Verlaufs der Erkrankung dar. Deshalb

liegt der wesentliche Vorteil von Schweregradscores darin, daß sie anzeigen, wo sich der Patient auf der entsprechenden Schweregradskala befindet und wie sich sein Zustand im Verlauf der Erkrankung verändert. Die beiden bereits existierenden Sepsis-Scores haben den entscheidenden Nachteil, daß sie an chirurgischen Patientenkollektiven entwickelt wurden und demzufolge schon aus formalen Gründen nicht ohne weiteres auf ein internistisches Patientenkollektiv übertragen werden können. Streng genommen gilt nämlich die Aussage eines Score nur für Patientenkollektive, die hinsichtlich der Art des Grundleidens eine dem Erhebungs- und Validierungskollektiv ähnliche Zusammensetzung aufweisen⁸¹. Keiner der beiden Scores erlaubt eine Einschätzung des Letalitätsrisikos. Des weiteren enthalten sie Einzelvariablen, die speziell auf die septischen Komplikationen postoperativer chirurgischer Patienten ausgerichtet sind, so geht z.B. der Nachweis der Lokalinfektion nach einer Operation oder der Erregernachweis durch Blutkulturen in die Bewertung mit ein. Nicht selten bleibt bei Patienten auf Intensivstationen der Infektionsherd zunächst unklar, bei 23 % liegt sogar eine schwere Sepsis mit negativen Blutkulturen vor⁷. Einer der Vorteile des neu entwickelten Sepsis-Score liegt deshalb in dem Verzicht auf den mikrobiologischen Erregernachweis durch die Untersuchung von Blutkulturen.

Neben der Beurteilung des Schweregrades und der Prognose des Patienten gibt es noch weitere wichtige Eigenschaften von Scoresystemen. Sie ermöglichen den Vergleich von verschiedenen Patientenkollektiven, da der Zustand des Patienten untersucherunabhängig anhand von genau definierten Kriterien beurteilt wird. Somit können räumlich oder zeitlich getrennte Patientenkollektive vergleichend beurteilt werden und die Beeinflussung des Krankheitszustandes durch verschiedene Therapieformen qualitativ und quantitativ objektiviert werden. Dies verbessert die Therapie- und Qualitätskontrolle der medizinischen Versorgung intensivpflichtiger internistischer Patienten^{81,82}. Trotz aller Vorteile besteht dennoch die Gefahr, Scoresysteme bezüglich ihrer individuellen Aussagekraft zu überschätzen. Sie werden letztendlich nicht die individuelle Einschätzung des erfahrenen Klinikers ersetzen, sondern lediglich durch die Umsetzung eines klinischen Zustandsbildes in einen faßbaren und vergleichbaren Zahlenwert als Entscheidungshilfe dienen können.

4.3. Gesamtstickoxide

4.3.1. Einflußfaktoren der Plasmakonzentration von NOx

Bereits 1916 wurde beschrieben, daß Nitratkonzentrationen im Urin des Menschen gemessen werden können, die die orale Zufuhr von Nitrat mit der Nahrung übersteigen⁵⁶. Erst 1981 jedoch lieferten Green et al. den überzeugenden Beweis für die Existenz von endogenen Quellen der

Bildung von Nitrit und Nitrat im menschlichen Körper ²⁷. Wie man heute weiß, sind Nitrit und Nitrat die stabilen Endprodukte des NO-Metabolismus im menschlichen Kreislauf und ein Teil der zirkulierenden Stoffe entstammt dem L-Arginin-NO-Stoffwechselweg. Bisher sind keine anderen Synthesewege körpereigener Nitrit- und Nitrat-Produktion entdeckt worden ²⁵. NO hat als Radikal eine sehr kurze Halbwertszeit und wird im Blut nach der Entstehung innerhalb weniger Millisekunden zu Nitrit oxidiert. Nitritbestimmungen im humanen Blut sind schwierig, weil es selbst bei einer Halbwertszeit von nur 110 Sekunden ³⁹ innerhalb weniger Minuten in den Erythrozyten zu Nitrat oxidiert wird ^{72,87}. Nitrit ist daher eher für die Messung der augenblicklichen Veränderungen der NO-Produktion zum Beispiel im Rahmen von *in vivo* Studienexperimenten geeignet. Nitrat bleibt im Blut bis zu seiner Ausscheidung über die Nieren stabil und hat eine Halbwertszeit von 5-8 Stunden ^{86,92}. Nitrat eignet sich demzufolge für die Bestimmung der langfristigen Veränderungen des NO-Umsatzes. Am Tiermodell konnte in immunhistochemischen Untersuchungen die sepsisabhängige Induktion der Kalzium-unabhängigen NO-Synthase II (iNOS) durch Endotoxin und Zytokine nachgewiesen werden (Übersicht bei ^{26,30}). Die pharmakokinetischen Besonderheiten von Nitrat im menschlichen Kreislauf haben zu der Hypothese geführt, daß die Plasmakonzentration von Nitrat diese spezifische Erhöhung der NO-Produktion durch die iNOS in der Sepsis widerspiegeln kann. Als Hauptquelle für die überschießende NO-Produktion in der Sepsis durch die iNOS und die damit verbundenen Veränderungen der Nitratkonzentration im Plasma gelten immunkompetente Leukozyten ^{26,62}.

Um Nitrat in biologischen Proben messen zu können, wurden in der Vergangenheit verschiedene Methoden für die Bestimmung entwickelt. Die am häufigsten eingesetzten Methoden beruhen auf der von Griess ²⁹ bereits Ende des 19. Jahrhunderts beschriebenen Farbreaktion von Nitrit. Um das Nitrat vorher zu Nitrit zu reduzieren, wird die Kadmiumreduktion ¹⁰ oder ein enzymatisches Reduktionsverfahren ⁷⁶ angewendet. In dieser Studie wurde die enzymatische Reduktion gewählt, weil sie weniger aufwendig ist und die Messung großer Probenzahlen in einer kurzen Zeit ermöglicht.

Der Plasmanitratspiegel kann durch eine Vielzahl von sepsisunabhängigen Faktoren beeinflusst werden ^{27,39,86}: Dies sind die diätetische Nitrataufnahme, die Speichelzusammensetzung, die bakterielle Synthese von Nitrat im Darm und die Inhalation von atmosphärischen NO-Metaboliten. Außerdem spielen die Aktivität denitrierender Leberenzyme und die Nierenfunktion eine Rolle bei der Elimination von Nitrat. Die Plasmakonzentration von Nitrat setzt sich hauptsächlich aus der endogenen Produktion und der alimentären Natriumaufnahme zusammen. In Untersuchungen mit radioaktivmarkiertem Stickstoff (¹⁵NO₃⁻) konnte die Menge der endogenen

Produktion beim gesunden Menschen mit 1 mmol/Tag bestimmt werden ^{28,92}. Die tägliche Nitrataufnahme mit der Nahrung ist abhängig von der Nahrungszusammensetzung und liegt zwischen 75 und 150 µmol. Auch bei nitratarmer Nahrungszufuhr ist in Abhängigkeit von der Proteinzusammensetzung der Nahrung eine exzessive Bildung von Nitrat durch Darmbakterien möglich ⁸⁶. Im tierexperimentellen Modell erhöhte die diätetische Zufuhr von Proteinen die Ausscheidung im Urin und die Plasmakonzentration von Nitrit und Nitrat ⁵³. All dies veranschaulicht den nicht zu unterschätzenden Einfluß der alimentären Nitratzufuhr auf die Plasmakonzentration von Nitrat. In der vorliegenden Arbeit konnte nun eine eindeutige Differenz der durchschnittlichen Nitratkonzentration im Plasma bei Intensivpatienten mit unterschiedlicher Ernährungsform nachgewiesen werden. Oral ernährte Patienten hatten signifikant höhere Werte als parenteral ernährte Patienten, was die dargestellten beeinflussenden Zusammenhänge oraler Nitratzufuhr bestätigt. Bis zu 50% des zirkulierenden Nitrates werden beim Menschen mit der Nahrung aufgenommen ²⁷. Dies wird durch die Ergebnisse dieser Studie unterstützt, da die Nitratkonzentration im Plasma um nahezu 40% bei Patienten, die von oraler auf parenterale Ernährung umgestellt wurden, sank (Abbildung 13). Um die auf diese Weise eindeutig identifizierte Einflußgröße für die Analyse der Gesamtstickoxide auszuschalten, wurden deshalb nur Patienten mit parenteraler Ernährung in die Auswertung einbezogen. Alle parenteral ernährten Patienten erhielten die gleiche nitratfreie Infusionsernährung. Daß die beobachtete Veränderung der Nitratkonzentration bei septischen Patienten Folge unterschiedlicher Ernährungsform ist, konnte somit ausgeschlossen werden. Keine der bisher veröffentlichten Studien, die erhöhte Nitratkonzentrationen bei Patienten mit Sepsis nachwiesen, differenzierte bei der Messung der Gesamtstickoxide zwischen unterschiedlichen Ernährungsformen ^{19,25,62,63}. Lediglich eine Studie berücksichtigte den Einfluß des Ernährungsmodus, indem sie für die Nitratbestimmung explizit postoperative Patienten auswählte, weil diese seit mindestens 18 Stunden nüchtern waren und die Ergebnisse daher unabhängig von diätetischer Nitratzufuhr beurteilt werden konnten ⁹⁰.

Ein weiterer Einflußfaktor der plasmatischen Nitratkonzentration ist die Nierenfunktion. 60% einer oral aufgenommen Menge an Nitrat werden eindeutig über die Niere eliminiert ⁹², wo es glomerulär filtriert und teilweise reabsorbiert wird. Da Nitrat mit dem Urin ausgeschieden wird, kann das Auftreten eines Nierenversagens oder eine eingeschränkte Nierenfunktion im septischen Schock den Plasmaspiegel von Nitrat beeinflussen, was die Interpretation der Werte erheblich erschwert. Häufig wird das Serum-Kreatinin zur Beurteilung der Ausscheidungsfunktion der Nieren herangezogen. Vorhergehende Studien, die die NOx-Konzentrationen im septischen Schock bestimmten, zeigten diesbezüglich vergleichbare Ergebnisse. Eine positive Korrelation zwischen den Gesamtstickoxiden im Plasma und dem Serum-Kreatinin bei Patienten im

septischen Schock fanden Gomez-Jimenez et al.²⁵. Bei Evans et al.¹⁹ konnte die Erhöhung der NOx-Konzentration im septischen Schock nicht ausschließlich durch die eingeschränkte Nierenfunktion erklärt werden, da die NOx-Konzentration und das Serum-Kreatinin nicht miteinander korrelierten. In einer anderen Studie traten bei Patienten mit schwerer Sepsis und zusätzlicher Niereninsuffizienz vierfach höhere Werte auf als bei Patienten mit schwerer Sepsis und intakter Nierenfunktion³⁰. Hier korrelierten die NOx-Konzentrationen im septischen Schock außerdem hochsignifikant mit dem Ausmaß der Niereninsuffizienz. In der vorliegenden Arbeit ließ sich ebenfalls eine positive Beziehung zwischen NOx-Konzentration und Serum-Kreatinin im Studienkollektiv nachweisen (Abbildung 14). Bei einem Serum-Kreatinin von über 1,3 mg/dL stiegen die NOx-Konzentrationen als Folge der Nierenfunktionseinschränkung zu einem gewissen Teil an. Bei niereninsuffizienten septischen Patienten zeigte sich darüber hinaus ein Abfall von über 40% der NOx-Konzentration im Plasma nach der Durchführung einer CVVH als Nierenersatzverfahren (Abbildung 13). Diese Ergebnisse machen deutlich, daß die Beurteilung der NOx-Werte ohne Berücksichtigung der zugehörigen Nierenfunktion keinen Sinn ergibt.

Zur unabhängigen Beurteilung der NO-Produktion in der Sepsis und im septischen Schock durch die Konzentration der Gesamtstickoxide im Plasma sollte in dieser Studie deshalb der Einfluß der Nierenfunktion ausgeschaltet werden. Dies wurde durch die Untersuchung des Subkollektives mit guter Nierenfunktion bei einem Serum-Kreatinin $\leq 1,4$ mg/dL umgesetzt. Da bei Patienten mit Sepsis und normaler Nierenfunktion dennoch erhöhte NOx-Konzentrationen gemessen werden konnten, spricht dies für eine gesteigerte NO-Produktion durch die iNOS als Quelle des Überschusses an NOx.

Auch Patienten mit Leberzirrhose zeigen erhöhte Plasmakonzentrationen an Nitrit und Nitrat³². NOx korreliert bei diesen Patienten signifikant mit Endotoxin. Als Erklärungsversuch für diese Zusammenhänge werden zwei Hypothesen aufgestellt. Bei den Patienten mit Leberzirrhose ist einerseits die Funktion des Retikuloendothelialen Systems (RES), das für die Elimination von Bakterien und deren Bestandteilen zuständig ist, gestört, andererseits bestehen portokavale Anastomosen, die das Blut an der Leber mit ihrer entgiftenden Funktion vorbeischleusen. Dies sei insgesamt dafür verantwortlich, daß Darmbakterien, die die intestinale Schranke überwinden, vermehrt im Körperkreislauf zu finden sind und dadurch zu einer Induktion der iNOS und als Folge zu einer Erhöhung der NOx-Konzentration im Plasma führen. Sogar bei Neugeborenen und Kleinkindern mit Diarrhoe aufgrund von Darminfektionen können hohe Nitratkonzentrationen im Blut auftreten und zu einer Methämoglobinämie führen³⁴. Säuglinge und Kleinkinder weisen wie Erwachsene eine Erhöhung der Konzentration von NOx in der Sepsis und im Multi-Organ-Versagen auf^{16,94}. Die Vielzahl der dargestellten sepsisabhängigen und sepsisunabhängigen

Einflußgrößen der NOx-Konzentration im Blut wirft die Frage auf, ob eine Betrachtung der absoluten Höhe der Werte überhaupt sinnvoll ist. Dies soll im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

4.3.2. NOx als Parameter zur Abschätzung der NO-Produktion

In bisher durchgeführten Studien zur Bestimmung der NOx- Konzentration im Blut bei Patienten im septischen Schock beliefen sich die untersuchten Patientenzahlen auf nur 11-15 Patienten^{25,13,18}. Diese Arbeit ist deshalb die erste prospektive Studie mit einer großen Anzahl konsekutiver, nicht-selektierter Patienten einer internistischen Intensivstation (63 Patienten mit septischem Schock an 329 Beobachtungstagen). Sie dient der Bestimmung der prognostischen und diagnostischen Wertigkeit von NOx bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock. Als Ergebnis zeigte sich ein signifikanter Anstieg der NOx-Konzentrationen im septischen Schock im Vergleich zur Kontrollgruppe in Übereinstimmung mit den obengenannten Studien. In diesen Arbeiten wiesen die absoluten Zahlen der Konzentrationen von NOx allerdings große Unterschiede auf. So schwankten die bestimmten Mittelwerte von NOx im septischen Schock zwischen $52,9 \pm 9,2$ ²⁵ und $121,7 \pm 5,3$ $\mu\text{mol/L}$ ¹⁸. Der relativ niedrige Anstieg des Mittelwertes der vorliegenden Studie auf $45,6 \pm 6,3$ $\mu\text{mol/L}$ ist durch die hohe Untersuchungsanzahl zu erklären, da die Patienten mit Sepsis und nur leichter Kreislaufbeeinträchtigung – dies war die Mehrzahl der Beobachtungstage – nur gering erhöhte Konzentrationen an NOx zeigten. Mit zunehmender Schwere der Kreislaufbeeinträchtigung nahmen die Werte allerdings stark zu. So überstiegen die höchsten 5 gemessenen Konzentrationen an NOx bei schwerem Schock 250 $\mu\text{mol/L}$ vergleichbar mit den Ergebnissen von Nielly et al.⁶². Als bestes Testergebnis der NOx-Konzentration für die Diagnosestellung des septischen Schocks wurde ein Grenzwert von 35 $\mu\text{mol/L}$ gefunden, was mit den Ergebnissen obengenannter Studien mit einem cut-off von 25 bzw. 57 $\mu\text{mol/L}$ vergleichbar ist^{25,13}. In diesen Studien wurden allerdings zum Teil Patienten mit postoperativem Status untersucht, was die Vergleichbarkeit der Ergebnisse wiederum stark einschränkt. So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, daß sich chirurgische Patienten mit septischen Schock nur bedingt für die Einschätzung der NO-Produktion über die NOx-Konzentration eignen, da postoperative Patienten auch ohne die Diagnose septischer Schock erhöhte Konzentrationen an NOx aufweisen^{19,40,90}. Eine Ursache für diese Beobachtung könnte in der Ausschüttung von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α liegen, die bei postoperativen Patienten im Postaggressionsstoffwechsel erhöht ist⁴⁸. Eine andere Erklärung wäre die durch unerkannte leichte Sepsis oder Gewebsschädigung erhöhte Aktivität der iNOS.

Beim Vergleich der Absolutzahlen der NO_x-Konzentration bei Patienten mit Sepsis und septischem Schock, die in vorhergehenden Studien gemessen wurden, fällt die große Variabilität der Werte auf. Auch in dieser Untersuchung zeigten Patienten mit schwerer Sepsis in den Absolutzahlen von NO_x selbst unter Berücksichtigung der Ernährung und der Nierenfunktion eine große interindividuelle Variabilität. Dies kann durch die Vielzahl der sepsisunabhängigen Einflußgrößen verursacht sein. Die Sensitivität und die Spezifität einer Einzelmessung als Testverfahren lagen bei 52 bzw. 63%. Dies bedeutet, daß die Aussagekraft einer einmaligen Bestimmung der NO_x-Konzentration für die Diagnose und Prognoseabschätzung des septischen Schocks äußerst gering ist. Wesentlich aussagekräftiger ist die Betrachtung der intraindividuellen Verläufe der Konzentration an NO_x und die relative Änderung zum Ausgangswert (vgl. Abbildung 16 und 17). Eine Veränderung der NO_x-Konzentration war mit einer gleichgerichteten Änderung des Sepsis-Score verbunden und ermöglichte mit ausreichender Sensitivität und Spezifität die Vorhersage der Änderung der Schwere des septischen Schocks. Eine andere wichtige Beobachtung ist die Zunahme der Mortalität bei steigenden Werten von NO_x über 40 µmol/L (Abbildung 18). Dieser Zusammenhang kann für die Prognosestellung bei Patienten im septischen Schock hilfreich sein. Patienten, die im septischen Schock verstarben, zeigten interessanterweise einen zunehmenden und irreversiblen Anstieg der NO_x-Konzentration in den Tagen vor ihrem Tod (Abbildung 19). Diese Patienten hatten außerdem die höchsten gemessenen Werte an NO_x im Plasma, was insgesamt für eine Überproduktion an NO sprechen könnte. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist dieser praefinale Anstieg der Gesamtstickoxide der Induktion der iNOS im septischen Schock zuzurechnen, da sich bei Patienten, die an anderen Ursachen verstarben, diese Veränderungen nicht zeigten.

Die Vermutung, daß der Anstieg von NO_x im septischen Schock zu einem gewissen Anteil auf einem erhöhten Umsatz der iNOS beruht, ließ sich zusätzlich durch die Messung der Aminosäure L-Hydroxyarginin (L-HOArg) bekräftigen. Einzige bisher identifizierte Quelle für L-HOArg im menschlichen Körper ist der L-Arginin-NO-Stoffwechselweg³³, in dem es als Intermediärprodukt auftritt. L-HOArg war im Blut gesunder Menschen nicht nachweisbar und stieg bei Patienten im septischen Schock deutlich in den meßbaren Bereich an (vgl. Tabelle 7). Das Auftreten von L-HOArg im Plasma bei Patienten im septischen Schock unterstützt daher die Hypothese, daß die erhöhten Werte von NO_x zum Teil aus der gesteigerten NO-Produktion resultieren und nicht nur durch den Zufluß anderer Stoffwechselwege entstehen. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen Anstieg der Konzentration von L-HOArg und der Zunahme der NO_x-Konzentration konnte auch bei Ausschaltung möglicher Einflußfaktoren des NO_x-Spiegels nicht gefunden werden (Abb. 20).

Die pathophysiologische Rolle von NO bei Patienten mit Sepsis konnte in der Vergangenheit nur zum Teil aufgedeckt werden, nicht zuletzt deshalb, weil ein zuverlässiger diagnostischer Parameter, der die erhöhte Aktivität der iNOS präzise anzeigt, bisher nicht gefunden werden konnte⁹¹. Da direkte Meßmethoden fehlen, kann die Bestimmung von NOx mit den erwähnten Einschränkungen ein geeigneter Marker zur Quantifizierung der Aktivität der NO-Synthase im septischen Schock darstellen. Diesbezüglich sollten in zukünftigen Studien die diätetische Aufnahme von Nitrat und die Nierenfunktion bei der Messung der Konzentrationen von NOx kontrolliert werden, um die intraindividuelle Variabilität der Werte zu verringern.

5. Literaturverzeichnis

1. Arregui LM, Moyes DG, Lipman J Fatti LP. Comparison of disease severity scoring systems in septic shock. *Crit Care Med* 1991; **19**:1165-1171.
2. Avautuur JA, Boomsma F, van den Meiracker AH, de Jong FH, Bruining HA. Endothelin-1 and blood pressure after inhibition of nitric oxide synthesis in human septic shock. *Circulation* 1999; **99**:271-275.
3. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; **115**:457-469.
4. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. The American college of chest physicians/society of critical care medicine consensus conference committee. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; **101**:1644-1655.
5. Bone RC. Let`s agree on terminology: definitions of sepsis. *Crit Care Med* 1991; **19**:973-976.
6. Bone RC, Fisher jr CJ, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA, et al. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. *Crit Care Med* 1989; **17**:389-393.
7. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. *JAMA* 1995; **274**:968-974.
8. Champion HR, Sacco WJ, Carnazzo AJ, Copes WC, Fouty WJ. Trauma score. *Crit Care Med* 1981; **9**:672-676.
9. Chang SW, Feddersen CO, Henson PM, Voelkel NF. Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest* 1987; **79**: 1498-1509.
10. Cortas NK, Wakid NW. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem* 1990; **36**:1440-1443.
11. Cunnion RE, Parrillo JE. Myocardial dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin* 1989; **5**:99-118.
12. Dal Nagore AR. Southwestern internal medicine conference: Septic shock. *Am J Med Sci* 1991; **302**:50-65.
13. de Werra I, Jaccard C, Corradin SB, Chiolo R, Yersin B, Gallati H, et al. Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: comparisons in patients with septic shock, cardiogenic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med* 1997; **25**:607-613.
14. Deyl Z. Profiling of amino acids in body fluids and tissues by means of liquid chromatography. *J Chromatogr* 1986; **379**:177-250.
15. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleucin 1. *J Exp Med* 1986; **163**:1433-1450.
16. Doughty L, Carcillo JA, Kaplan S, Janosky J. Plasma nitrite and nitrate concentrations and multi organ failure in pediatric sepsis. *Crit Care Med* 1998; **26**:157-162.
17. Elebute EA, Stoner HB. The grading of sepsis. *Br J Surg* 1983; **70**:29-31.
18. Endo S, Inada K, Nakae H, Arakawa N, Takakuwa T, Yamada Y, et al. Nitrite/nitrate oxides (NOx) and cytokine levels in patients with septic shock. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1996; **91**:347-356.
19. Evans T, Carpenter A, Kinderman H, Cohen J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. *Circ Shock* 1993; **41**:77-81.
20. Feelisch M, te Poel M, Zamora M, Deussen A, Moncada S. Understanding the controversy over identity of EDRF. *Nature* 1994; **368**:62-65.
21. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. *Nature* 1980; **288**:373-376.

22. Fürst P, Pollack L, Graser TA, Godel H., Stehle P. Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. *J Chromatogr* 1990; **499**:557-569.
23. Giovannini I, Chiarla C, Boldrini G, Castiglioni GC, Castagneto M. Calorimetric response to amino acid infusion in sepsis and critical illness. *Crit Care Med* 1988; **16**:667-670.
24. Godel H, Graser T. Measurement of free amino acids in human biological fluids by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1984; **297**:49-61.
25. Gomez-Jimenez J, Salgado A, Mourelle M, Martin MC, Segura RM, Peracaula R, et al. L-arginine: nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock. *Crit Care Med* 1995; **23**:253-258.
26. Goode HF, Howdle PD, Walker BE, Webster NR. Nitric oxide synthase activity is increased in patients with sepsis syndrome. *Clin Sci* 1995; **88**:131-133.
27. Green LC, Ruiz de Luzuriaga K, Wagner DA, Rand W, Istfan N, Young VR, et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**:7764-7768.
28. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; **26**:131-138.
29. Griess JP. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Wesely und Benedikt „Über einige Azoverbindungen“. *Ber Deutsch Chem Ges* 1879; **12**:426-428.
30. Groeneveld PH, Kwappenberg KM, Langermans JA, Nibbering PH, Curtis L. Nitric oxide (NO) production correlates with renal insufficiency and organ dysfunction syndrome in severe sepsis. *Intensive Care Med* 1996; **22**:1197-1202.
31. Groeneveld ABJ, Nauta JJP, Thijs LG. Peripheral vascular resistance in septic shock: its relation to outcome. *Intensive Care Med* 1988; **14**:141-147.
32. Guarner C, Soriano G, Tomas A, Bulbena O, Novella MT, Balanzo J, et al. Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: Relationship to endotoxemia. *Hepatology* 1993; **18**:1139-1143.
33. Hecker M, Schott C, Bucher B, Busse R, Stoclet JC. Increase in serum N^G-hydroxy-L-arginine in rats treated with bacterial lipopolysaccharide. *Eur J Pharmacol* 1995; **275**:R1-R3.
34. Hegesh E, Shiloah J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin Chim Acta* 1982; **125**:107-115.
35. Jablons DM, Mule JJ, McIntosh JK, Sehgal PB, May LT, Huang CM. IL-6/IFN- β -2 as a circulating hormone: Induction by cytokine administration in humans. *J Immunology* 1989; **142**:1542-1547.
36. Jacob TD, Ochoa JB, Udekwu AO, Wilkinson J, Murray T, Billiar TR, et al. Nitric oxide production is inhibited in trauma patients. *J Trauma* 1993; **35**:590-597.
37. Kelm M, Feelisch M, Spahr R, Piper HM, Noack E, Schrader J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Comm* 1988; **154**:236-244.
38. Kelm M, Schrader J. Control of coronary vascular tone by nitric oxide. *Circ Res* 1990; **66**:1561-1575.
39. Kelm M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim Biophys Acta* 1999; **1411**:273-289.
40. Kirkeboen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis - an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; **43**:275-288.
41. Knaus WA, Zimmerman JE, Wagner DP, Draper EA, Lawrence DE. APACHE – acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system. *Crit Care Med* 1981; **9**:591-597.

42. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; **13**:818-829.
43. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994; **298**:249-258.
44. Kolb-Bachhofen V. Intra-islet expression of inducible nitric oxide synthase and islet cell death. *Biochemical society transactions* 1996; **24**:233-234.
45. Krausz MM, Perel A, Eimerl D, Cotev S. Cardiopulmonary effects of volume loading in patients in septic shock. *Ann Surg* 1977; **185**:429-434.
46. Kröncke K-D, Fehsel K, Kolb-Bachhofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 1998; **113**:147-156.
47. Kröncke K-D, Fehsel K, Kolb-Bachhofen V. Inducible nitric oxide synthase and its nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1995; **376**:327-343.
48. Lahat N, Zlotnik AY, Schtiller R, Bar I, Merin G. Serum levels of IL-1, IL-6 and tumor necrosis factors in patients undergoing coronary artery bypass graftings or cholecystectomy. *Clin Exp Immunol* 1992; **89**:255-260.
49. Le Gall JR, Loirat P, Alperovitch A, Glaser P, Granthil C, Mathieu D. et al. A simplified acute physiology score for ICU patients. *Crit Care Med* 1984; **12**:975-977.
50. Le Gall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new simplified acute physiology score (SAPS II) based on a european/north american multicenter study. *JAMA* 1993; **270**:2957-2963.
51. Lehmkuhl P, Lips U, Pichlmayr I. Der Hannover Intensiv Score (HIS) als neues Klassifikationssystem zu Verlaufskontrollen und Prognosestellung bei Intensivpatienten. *Med Klin* 1986; **81**:229-234.
52. Lorente JA, Landin L, De Pablo R, Renes E, Liste D. L-arginine pathway in the sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1993; **21**:1287-1295.
53. Mallet AK, Walters DG, Rowland IR. Protein-related differences in the excretion of nitrosoproline and nitrate by the rat: possible modification of de novo nitrate synthesis. *Food Chem Toxicol* 1988; **26**:831-835.
54. Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; **268**:12231-12234.
55. Minagawa N, Yoshimoto A. Purification and characterization of the assimilatory NADPH-nitrate reductase of *Aspergillus nidulans*. *J Biochem* 1982; **91**:761-774.
56. Mitchell HH, Shonle HA, Grindley HS. The origin of nitrates in urine. *J Biol Chem* 1916; **24**:461-490.
57. Moncada S., Higgs EA. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; **9**:1319-1330.
58. Moshage H, Kok B, Huizenga R, Jansen PLM. Nitrite and nitrate determinations in plasma: a clinical evaluation. *Clin Chem* 1995; **41**:892-896.
59. Natanson C, Hoffmann WD, Suffredini AF, Eichacker PQ, Danner RL. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. *Ann Int Med* 1994; **120**: 771-783.
60. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: Roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; **78**:915-918.
61. Neugebauer E, Lefering R. Scoresysteme und Datenbanken in der Intensivmedizin – Notwendigkeit und Grenzen. *Intensivmed* 1996; **33**:445-447.
62. Nielly IJ, Copland M, Haj M, Adey G, Bebjamin N, Bennett B. Plasma nitrate concentrations in neutropenic and non-neutropenic patients with suspected septicemia. *Br J Haematol* 1995; **89**:199-202.

63. Ochoa JB, Udekwa AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann Surg* 1991; **214**:621-625.
64. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; **327**:524-526.
65. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; **333**:664-666.
66. Parker MM, Shelhamer JH, Natanson C, Alling DW, Parrillo JE. Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors of human septic shock: Heart rate as an early predictor of prognosis. *Crit Care Med* 1987; **15**:923-929.
67. Parratt JR. Nitric oxide . A key mediator in sepsis and endotoxaemia? *J Physiol Pharmacol* 1997; **48**:493-506.
68. Parrillo JE: Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Eng J Med* 1993; **328**:1471-1477.
69. Perry TL, Hansen S. Technical pitfalls leading to errors in the quantifications of plasma amino acids. *Clin Chim Acta* 1969; **25**:53-58.
70. Petros A, Bennett D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991; **338**:1557-1558.
71. Pilz G, Werdan K. Cardiovascular parameters and scoring systems in the evaluation of response to therapy in sepsis and septic shock. *Infection* 1990; **18**:253-263.
72. Preik-Steinhoff H, Kelm M. Metabolism of nitric oxide in human blood. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1995; **351**:R78 (Abstract).
73. Reines HD, Halushka PV, Cook JA, Wise WC. Plasma thromboxane concentrations are raised in patients dying with septic shock. *Lancet* 1982; **ii**:174-175.
74. Sakuma I, Stuehr DJ, Gross SS, Nathan C, Levi R. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci* 1988; **85**:8664-8667.
75. Schaefer A, Piquard F, Haberey P. Plasma amino-acids analysis: effects of delayed samples preparation and of storage. *Clin Chim Acta* 1987; **164**:163-169.
76. Schild J, Klemme JH. Enzymatic nitrate assay by a kinetic method employing *E. coli* nitrate reductase. *Z Naturforsch* 1985; **40**:134-137.
77. Schumacher T, Kelm M, Buhn C, Preik-Steinhoff H, Kerber S, Heydthausen M et al. Evaluierung eines neuen Sepsis-Score für ein internistisches Patientenkollektiv. *Intensivmed* 1999; **36**:33-39.
78. Schuster HP. Studien zur Sepsistherapie – Ende oder Neubeginn einer Ära? *Intensivmed* 1996; **33**:157-159.
79. Schuster HP, Schuster FP, Ritschel P, Wilts S, Bodmann KF. The ability of the simplified acute physiology score (SAPS II) to predict outcome in coronary care patients. *Intensive Care Med* 1997; **23**:1056-1061.
80. Schuster HP, Wilts S, Ritschel P. Analyse einer Ergebnisqualitätskontrolle in der Intensivmedizin mittels des Simplified Acute Physiology Score II. *Med Klin* 1996; **91**:343-348.
81. Schuster HP. Die Bedeutung von Scoresystemen für die Voraussage von Behandlungsergebnissen in der Intensivmedizin. *Internist* 1996; **37**:1237-1243.
82. Schuster HP, Dick W. Scoresysteme in der Notfallmedizin? *Anaesthesist* 1994; **43**: 30-35.
83. Siegel JH, Cerra FB, Coleman B, Giovannini I, Shetye M, Border JR, et al. Physiological and metabolic correlations in human sepsis. *Surgery* 1979; **86**:163-193.
84. Stevens LE. Gauging the severity of surgical sepsis. *Arch Surg* 1983; **118**:1190-1192.

85. Swan JHC, Ganz W, Forrester J, Marcus H, Diamond G, Chonette D. Catheterization of the heart in man with use of a flow-directed balloon-tipped catheter. *N Eng J Med* 1970; **283**:447-454.
86. Tannenbaum SR. Nitrate and nitrite: origin in humans. *Science* 1979; **205**:1333-1335.
87. Tayeh MM, Marletta MA. Macrophage oxidation of L-arginin to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J Biol Chem* 1989; **264**:19654-19658.
88. Thiemermann C. Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmac* 1997; **29**:159-166.
89. Ukida M, Schäfer K, Bode JC. Effect of storage at -20°C on the concentration of amino acids in plasma. *J Clin Chem Clin Biochem* 1981; **19**:1193-1195.
90. van Dissel JT, Groeneveld PHP, Maes B, van Furth R, Frolich M, Feuth HDM. Nitric oxide: a predictor of morbidity in postoperative patients. *Lancet* 1994; **343**:1579-1580.
91. van Nieuwenhoven EJ, Lefering R., Neugebauer E, Goris RJA. Clinical relevance of sepsis scores. *Langenbeck's Arch Surg* 1998; **383**:11-14.
92. Wagner DA, Schultz DS, Deen WM, Young VR, Tannenbaum SR. metabolic fate of an oral dose of ¹⁵N-labeled nitrate in humans: effect of diet supplementation with ascorbic acid. *Cancer Res* 1983; **43**:1921-1925.
93. Witthaut R, Werdan K. Ergebnisforschung am Beispiel der Sepsis. *Internist* 1996; **37**:1249-1259.
94. Wong HR, Carcillo JA, Burckart G, Shah N, Janosky JE. Increased serum nitrite and nitrate concentrations in children with the sepsis syndrome. *Crit Care Med* 1995; **23**:835-842.
95. Zink C. Pschyrembel. Klinisches Wörterbuch. Berlin und New York: Walter de Gruyter, 1992.

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Mitarbeitern der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie, Direktor : Professor Dr. med. B. E. Strauer, sowie den Mitarbeitern des Kardiologischen Labors der Heinrich-Heine-Universität, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben, danken.

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Professor Dr. med. M. Kelm für die Überlassung des Themas und seine stete Diskussionsbereitschaft sowie für die Möglichkeit, selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen,

Herrn Dr. med. T. Schumacher für die umfangreiche engagierte Betreuung des klinischen Teils der Arbeit sowie für kritische Diskussion und Hilfestellung beim Erheben der Patientendaten,

Herrn Dr. rer. nat. H. Preik-Steinhoff für die Unterstützung beim Erlernen der laborchemischen Methodik,

den Herren Priv.-Doz. Dr. med. M. Heintzen und. Priv.-Doz. Dr. med C. Perings für die Betreuung der Arbeit auf den Intensivstationen,

Herrn Dr. M. Heydthausen vom Hochschulrechenzentrum für die kompetente Beratung hinsichtlich der statistischen Auswertung der Daten und

Frau C. Ferfers für die Mitarbeit im Kardiologischen Labor sowie Dipl. Biol. K. Schulz für das kritische Korrekturlesen.

7. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christian Jürgen Buhn
Geburtsdatum	22.05.1972
Geburtsort	Friedberg (Hessen)
Familienstand	ledig

Allgemeine Schulbildung

1978 - 1982	Grundschule, Reichelsheim
1982 - 1991	Augustinergymnasium, Friedberg

Zivildienst

10.´91 - 12.´92	Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim
-----------------	-------------------------------

Medizinische Ausbildung

10.´92 - 09.´95	Justus-Liebig-Universität, Gießen
10.´95 - 03.´96	Humboldt-Universität, Berlin
04.´96 - 04.´99	Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
04.´98 - 04.´99	Praktisches Jahr im Evangelischen Krankenhaus, Düsseldorf

Seit August 2000 Tätigkeit als Arzt im Praktikum im Institut für Anästhesiologie, Intensiv- und Notfallmedizin, Städtische Kliniken Frankfurt a.M.-Höchst.

8. Zusammenfassung

Verlaufsbeobachtung des septischen Schocks unter Berücksichtigung des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges

vorgelegt von Christian Jürgen Buhn

Die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus dem L-Arginin-NO-Stoffwechselweg durch das Enzym NO-Synthase (NOS) spielt bei der Regulation des Gefäßtonus eine wesentliche Rolle. In der Sepsis führt eine Induktion der NOS in Makrophagen und Endothelzellen durch Endotoxine und Zytokine zu einer vermehrten Bildung von NO, die bei den septischen Patienten zu einem Verlust des Gefäßtonus führt. Die Folge dieses erhöhten NO-Umsatzes im septischen Schock ist eine katecholaminrefraktäre Vasodilatation und hyperdynamie Kreislaufphase. Da NO aufgrund seiner Instabilität nicht direkt nachweisbar ist, wurde in dieser Studie zur Beurteilung des Stoffwechselweges das stabile Endprodukt im Blut, das Nitrat, und das Intermediärprodukt L-Hydroxyarginin untersucht. Die Summe aus Nitrit- und Nitratkonzentration (Gesamtstickoxide im Blut) wurde bei Patienten einer internistischen Intensivstation mittels Spektrophotometrie gemessen. Ziel dieser Arbeit war es zu beurteilen, ob das Endprodukt Nitrat eine sepsis-assoziierte Erhöhung des NO-Umsatzes anzeigen kann und inwieweit dieser Parameter eine Änderung der septischen Kreislauftsituation abbildet. Zusätzlich sollten mögliche Einflußfaktoren auf die Nitratkonzentration identifiziert werden. Zur Verlaufsbestimmung des Schweregrades der Sepsis wurde ein neuer Sepsis-Score entwickelt, mit dessen Hilfe die Bedeutung von Nitrat als Diagnose- und Verlaufsparemeter der Sepsis beurteilt werden konnte. Die vorliegenden Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen: 1. Der für ein internistisches Patientenkollektiv entwickelte Sepsis-Score ermöglicht die Beurteilung des Schweregrades der septischen Kreislauftsituation. 2. Durch den Einsatz einer Nierenersatztherapie (CVVH) und die Umstellung von oraler auf parenterale Ernährung wird die Konzentration der Gesamtstickoxide im Plasma signifikant erniedrigt. 3. Das Endprodukt des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges, das Nitrat, ist im Plasma bei Patienten im septischen Schock erhöht. 4. Der intraindividuelle Verlauf der Gesamtstickoxide im Plasma bildet die Änderung der Schwere des septischen Schocks ab. 5. Das spezifische Intermediärprodukt der Reaktion, L-Hydroxyarginin, das im Blut gesunder Menschen nicht auftritt, ist bei septischen Patienten nachweisbar und korreliert mit der Höhe der Gesamtstickoxide im Blut. Diese Ergebnisse sprechen für eine sepsis-assoziierte Induktion der NOS und einen erhöhten Umsatz des L-Arginin-NO-Stoffwechselweges beim Menschen im septischen Schock. Der individuelle Verlauf der Gesamtstickoxide im Plasma kann einen signifikanten diagnostischen Parameter zur Verlaufsbeobachtung des septischen Schocks darstellen, wenn die Ernährungsform und der Kreatininwert konstant gehalten werden. Eine einzeitige Bestimmung von Nitrat im Plasma hat dagegen eine unzureichende diagnostische Aussagekraft.

genehmigt:



(Prof. Dr. med. M. Kelm)

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich diese Doktorarbeit selbstständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen, Materialien und Hilfsmittel benutzt habe.

Die interventionellen Untersuchungen am Menschen wurden von Ärzten der Medizinischen Klinik B der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt.

Diese Arbeit wurde bisher weder teilweise noch vollständig an einer anderen Fakultät zur Erlangung eines wissenschaftlichen Grades vorgelegt.

Frankfurt a. M., Juni 2000