

Aus dem Medizinischen Zentrum für Operative Medizin

Institut für Theoretische Chirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. W. Lorenz (Emeritus)

des Fachbereiches Medizin der Philipps-Universität Marburg
und des Universitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

Hypertensive Ratten mit Antibiotika- und G-CSF Prophylaxe überleben
eine abdominale Sepsis besser als Dahl-Salz-sensitive und normotensive
Wistar Ratten in klinik-modellierenden randomisierten Studien (CMRTs)

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin

der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

Björn Tischer

aus Alzenau

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
am: 6. Oktober 2005

Gedruckt mit der Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: PD. Dr. rer. nat. A. Bauhofer

Korreferent: Prof. Dr. M. Max

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Bluthochdruck..... | 1 |
| 1.1.1 | SHR Ratten..... | 2 |
| 1.1.2 | Dahl Ratten..... | 4 |
| 1.1.3 | Blutdruckmessung..... | 6 |
| 1.2 | Pathophysiologie der Infektion..... | 8 |
| 1.2.1 | Anatomie und Physiologie des Peritoneums..... | 10 |
| 1.2.2 | Bakterielle Peritonitis..... | 11 |
| 1.2.3 | Komplikationen der Peritonitis: SIRS, Sepsis, MODS/MOV.... | 12 |
| 1.3 | Die Immunantwort..... | 13 |
| 1.3.2 | Die bakterielle Infektion: Pathogenese und Pathophysiologie..... | 13 |
| 1.3.3 | Zelluläre Immunantwort..... | 14 |
| 1.3.4 | Humorale Immunantwort..... | 17 |
| 1.3.5 | Immunglobuline..... | 17 |
| 1.3.6 | Komplement-System..... | 18 |
| 1.3.7 | Weitere humorale Effektorsysteme..... | 19 |
| 1.3.8 | Interleukine/Zytokine..... | 20 |
| 1.3.9 | Chemokine..... | 27 |
| 1.4 | Hämatopoetische Wachstumsfaktoren..... | 29 |
| 1.4.1 | GM-CSF..... | 30 |
| 1.4.2 | G-CSF..... | 30 |

| | | |
|-------|---|----|
| 1.4.3 | G-CSF Dosis und Applikationsschemata..... | 31 |
| 1.4.4 | G-CSF Anwendungen | 32 |
| 1.4.5 | G-CSF bei Peritonitis und Sepsis | 33 |
| 1.5 | Sepsis-Therapie bisher und neue Ansätze | 35 |
| 1.6 | Experimentelle Tiermodelle zur Sepsis..... | 39 |
| 1.6.1 | CMRT (Klinik modellierende randomisierende Studien) | 40 |
| 2 | Ziel dieser Arbeit | 43 |
| 3 | Material und Methoden | 44 |
| 3.1 | Studienaufbau..... | 44 |
| 3.2 | Vorversuche..... | 45 |
| 3.3 | Hauptversuche..... | 46 |
| 3.4 | Tiere und Material | 47 |
| 3.4.1 | Versuchstiere | 47 |
| 3.4.2 | Stuhlsuspension | 48 |
| 3.4.3 | Erregerspektrum..... | 49 |
| 3.4.4 | Antibiotika..... | 49 |
| 3.4.5 | Blutdruckmessung..... | 49 |
| 3.5 | Versuchsablauf | 51 |
| 3.5.1 | Präoperativ | 51 |
| 3.5.2 | Operation..... | 53 |
| 3.5.3 | Postoperativ | 53 |
| 3.6 | Auswertung der Zytokine | 54 |
| 3.6.1 | Systemische Zytokine/ELISA Technik | 54 |
| 3.6.2 | Lokale Zytokinexpression | 54 |
| 3.6.3 | PCR..... | 55 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.7 | Statistische Analyse | 56 |
| 3.7.1 | Fallzahlberechnung..... | 56 |
| 3.7.2 | Auswertung | 57 |
| 4 | Ergebnisse der Tierversuche..... | 58 |
| 4.1 | Ergebnisse der Vorversuche | 58 |
| 4.1.1 | Stuhl-Dosis Wirkungsdiagramm..... | 58 |
| 4.1.2 | Wistar und SHR Ratten im SMRT Modell | 59 |
| 4.2 | Ergebnisse der Hauptversuche | 60 |
| 4.2.1 | Mortalitätsverlauf..... | 60 |
| 4.2.2 | Systemische Zytokinspiegel..... | 63 |
| 4.2.3 | Zytokinexpression in der Leber bei Wistar, SHR und Dahl Ratten | 65 |
| 4.2.4 | Zytokinexpression bei SHR Ratten | 69 |
| 4.2.5 | Zytokinexpression von SHR und Wistar Ratten im Vergleich | 76 |
| 5 | Diskussion | 85 |
| 6 | Zusammenfassung | 99 |
| 7 | Abkürzungen | 101 |
| 8 | Literaturverzeichnis..... | 104 |
| 9 | Anhang | 131 |
| 9.1 | Curriculum vitae..... | 132 |
| 9.2 | Verzeichnis meiner akademischen Lehrer..... | 134 |
| 9.3 | Danksagung | 135 |
| 9.4 | Ehrenwörtliche Erklärung | 136 |

1 Einleitung

Auch heute noch stellt die Sepsis ein ernstzunehmendes Problem dar. In der Sepsis versterben 15% der Patienten, 20% mit schwerer Sepsis und 45% im septischen Schock. Dies sind allein für die Vereinigten Staaten 210.000 Todesfälle pro Jahr (Friedman *et al*, 1998; Wenzel, 2002).

Verschiedene Faktoren können jedoch zu einem erhöhten Risiko von perioperativen Komplikationen führen. Unter anderem wurden das Alter des Patienten, Diabetes mellitus, Übergewicht oder Unterernährung, Immunsuppression, eine lange OP-Dauer und prä- und intraoperativer Blutverlust als Risikofaktoren identifiziert (Chalita-Manzur & Hermsillo-Sandoval, 2001; Pavlidis *et al*, 2001). Auch der Bluthochdruck spielt eine Rolle für den Erwerb nosokomialer Infektionen z.B. in der Herzchirurgie (Gol *et al*, 1998) und bei Wundinfektionen nach operativen Eingriffen in der Allgemeinchirurgie (Martinez *et al*, 2000; Riou *et al*, 1992).

1.1 Bluthochdruck

Chronische Hypertension lässt sich in eine primäre und sekundäre Form unterteilen. Letztere ist mit ca. 5%-10% die wesentlich seltenere Form und lässt sich häufig durch eine bekannte Ursache erklären. Eine Aortenisthmusstenose, ein Phäochromozytom, ein primärer Hyperaldosteronismus, eine chronische Niereninsuffizienz oder eine Stenose der Nierenarterien sind nur einige Möglichkeiten für die Entwicklung eines Bluthochdrucks. Auch sympathische Überaktivität und diätetische Faktoren, wie z.B. Kochsalzzufuhr, werden als Ursache für einen Bluthochdruck beschrieben (Dzielak, 1991). Bei einem Großteil der Patienten mit erhöhten Blutdruckwerten (ca. 90% - 95%) wird die primäre, oder sog. essentielle Hypertonie diagnostiziert (Ganten, 1987). Eine kausale Ursache kann bisher nicht angegeben werden. Die eigentliche pathophysiologische Ursache der Hypertension ist sowohl bei den Ratten wie bei den Menschen immer noch weitgehend ungeklärt. In mehreren Studien in Familien, bei Zwillingen und adoptierten Kindern konnte eine genetische Ursache für den Bluthochdruck nachgewiesen werden (Ward, 1995). Gegenstand der

Forschung sind unter anderem genetische chromosomale Ursprungsorte, die einen Einfluss auf den Blutdruck haben könnten (Rapp, 2000). Bei Ratten wurden auf verschiedenen Chromosomen Orte entdeckt (QTL= quantitative trait loci), die für Unterschiede in der Entwicklung eines Bluthochdrucks verantwortlich scheinen (Garrett *et al*, 2000).

Die pathophysiologische Heterogenität des Menschen mit dem Symptom Bluthochdruck findet bei den Ratten in einer Vielzahl genetisch unterschiedlicher hypertensiver Stämme ihr Gegenstück. Für tierexperimentelle Untersuchungen zur Hypertension stehen eine Reihe unterschiedlicher Rattenstämme, die einen Bluthochdruck entwickeln, zur Auswahl: Schlaganfall prädisponierte Spontan-hypertensive Ratten (SHR-SP), Spontan-hypertensive Ratten (SHR), Dahl Salz-sensitive (DS), Lyon-hypertensive (LH), Milan-hypertensive (MHS), genetisch-hypertensive (GH) und Sabra-hypertensive Ratten (SBH) stellen nur eine Auswahl dar und haben meist einen entsprechenden Ursprungsstamm mit normalen Blutdruckwerten (Ganten, 1987; Rapp, 2000; Horie *et al*, 1986).

Zwei verschiedene Stämme zum Modell der Hypertension wurden in den vorliegenden Experimenten untersucht: Der Stamm der Spontanen Hypertensiven Ratte (SHR) als Modell der primären (essentiellen) Hypertonie und Dahl Salz-sensitive Ratten (DS) als Stellvertreter der sekundären (erworbenen) Hypertonie mit genetischer Prädisposition zum Bluthochdruck (Dickhout & Lee, 1998).

1.1.1 SHR Ratten

SHR Ratten gehen auf eine Züchtung von Prof. Okamoto und Aoki zurück mit dem Ziel, ein genetisch adäquates Tiermodell für die menschliche essentielle Hypertonie zu entwickeln (Okamoto & Aoki, 1963). Über geschwisterliche Paarung von Ratten mit erhöhtem Blutdruck ist es über mehrere Generationen schließlich gelungen, einen Stamm zu züchten, der mit einem systolischen Druck von 180 mmHg im Alter von 20 Wochen einen deutlichen, permanent erhöhten Blutdruck gegenüber Wistar Vergleichsratten aufweist (Udenfreid, 1976; Ganten, 1987).

SHR Ratten sind weitverbreitet als experimentelles Tiermodell zur Hypertension und zu Gefäßveränderungen (Udenfreid, 1976). Sie spielen in der Forschung bei hypertensiven Erkrankungen eine wichtige Rolle, da sie in vieler Hinsicht Ähnlichkeiten mit der primären Hypertension des Menschen haben (Dickhout & Lee, 1998). Von besonderem klinischen Interesse ist die Beobachtung, dass z.B. salzarme Diät und die meisten anti-hypertensiven Medikamente ähnlichen Einfluss auf den Blutdruck der Ratten wie beim Menschen zeigen. Dabei bietet die kürzere Lebenszeit der Ratten eine gute Gelegenheit, Entwicklung, Prävention, Komplikationen und Therapie der Hypertension an Tiermodellen zu studieren (Ganten, 1987).

Ab der fünften Lebenswoche entwickeln von den SHR Ratten 100% einen Hochdruck, der mit dem Alter zunimmt und bei erwachsenen Tieren häufig über 200 mmHg liegt (Mittelwerte \pm SD: männl.: 184 ± 17 mmHg, weibl.: 178 ± 14 mmHg, in der 10ten Woche) (Udenfreid, 1976). Die durchschnittliche Lebenszeit der SHR Tiere ist auf ca. 18 Monate im Vergleich zu ca. 24 Monaten bei normalen Wistar Ratten verkürzt. Grund dafür ist, dass die Ratten mit zunehmendem Hochdruck ähnliche systemische Komplikationen wie Menschen entwickeln. Zu den typischen hypertensiven Begleiterkrankungen zählen insbesondere zerebrale Komplikationen wie Hirninfarkt oder Blutungen, beschleunigte Arteriosklerose, Nierearteriosklerose mit renaler Insuffizienz und Herzerkrankungen. Linksventrikuläre Hypertrophie ist ein charakteristisches Merkmal der SHR Ratten und führt häufig zu einer kongestiven Herzinsuffizienz. Die Inzidenz der Myokardfibrose und -nekrose mit Herzinfarkten bei dem SHR Stamm ist deutlich erhöht. Hämodynamische Veränderungen im frühen Verlauf der Hochdruckentwicklung sind häufig durch ein erhöhtes kardiales Output bei noch normalem totalen peripheren Widerstand (TPR) gekennzeichnet. In dem späteren Stadium des manifesten Hochdrucks steigt hingegen der TPR, und das kardiale Output nimmt ein normales Niveau an (Udenfreid, 1976; Ganten, 1987).

Neben den hämodynamischen Erkrankungen wird ein Reihe weiterer Veränderungen auf neuro-immunologischer Ebene beschrieben. SHR Ratten

zeigen eine Hypalgesie gegenüber thermischen und elektrischen Reizen. Andererseits reagieren sie überempfindlich gegenüber Schmerz, wie in Modellen der mechanischen und zur entzündlichen Schmerzwahrnehmung (Injektion von Formalin und Zymosan) beobachtet werden konnte (Taylor *et al*, 2001; Sitsen & de Jong, 1983). Als Erklärungsmodell bei der Entstehung des Bluthochdrucks wird unter anderem auch eine Dysfunktion des Immunsystems herangezogen (Dzielak, 1992; Dzielak, 1991; Khraibi, 1991; Takeichi *et al*, 1980). Auf immunologischer Ebene wird bei den SHR Tieren eine Suppression der T-Zell Population (Fannon *et al*, 1992), eine Störung der T- und B-Zell Kooperation mit beeinträchtigter Immunglobulin Produktion und eine verminderte Wechselwirkung zwischen Leukozyten und den Endothelzellen beobachtet (Takeichi *et al*, 1980; McCurdy *et al*, 1992). Die eingeschränkte Interaktion zwischen den weißen Blutzellen und den Endothelzellen kann mit eine Ursache für einen geringeren Zell- und Mediator-gesteuerten Gewebeangriff und damit Grund einer erhöhten Endotoxin Resistenz sein (Tsuji-kawa *et al*, 2000). Eine erhöhte Überlebensrate der SHR Ratten wurde auch direkt in einem Endotoxin Schock Modell nachgewiesen, wobei das Überleben der Tiere unabhängig von deren Bluthochdruck war. Mit der erhöhten Überlebensrate korreliert eine Verringerung der systemischen, proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α (Bernard *et al*, 1998).

1.1.2 Dahl Ratten

Dahl Salz-sensitive (DS) Ratten wurden von *L. Dahl* (New York, USA) aus einem normotensiven Sprague-Dawley Stamm entwickelt (Rapp & Dene, 1985). Im Unterschied zu den SHR Ratten wird die Ausprägung des Bluthochdrucks bei den Dahl Salz-sensitiven Ratten nicht ausschließlich durch eine genetische Prädisposition, sondern auch durch äußere Einflüsse mitbestimmt. Die DS-Ratten entwickelten gegenüber salz-resistenten Dahl-Ratten (DR) nach ca. 5-6 Wochen salzreicher Diät neben einer schweren arteriellen Hypertonie eine Herzinsuffizienz mit Myokardhypertrophie, Lungenstauung, erhöhten linksventrikulären-enddiastolischen Drücken (LVEDP) und gesteigerten NA-Plasmaspiegeln. Die Salzzufuhr kann über die Kochsalz (NaCl) Konzentration im Trinkwasser der Tiere

gesteuert werden, wobei die NaCl-Konzentration mit der Ausprägung der Hypertonie korreliert (Miura *et al*, 1999). Ähnlich wie die DS Ratten gibt es bei den Menschen bestimmte Patienten, deren Blutdruck empfindlicher auf salzhaltige Nahrung (sog. Salz-sensitive Patienten) reagieren. Die bisherige Meinung, dass die Bevölkerung und definierte Patientengruppen durch eine salzarme Diät profitieren, konnte in einer soeben publizierten Metaanalyse nicht bestätigt werden. Lediglich der Verbrauch antihypertensiver Medikamente konnte reduziert werden (Hooper *et al*, 2002).

Die Ursache auf die erhöhte Salzempfindlichkeit ist bisher noch nicht definitiv aufgeklärt. In der Literatur werden verschiedene Veränderungen in der Regulation des Blutdruckes bei den DS Ratten beschrieben. Eine Ursache wird in einem genetischen Defekt des ANP-Systems (atriales natriuretisches Peptid) vermutet, was über einen erhöhten Plasma ANP Spiegel zu einer Volumenexpansion führt. Im Gegensatz zu den DS Ratten wird in dem DS Stamm im Herzvorhof ab dem 30. Lebensstag vermehrt ANP auf mRNA Ebene exprimiert, mit zunehmendem Hochdruck reagieren die Nieren hyperresponsiv auf ANP und der systemische Spiegel von ANP im Plasma steigt bei erhöhter Salzzufuhr an (Snajdar *et al*, 1986). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die Entwicklung des Hochdruckes bei DS im Vergleich zu DR Ratten wird in dem unterschiedlichen Ansprechen der renalen und extrarenalen Gefäßmuskulatur auf unterschiedliche hormonale Vasodilatoren und Vasokonstriktoren wie Nitrate, ANP, Angiotensin-2 und Endothelin-1 gesucht (Simchon *et al*, 1992). Daneben scheint auch ein gesteigerter Sympathikotonus mit erhöhter Noradrenalin-freisetzung und ein höherer Vasopressinspiegel über einen erhöhten peripheren Gefäßwiderstand zur Ausprägung der arteriellen Hypertension beizutragen (Bayorh *et al*, 1998).

Bei der Vielzahl von Mechanismen, die zum salz-sensitiven Hochdruck der DS Ratten beitragen, spielt das Stickstoffmonoxid (NO) eine Hauptrolle. Das NO verhindert bei den DR Ratten die Ausprägung der salz-sensitiven Hypertension, während bei den DS Ratten eine verminderte Produktion von NO besonders durch die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) eine Ursache für den erhöhten Blutdruck darstellt (Manning, Jr. *et al*, 2001; Tan *et al*, 1999).

Auch auf immunologischer Ebene kann eine unterschiedliche Reaktion der DS Ratten gegenüber den SHR Tieren beobachtet werden. Interleukin-2 (IL-2) führt bei den DS Ratten im Vergleich zu SHR Ratten zu einer gesteigerten glomerulären Filtrationsrate mit einer konsekutiven Senkung des Hochdruckes und kann zu einer deutlichen Verbesserung der glomerulären Nierenschädigung beitragen (Ishimitsu *et al*, 1994).

1.1.3 Blutdruckmessung

Zur Blutdruckmessung bei Ratten kommen grundsätzlich zwei verschiedene Methoden zur Auswahl und Anwendung: zum einen die **direkte**, invasive Methode, die über eine Kanüle in einer großen Arterie kontinuierlich den diastolischen und systolischen Druck sehr genau messen kann. Leider erfordert diese Messung einen aufwendigen operativen Eingriff und eignet sich daher meist nicht für eine größere Anzahl von Versuchstieren oder zur Verlaufsbeobachtung. Dies ist jedoch durch die Verwendung von Blutdrucktransducern mittels telemetrischen Methoden möglich (Bauhofer *et al*, 2002b). Die **indirekte** Variante benötigt eine Manschette und einen Sensor (z.B. plethysmographisch, beschrieben von *Byrom und Williams* (Byrom & Wilson, 1938), oder über den Puls) und kommt ohne operativen Eingriff zur Anwendung. Bei Ratten bietet sich für die Messung der leicht zugängliche Schwanz an. Dieses indirekte Verfahren lässt sich sowohl bei einer größeren Anzahl von Tieren als auch zur Verlaufsbeobachtung durchführen (Udenfreid, 1976). Diese sogenannte Tail-Cuff Methode lässt sich sowohl bei wachen als auch bei anästhesierten Tieren anwenden, allerdings ist zu beachten, dass die Bestimmung bei wachen Tieren öfters nicht gelingt und zu falschen Werten führt, da es zu einer Konstriktion der Schwanzgefäße kommt. Andererseits darf die Narkose nicht zu tief sein, da es sonst zu einem Blutdruckabfall kommen kann. Eine deutlich bessere Korrelation zwischen direkter und indirekter Messung konnte bei anästhesierten Ratten gefunden werden (Bunag *et al*, 1971). Auch wenn die Ratten erwärmt wurden, um eine höhere Puls-Volumen-Oszillation zu erhalten, konnte bei der Druckmessung mit einem photoelektrischen Sensor eine gute Übereinstimmung mit der direkten Blutdruckbestimmung gefun-

den werden (Sakamaki *et al*, 1987). Eine andere Art der indirekten Messung geschieht über die Bein-Manschetten Methode mit Messung des Blutflusses in der Pfote über einen photoelektrischen Scanner.

1.2 Pathophysiologie der Infektion

Durch das Auftreten von Mikroorganismen in ansonsten sterilem Gewebe kommt es zu einer Infektion, die von einer Entzündung begleitet wird. Bei einer Entzündungsreaktion kommt es zu einer komplexen Abwehrreaktion des Organismus auf verschiedene gewebsschädigende Reize, die nicht nur durch eine Infektion, sondern auch durch allergische, physikalische (z.B. Verbrennungen), chemische (z.B. Säuren, Laugen) Art sein können. Das schädigende Agens löst die Entzündungsreaktion nicht nur unmittelbar aus, sondern wirkt auch über Vermittlersubstanzen, sogenannte Mediatoren, die von den geschädigten Zellen produziert werden. Einige bedeutsame Mediatoren, die bei einer Infektion freigesetzt werden, sind:

Amine (z.B. das vasodilatierende Histamin), Kinine (z.B. Bradykinin), Proteasen (z.B. Kallikrein), Eicosanoide (wie Leukotriene, Thromboxan, Prostaglandine), Zytokine (wie z.B. Tumornekrose Faktor, Interleukinen (IL-1 bis IL-30) (Ibelgauft, 1999; Fickenscher *et al*, 2002) und Chemokine (MIP-1 und MIP-2) (Baxter, 1997; Bone, 1991b). Daneben existieren viele weitere Mediatoren, die im komplexen System des Wirtes bei einer Entzündung von den verschiedensten Zellen freigesetzt werden (Baue, 1992).

Kann die Infektion nicht lokal kontrolliert werden, kommt es zu einer systemischen Ausbreitung bis zum klinischen Bild der Sepsis (Parrillo, 1993). Heute stellt bei der Hälfte der Patienten mit einer Sepsis die Ursache eine gramnegative Bakteriämie dar (Baxter, 1997; Glauser *et al*, 1991; Bone, 1991a). In der pathophysiologischen Kausalkette spielt das beim Zerfall der gramnegativen Erreger freigesetzte Zellwandmolekül Lipopolysaccharid (LPS, oder auch Endotoxin genannt) eine zentrale Rolle (Heeg *et al*, 1995; Glauser *et al*, 1991). Eine Sepsis kann aber auch durch andere mikrobiellen Toxine, z.B. Exotoxine, hervorgerufen werden. Deshalb können auch grampositive Bakterien, Pilze und möglicherweise auch Viren und Parasiten eine Sepsis verursachen (Stadler *et al*, 1995; Baxter, 1997). Im Erregerspektrum bekommen die grampositiven Organismen ein zunehmend größeres Gewicht (Friedman *et al*, 1998). Ähnlich wie bei den

gramnegativen Bakterien gibt es einen Mechanismus, bei dem aus der Zellwand von grampositiven Erregern Module freigesetzt werden. Der wichtigste ist die Lipoteichonsäure sowie das Peptidoglykan (Srisakandian & Cohen, 1999; Wang *et al*, 2003). Diese Module stimulieren die Makrophagen zur Zytokinfreisetzung. Daneben sind Exotoxine, z.B. von Staphylokokken, auch als Superantigene bezeichnet, wichtig bei der Aktivierung von T-Lymphozyten (Heeg *et al*, 1995; Stadler *et al*, 1995).

Im letzten Jahrzehnt hat das Verständnis des Sepsisprozesses andauernde Fortschritte in Bezug auf die Rolle der Zytokine und anderer Entzündungsmediatoren gemacht (Baue, 1992; Bone, 1995). Dabei wird deutlich, dass nicht nur die direkte, unmittelbar toxische Wirkung eines Keims, sondern insbesondere auch die Entzündungsreaktion des Wirts selbst auf einen Keim (bzw. dessen Bestandteile) die pathophysiologische Kausalkette akuter Infektionserkrankungen erklärt (Heeg *et al*, 1995; Bone, 1991b; Stadler *et al*, 1995; Wittmann *et al*, 1996).

Die American College of Chest Physicians and Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) Konsensus Konferenz definierte 1992 die Sepsis als systemische Entzündungsreaktion (Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS)), verursacht durch eine Infektion. Der Begriff SIRS beschreibt den klinischen Ausdruck für das komplexe Zusammenspiel intrinsischer Mediatoren der Akut Phase Reaktion sowohl bei infektiösen als auch nicht-infektiösen Verletzungen (Trauma, Verbrennungen, Pankreatitis, Operationen) und kennzeichnet folglich einen Prozess unabhängig von seiner Ursache (Bone, 1995).

Eine **SIRS** liegt vor, wenn 2 oder mehr der 4 Kriterien erfüllt sind:

- 1) **Temperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$**
- 2) **Herzfrequenz >90 Schläge/min**
- 3) **Atemfrequenz >20 Atemzüge/min oder $\text{PaCO}_2 <32$ mmHG**
- 4) **Leukozyten $>12.000/\text{mm}^3$, $<4.000/\text{mm}^3$, oder $>10\%$ unreife Formen**

Eine adäquate Immunantwort des Organismus ist aber unabdingbare Voraussetzung für die Eradikation der eingedrungenen Erreger und für die komplikationsarme Genesung des Patienten. Die Reaktion des Körpers sollte ausreichend, aber nicht überschießend sein, denn eine unkontrollierte Immunreaktion bedeutet ebenso eine Gefahr für den Körper (Baue, 1992; Wittmann *et al*, 1996).

1.2.1 Anatomie und Physiologie des Peritoneums

Nach Eindringen von Erregern in die Bauchhöhle kommt dem Bauchfell als erster Kontaktstelle eine bedeutende Funktion als Schutzbarriere zu. Das *Peritoneum parietale* kleidet als seröse Haut die Wand der Bauch- und Beckenhöhle aus und überzieht als *Peritoneum viszerale* einen großen Teil der Bauch- und Beckenorgane. Das Peritonealmesothel besteht aus einem einschichtigen Plattenepithel und einer subepithelialen kollagenen Bindegewebslage (Propria) und bildet eine zumeist 0,3-1,5 µm dicke zelluläre Barriere zwischen Organen und Bauchhöhle (Benninghof, 1994). Poren und Interzellularspalten zwischen den Zellen verleihen dem Mesothel nur eine geringe Barrierenfunktion, erleichtern aber dafür die Diffusion von Wasser und Elektrolyten und ermöglichen somit die Flüssigkeitsbalance und den Stoffaustausch (Di Paolo & Sacchi, 1990). Über sog. Stomata (Einmündungsöffnungen) gibt es eine direkte Verbindung zu den Lymphkapillaren, und über sog. „Milchflecken“ (submesotheliale Ansammlungen von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen, durchsetzt von einem dichten Kapillarnetz, arteriovenösen Anastomosen und größeren, interzellulären Mesothelspalten) kann die Peritonealflüssigkeit in direkten Kontakt mit immunkompetenten Zellen treten. Ortsständige und mobile Abwehrzellen in der Peritonealhöhle spielen bei der Bekämpfung einer bakteriellen Infektion eine wichtige Rolle (Broche & Tellado, 2001; Skau *et al*, 1986; Dunn *et al*, 1984).

1.2.2 Bakterielle Peritonitis

Die große Kontaktfläche mit den Darmschlingen macht das Peritoneum häufig zum Manifestationsort von entzündlichen Läsionen, die als Peritonitis bezeichnet werden (akut oder chronisch, lokal oder diffus ausgebreitet). Sehr häufig ist sie infektiös (bakteriell) bedingt (95%), selten chemisch-toxisch, oder durch Strahlen hervorgerufen. Eine intraabdominelle Infektion bezeichnet eine durch Bakterien oder deren Toxine hervorgerufenen Peritonitis (Wittmann *et al*, 1996). Eine vereinfachte Einteilung zur Klassifizierung der (bakteriellen) Peritonitis gibt Wittmann *et al*. Er unterscheidet zwischen den relativ seltenen Formen wie der primären Peritonitis, die gut auf medikamentöse Therapie anspricht, der häufig auftretenden sekundären Peritonitis, die eine chirurgische Intervention verlangt, und der tertiären Peritonitis, die auf keine Therapie anspricht (Wittmann *et al*, 1996).

Die Oberfläche des Peritoneums beträgt beim erwachsenen Menschen annähernd 2 m², während bei der Ratte Werte von 0,06 m² beschrieben werden (Di Paolo & Sacchi, 1990). Gelangen Bakterien in die Bauchhöhle, z.B. bei Durchbruch im Rahmen einer Appendizitis, bei Gallenblasenperforation oder bei Nahtinsuffizienz nach OP, dann kann eine Ausbreitung von Bakterien über die gesamte Peritonealhöhle erfolgen. Dem versucht der Organismus, auf verschiedenen Wegen und in einem zeitlich geregelten Ablauf entgegenzuwirken (Skau *et al*, 1986): Zuerst erfolgt eine schnelle Absorption von Bakterien und Flüssigkeit durch die Stomata ins Lymphsystem und in die Zirkulation (ca. 6 h). Zweitens findet eine Zerstörung der Bakterien durch den Komplementmechanismus und chemotaktisch angelockte Phagozyten sowie lokal ansässige Makrophagen statt. Die Freisetzung von Mediatoren wie Histamin und Prostaglandinen führen zu einer Vasodilatation mit nachfolgender Exsudation einer komplement-, immunglobulin- und fibrinreichen Flüssigkeit (und Gerinnungsfaktoren). Diese sind entscheidend bei dem dritten Abwehrmechanismus beteiligt, der lokalen Adhäsion und Abkapselung des Entzündungsherdes durch Fibrinverklebungen des Peritoneums der Darmschlingen, der Bauchwand und des Omentum majus (Platell *et al*, 2000; Skau *et al*, 1986; Broche &

Tellado, 2001; Dunn *et al*, 1984). Reichen diese physiologischen Eindämmungsversuche nicht aus, so kommt es zur generalisierten Peritonitis, welche einen lebensbedrohlichen Zustand darstellt, weil über eine große resorbierende Oberfläche der Bauchhöhle große Mengen von Bakterien und deren Toxine in das Blut gelangen, eine Bakteriämie auslösen, die schwere systemische Auswirkungen hat.

1.2.3 Komplikationen der Peritonitis: SIRS, Sepsis, MODS/MOV

Bei guter Abwehrlage des Organismus und bei einer geringen Zahl und geringer Virulenz der Erreger können die in den Blutkreislauf gelangten Bakterien symptomlos eliminiert werden. Ist der Patient jedoch in einer schlechten Verfassung, seine Abwehrlage schwach und/oder die Zahl und Virulenz der Erreger hoch, kann sich eine Bakteriämie und daraus eine lebensbedrohliche Sepsis, oder gar ein septischer Schock entwickeln (Siewert, 1998; Glauser *et al*, 1991; Berger & Berger, 1991).

Der septische Schock ist charakterisiert durch einen Zustand der Sepsis mit Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution. Damit einhergehen können Lactatacidose, Oligurie und psychische Veränderungen.

Wichtige Erreger, die eine Sepsis verursachen, sind heutzutage neben den gramnegativen ebenso die grampositiven Bakterien mit deren jeweiligen Zellwandbestandteilen (Bone, 1994; Bochud & Calandra, 2003; Pavlidis, 2003). Diese erzeugen eine Aktivierung der körpereigenen Abwehrmechanismen und dies kann sich bei hoher Konzentration negativ auf den Organismus auswirken. Über Fieber, Gerinnungsstörungen, Mikrozirkulationsstörungen, Schock und Organversagen kann es zum fulminanten und häufig letalen Bild des septischen Schocks kommen. Entscheidende Ursache für die Symptome und die Entwicklung der Sepsis stellen die aus verschiedensten Körperzellen freigesetzten Zytokine dar (Baxter, 1997; Friedman *et al*, 1998; Pavlidis, 2003).

Da es sich bei dem Erkrankungsbild der Sepsis um ein dynamisches Geschehen handelt, ist der Übergang von einer Sepsis bis hin zum septischen Schock fließend. Klinisch äußert sich die Verschlechterung des Zu-

standes in einer deutlichen Zunahme der Mortalitätsrate (Woltmann *et al*, 1998). Im Verlauf des systemischen infektiösen Geschehens steht oft die Funktionsstörung von Organen (Lunge, Niere, ZNS) im Mittelpunkt. Wenn mehr als ein Organ involviert ist, spricht man vom Multi Organ Dysfunction Syndrome (MODS) (Nyström, 1998). Die letzte Stufe des Prozesses geht mit dem völligen Funktionsverlust von zwei oder mehreren vitalen Organsystemen einher und wird als Multiorganversagen (MOV) bezeichnet. In dieser Situation wird versucht, die Homöostase des Organismus durch intensivmedizinische Intervention aufrechtzuhalten (Zimmerman *et al*, 1996). Der Kombination von chirurgischem Eingriff (Herdsanierung) und antimikrobieller Chemotherapie kommt eine grundlegende Bedeutung in der erfolgreichen Behandlung der intraabdominalen Infektion zu. Das Ziel ist die Eradikation des septischen Fokus und die Elimination der potentiell pathogenen Keime (Nyström *et al*, 1990).

1.3 Die Immunantwort

Eine Hauptaufgabe des Immunsystems ist es, den Körper vor einer Vielzahl möglicher pathogener Keime zu schützen, damit diese nicht in den Körper *eindringen*, das Wirtsgewebe *kolonialisieren*, sich dort *vermehren* und damit eine Infektion auslösen können (Peter & Pichler, 1991). Das Immunsystem besteht aus zellulären und humoralen Komponenten, die für die Immunantwort notwendig sind. Das gemeinsame und koordinierte Zusammenspiel der Zellen und löslichen Bestandteile nennt man Immunantwort. Die Reaktion des Körpers mit seiner Fähigkeit zur enormen Steigerung der Abwehrmechanismen äußert sich häufig mit den fünf klassischen Entzündungszeichen: Rubor, Calor, Tumor, Dolor, Functio laesa (Greiling & Gressner, 1995; Peter & Pichler, 1991; Abbas *et al*, 1996; Baue, 1992).

1.3.1 Die bakterielle Infektion: Pathogenese und Pathophysiologie

Durchdringt ein Erreger die normalen physiologischen Barrieren, so kommt es zu einem ersten Kontakt mit den unspezifischen Abwehrmechanismen. Bakterien werden von den Makrophagen und Granulozyten phagozytiert, lysosomal verdaut und deren Abbauprodukte (Antigene) auf ihrer Oberfläche über sog. Haupthistokompatibilitäts-Moleküle der Klasse

II (MHC II) präsentiert. LPS bzw. Endotoxin vermag Makrophagen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-6 und Chemokinen zu stimulieren, welche zu einer Entzündungsreaktion führen. Erst nach Antigen Kontakt werden die sonst ruhenden spezifischen Immunzellen funktionell aktiviert. Dabei bindet das Antigen an die spezifischen Rezeptoren der B- oder T-Lymphozyten. Die Antigene werden von den B-Lymphozyten über ihre auf der Oberfläche exprimierten Immunglobuline (Ig) erkannt, während die T-Lymphozyten für die Bindung besondere T-Zell-Rezeptoren (TCR) besitzen. Je nach Stärke und Zusammensetzung der Signale kann die Aktivierung nun zur Zytokinproduktion, zur Proliferation oder zur Differenzierung der Zelle führen. Die aktivierten T-Helferzellen setzen nun ihrerseits Zytokine frei, welche die Ausreifung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen fördern. Diese werden zur Sekretion der spezifischen Immunglobuline angeregt und führen zur Aktivierung weiterer humoraler Abwehrmechanismen (Hershman *et al*, 1990; Kullberg & van der Meer, 1996).

1.3.2 Zelluläre Immunantwort

Bei der zellulären Immunantwort wird zwischen einer Antigen-unspezifischen und einer Antigen-spezifischen Immunabwehr unterschieden. Die größte Population der unspezifischen zellulären Abwehr stellen die Zellen des mononukleär-phagozytischen Systems dar. Alle Zellen des mononukleären Phagozytensystems stammen vom Knochenmark ab und können nach ihrer Reifung und Aktivierung verschiedene morphologische Formen annehmen. Die Phagozytose und Verdauung mikrobieller Erreger erfolgt im wesentlichen durch zwei Zelltypen, die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und die Monozyten/Makrophagen (Kullberg & van der Meer, 1996; Hershman *et al*, 1990).

Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten - auch polymorph-mononukleare Neutrophile (PMN) genannt - sind im menschlichen Körper die größte Po-

pulation der phagozytierenden Zellen. Sie nehmen an der Effektorphase der Immunantwort eine zentrale Rolle ein und stellen eine wichtige, kritische Komponente der Abwehr gegen eine Infektion dar. Die Neutrophilen sind normalerweise im gesunden Gewebe nicht anzutreffen, reagieren aber rasch auf chemotaktische Stimuli. Nach der Phagozytose und intrazellulären Verdauung von Erregern kommt es zur Freisetzung von lysosomalen Enzymen, Sauerstoffradikalen und Entzündungsmediatoren (Kullberg & van der Meer, 1996; Nussler *et al*, 1999). Granulozyten können durch Zytokine aktiviert werden und nehmen ihrerseits durch Sekretion von verschiedenen Mediatoren am Entzündungsprozess teil. IL-1 β z.B. vermag die Apoptose der Neutrophilen herunterzuregulieren und leistet damit einen Beitrag zu einer verstärkten Entzündungsreaktion (Grutkoski *et al*, 1999). Ihre Lebenszeit beträgt im Gegensatz zu Monozyten/Makrophagen nur wenige Tage, weshalb sie kontinuierlich von den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks nachgebildet werden müssen (Kullberg & van der Meer, 1996).

Monozyten/Makrophagen

Ebenso wie die Granulozyten spielen die von den Makrophagen abstammenden Monozyten eine Schlüsselrolle bei der Infektabwehr. Monozyten reagieren äußerst sensitiv auf LPS, welches mit einem LPS-binding protein (LBP) aus dem Plasma über den CD14 Oberflächenrezeptor der Monozyten bindet. Stimulation durch LPS aktiviert in den Monozyten eine Reihe von Signalwegen, die zu einer verstärkten Expression von verschiedenen inflammatorischen Zytokinen führen (Guha & Mackmann, 2001). Zu den wichtigsten Funktionen zählen Phagozytose, Zytotoxizität, Kooperation mit Lymphozyten durch Antigenpräsentation und Sekretion verschiedenster biologisch aktiver Produkte wie PGE₂, IL-1, IL-6, IL-8, TGF- β und TNF- α (Faist *et al*, 1994). Voraussetzung ist die Erkennung körperfremden Materials und eine rasche Ansammlung an einem Entzündungsherd durch Chemotaxis (Volk *et al*, 2000). Je nach Aktivierung können Monozyten verschiedene Zytokine produzieren, die wiederum auf andere Zellen im Immunsystem im Sinne einer Up-oder Down-Regulation

wirken. Durch die Antigenpräsentation über das MHC II Molekül wird die Antigen-spezifische T-Zell Immunantwort ausgelöst (Haupt *et al*, 1998; Faist *et al*, 1988).

Die Phagozytose durch polymorphkernige neutrophile Granulozyten und Monozyten ist einer der wichtigsten Abwehrmechanismen des Körpers gegen bakterielle Infektionen (Hershman *et al*, 1990). Der Phagozytoseprozess kann in mehrere Phasen eingeteilt werden: Chemotaxis (Wanderung der Phagozyten zur Entzündungsstelle), Bindung mittels Rezeptoren an Bakterien und deren Abbauprodukte (Adhäsion), Aufnahme (Phagozytose) und intrazelluläre Lyse durch Radikale und Proteasen (Greiling & Gressner, 1995).

Eine veränderte Phagozytoseleistung kann bei einer Vielzahl von Erkrankungen sowie bei Einnahme von verschiedenen Medikamenten auftreten. Die Defekte können mit einer Funktionsstörung der neutrophilen Granulozyten zusammenhängen oder auf einer Beeinträchtigung der Opsonierung mit Immunglobulin oder Komplement beruhen. Auch angeborene Funktionsdefekte sind bekannt. Diese Defekte können aufgrund einer Beeinträchtigung der Phagozytose von neutrophilen Granulozyten zu einer erhöhten Infektanfälligkeit führen. Erworbene Defekte, die von einer veränderten Phagozytoseleistung begleitet sind, werden bei Sepsis, Nierenversagen und schweren Infektionen beobachtet. Desweiteren wurde eine reduzierte Phagozytoseleistung bei immunsupprimierten Patienten (Verbrennungsoptionen, AIDS-Patienten, Diabetikern), aber auch bei Neugeborenen und älteren Menschen beobachtet.

Lymphozyten

Vertreter des spezifischen zellulären Abwehrsystems sind die Lymphozyten. Sie sind für die spezifische Immunantwort des Körpers zuständig, da sie antigene Determinanten spezifischer erkennen und unterscheiden können. Sie bestehen aus verschiedenen Klassen und unterscheiden sich in ihrer Funktion und ihren Proteinprodukten trotz morphologischer Ähnlichkeit. B-Lymphozyten sind die einzigen Zellen, die Antikörper produzieren

können. Bei den T-Lymphozyten lassen sich T-Helfer (TH₁, TH₂) von den zytotoxischen (CTL) Zellen unterscheiden. Eine dritte Gruppe bilden die natürlichen Killer-(NK) Zellen. Die Anregung zur Proliferation und Differenzierung von B-Zellen ist eine wichtige Aufgabe der TH-Zelle. Die Aktivierung der Makrophagen wird sowohl durch die TH- als auch die CTL-Zellen geleistet und für die Lyse virusinfizierter Zellen stehen die NK- wie auch die CTL-Zellen bereit (Gemsa *et al*, 1991; Abbas *et al*, 1996; Peter & Pichler, 1991).

1.3.3 Humorale Immunantwort

Die humorale Immunität wird durch Moleküle vermittelt, die im Blut zirkulieren und für die spezifische Erkennung sowie die Elimination von Antigenen verantwortlich sind. Emil von Behring (deutscher Serologe, 1854-1917) war 1890 einer der ersten, der die humorale Immunität experimentell nachweisen konnte und im Anschluß daran das Diphtherie-Antitoxin entwickelt hat. Während Paul Ehrlich (deutscher Serologe, 1854-1915) um 1900 die theoretischen Grundlagen der Spezifität von Antigen-Antikörper-Reaktion erarbeitete, leistete Karl Landsteiner (österreichischer Bakteriologe, 1868-1943) einen großen Beitrag in der experimentellen Beweis für die Existenz der Antikörpermoleküle.

1.3.4 Immunglobuline

Immunglobuline (**Ig**) sind Glykoproteine mit gemeinsamer Grundstruktur, die nach Kontakt des Organismus mit einem Antigen von B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen gebildet werden. Als Teil der spezifischen Immunantwort zirkulieren sie als sog. **Antikörper (AK)** im Serum, in Gewebsflüssigkeiten und in Körpersekreten. Sie kommen sowohl als membranständige und frei zirkulierende Formen vor und lassen sich in verschiedene Klassen einteilen: IgA, IgE, IgD, IgG und IgM (Greiling & Gressner, 1995).

Die wichtigsten funktionellen Eigenschaften der Antikörper sind:

1. Bindung von Antigenen
2. Aktivierung des Komplementsystems
3. Aktivierung von Zellen der spezifischen und unspezifischen Abwehr.

Hat sich der Antikörper an ein Antigen geheftet, löst er eine Kette biologischer Reaktionen aus, die mit der Zerstörung des Eindringlings endet.

1.3.5 Komplement-System

Als „Komplement“ werden hitzlabile Komponenten benannt, welche die lytische Funktionen der Antikörper unterstützen oder „komplementieren“. Es handelt sich hierbei um ein System funktionell gekoppelter Proteine, die in streng geregelter Weise untereinander reagieren und für viele Effektorfunktionen der humoralen Immunität und der Entzündung verantwortlich sind (Abbas *et al*, 1996). Das Komplementsystem ist ein multifaktorielles, aus über 20 Proteinen bestehendes Kaskadensystem, das als eigenständiges humorales System einen unersetzbaren Anteil bei der Infektabwehr besitzt. Es ist Bindeglied zwischen humoralen und zellulären Reaktionskette und hat die Lyse fremder Zellen als Hauptaufgabe. Hepatozyten und Monozyten/Makrophagen synthetisieren die meisten Komplementproteine und sorgen so für den nötigen Bestand im Kreislauf sowie am Ort entzündlicher Reaktionen. Die zentrale Komponente des Komplementsystems ist ein C3 genanntes Protein, das für die Effektorfunktion von kritischer Bedeutung ist und auf **drei** unterschiedlichen Wegen aktiviert werden kann. Beim **klassischen** Weg erfolgt die Aktivierung über die Bindung der ersten Komponente C1 an die Fc-Anteile der IgG oder IgM Antikörper des Antigen-Antikörper-Komplexes. Die Komplementaktivierung auf dem **alternativen** Weg führt in Abwesenheit von Antikörpern durch mikrobielle Oberflächen-Polysaccharide zur Bildung von C3-Konvertase, welche die Proteolyse von C3 katalysiert (Peter & Pichler, 1991; Gemsa *et al*, 1991). In der gemeinsamen Endstrecke entstehen weitere aktive Polypeptide, C3a, C4a und C5a – auch Anaphylatoxine genannt – bevor mit der Bildung eines zytolytischen membranständigen Komplexes

(MAC) die Lyse der Zelle resultiert. Als dritte Möglichkeit zur Komplement Aktivierung wurde der **Lectin** Weg beschrieben. Dieser kann in Abwesenheit von Immunkomplexen aktiviert werden, durch Erkennung von bestimmten Molekülstrukturen auf der Oberfläche von pathogenen Substanzen. Makromolekulare Komplexe in Körperflüssigkeiten, wie z.B. das Mannan-binding Lectin (MBL) oder das Ficolin p35, spielen bei der Erkennung und weiteren Kaskade eine entscheidende Rolle. Nach Bildung der C3-Konvertase kommt es dann zur gemeinsame Endstrecke (Matsushita *et al*, 2000; Vorup-Jensen *et al*, 2000; Celik *et al*, 2001).

Von den anaphylatoxischen Peptiden (AT-Peptide), die über mannigfaltige proinflammatorische sowie immunmodulatorische Leistungen verfügen, spielen insbesondere C3a und C5a eine wichtige Rolle. Die AT-Peptide entfalten ihre vielfältigen biologischen Funktionen durch Interaktion mit spezifischen Rezeptoren auf Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und Mastzellen. Die Bedeutung der AT-Peptide für Entzündungsreaktionen liegt in ihren spasmogenen, vasopermeabilitätssteigernden, chemotaktischen, opsonierenden, aggregierenden Eigenschaften, der Freisetzung vasoaktiver Peptide wie Histamin und Serotonin aus Mastzellen und Basophilen sowie der Freisetzung von lysosomalen Enzymen, von toxischen Sauerstoffmetaboliten und von Arachnoidonsäurederivaten aus Granulozyten, Monozyten und Makrophagen (Greiling & Gressner, 1995).

1.3.6 Weitere humorale Effektorsysteme

Das Komplementsystem wirkt keinesfalls völlig eigenständig, sondern hat enge Beziehung zu dem Gerinnungs- und dem Kininsystem, welche ebenfalls bei Entzündungsgeschehen von großer Bedeutung sind (Greiling & Gressner, 1995). Als weitere humorale Faktoren müssen die Produkte des Arachnoidonsäurestoffwechsels (wie Prostaglandine, Thromboxane, Prostacycline und Leukotriene) erwähnt werden, die biologisch hochaktiv, meist aber nur sehr kurzlebig und daher lokal aktiv sind. Neben den Produkten der basophilen Leukozyten (Histamin und Serotonin) bei unspezifischen Entzündungsreaktionen existiert daneben die große Gruppe der multifunktionellen Zytokine (Greiling & Gressner, 1995; Stadler *et al*, 1995; Baue, 1992).

1.3.7 Interleukine/Zytokine

Zytokine sind 10-25 kD große Peptide, die von einer vielfältigen Reihe von Zellen während der unspezifischen und der spezifischen Immunantwort freigesetzt werden. Sie haben multiple, insbesondere pro- und antiinflammatorische, immunregulatorische und die Hämatopoese (Entzündungszellen) steuernde Funktionen (Abbas *et al*, 1996). Eine besondere Rolle spielen die Proteinhormone bei der Lokalisation von Entzündungszellen, bei Reparaturmechanismen von Gewebeschäden und als Wachstumsfaktoren. Oft ist ihr Einfluss lokal (auto-, bzw parakrin) begrenzt, z.T. besteht aber auch ein weitreichender, endokriner Mechanismus (Peter & Pichler, 1991). Biochemisch lässt sich einem Zytokin nach bisherigen Studien nicht nur eine Funktion, sondern lassen sich vielfältige biologische Wirkungen zuordnen. Viele Zytokine entwickeln ihre Funktion über Signaltransduktion induzierte Transkription neuer Gene. Prinzipiell sind Zytokine die Botenstoffe interzellulärer Kommunikation. Sie wirken selten allein als individuelles Molekül, sondern sind eingebettet in ein Netzwerk verschiedener Mediatoren (Peter & Pichler, 1991).

Zu den **proinflammatorischen** Zytokinen rechnet man IFN- γ , IL-1, TNF- α , IL-6 und IL-8, zu den **antiinflammatorischen** Zytokinen zählen IL-4, IL-10, IL-11, IL-13, lösliche TNF- α Rezeptoren (sTNF-R), IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1ra) und TGF- β (Adrie & Pinsky, 1999; Bone, 1996;Pinsky, 2001).

Abbildung 1.1 gibt einen groben Überblick über die unterschiedlichen Herkunftsorte und das komplexe Wirkungsspektrum und Zusammenspiel einiger Zytokine und Wachstumsfaktoren mit verschiedenen Körperzellen.

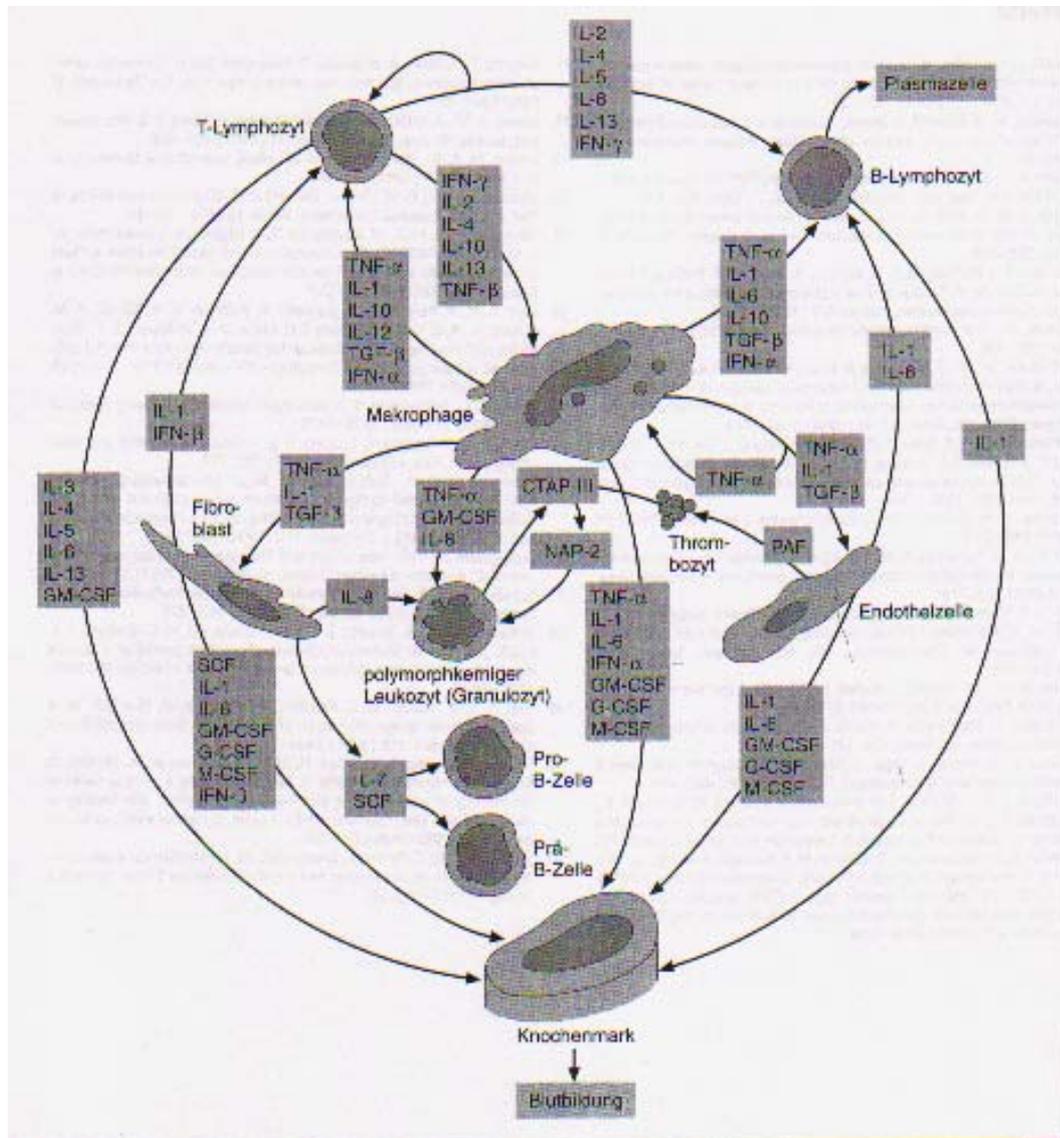


Abbildung 1.1 Übersicht über Herkunft, das komplexe Wirkungsspektrum und Zusammenspiel einiger Zytokine und Wachstumsfaktoren mit verschiedenen Zellen. (Gemsa et al, 1991)

IL-1

Das Interleukin-1 (IL-1), in Kombination mit anderen Zytokinen, ist ein wichtiger Mediator der Entzündungsreaktion. Als Mediator mit vielfältigen Eigenschaften besitzt es sowohl lokale wie auch systemische Wirkung. Der Hauptbildungsort für IL-1 (im Menschen ist das IL-1 β prädominant) sind die Monozyten, aktivierte Makrophagen sowie periphere Neutrophile, Endothelzellen und Fibroblasten (Ibelgauff, 1999; Grutkoski *et al*, 1999). Eine Anregung der Synthese wird zum einen direkt durch Endotoxine, Viren und Antigene, zum anderen durch Mediatoren wie TNF- α , TGF- β , GM-CSF und verschiedene Interferone induziert. Humane Monozyten zeigen sich sehr sensitiv für schon geringste Mengen an Endotoxin und produzieren überwiegend IL-1 β (Ibelgauff, 1999). IL-1 bietet ein breites Feld an biologischer Aktivität: Durch direkte Anregung der B-Zell-Proliferation und durch Stimulation der T-Helfer Zellen mit Freisetzung von IL-2 wird die Synthese von Immunglobulinen stimuliert. Über die Prostaglandin (PGE₂) Produktion in Entzündungszellen und Produktion von Akut-Phase-Proteinen wie CRP nimmt es direkt am Entzündungsprozess teil und besitzt eine starke chemotaktische Wirkung auf Leukozyten. Als endogenes Pyrogen vermag IL-1 einen deutlichen Anstieg der Körperkerntemperatur durch Prostaglandin Freisetzung im Temperaturregulationszentrum des Hypothalamus zu bewirken (Luheshi & Rothwell, 1996; Kluger, 1991; Blatteis & Sehic, 1998). Durch Induktion der Synthese von anderen Mediatoren wie ACTH (Adrenokortikotropes Hormon), PF4 (Platlet Factor), CSF (Colony Stimulating Factor), IL-6 und IL-8 entfaltet sich indirekt ein breites Wirkungsfeld. Desweiteren ist IL-1 β in vielfältiger Weise in den Prozess der Hämatopoese involviert, indem es die Synthese von G-CSF und M-CSF in den Stoma-Zellen des Knochenmarks fördert, synergistisch mit GM-CSF auf das Wachstum der Makrophagen Kolonie wirkt und die Expression der Rezeptoren für Wachstumsfaktoren fördert (Ibelgauff, 1999; Dinarello, 1996). Einen funktionellen Antagonisten stellen die endogenen IL-1 Rezeptorantagonisten dar (Cartmell *et al*, 2001).

IL-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein pleiotropes Zytokin, das Einfluss auf die Antigen-spezifische Immunabwehr und den Entzündungsprozess nimmt (Biffi *et al*, 1996; Patel *et al*, 1994). IL-6 ist ein Glykoprotein von etwa 26 kD Größe, das von stimulierten mononukleären Phagozyten, Endothelzellen, Fibroblasten und vielen anderen Zellen synthetisiert wird (Patel *et al*, 1994). Physiologische Stimuli für IL-6 sind bakterielle Endotoxine, Viren, IL-1, TNF- α und PDGF (Gemsa *et al*, 1991; Cartmell *et al*, 2000; Barton, 1996). Als physiologischer Mediator induziert es in der Leber die Bildung zahlreicher Proteine der Akut-Phase-Reaktion, wie z.B. C-reaktives Protein (CRP), Fibrinogen und Serumamyloid-A (Patel *et al*, 1994) und führt im Hypothalamus zu einem starken Anstieg der Körpertemperatur (Cartmell *et al*, 2000; Klir *et al*, 1993; Leon *et al*, 1998). Ähnlich wie IL-1 stimuliert es die ACTH-Synthese, fördert bei den B-Lymphozyten die Reifung zu Immunglobulin sezernierenden Plasmazellen und kann die IgG Sekretion massiv erhöhen. Weiterhin ist IL-6 an der Reifung von T-Lymphozyten beteiligt und kann unter IL-2 Einfluss deren Differenzierung zu CTL-Zellen bewirken. Glukokortikoide, die auf IL-6 gebildetes ACTH hin ausgeschüttet werden, vermögen über eine Art negativen Feed-back Mechanismus die Produktion von IL-6, IL-1 und TNF- α zu hemmen (Ibelgauff, 1999; Barton, 1996). Antiinflammatorische Eigenschaften der Glukokortikoide lassen sich auch in einer direkten Synthesehemmung von IL-1 und TNF- α erkennen (Barton, 1996).

In der Hämatopoese spielt IL-6 eine wesentliche Rollen bei der Differenzierung der Megakaryozyten, bei der Vermehrung der Vorläuferzellen und bei der Differenzierung in der Myelopoese (Barton, 1996).

Von klinischem Interesse können erhöhte Werte von IL-6 z.B. bei der mesangioproliferativen Glomerulonephritis und bei der Graft-versus-Host Reaktion nach Transplantation im Urin sein, als Nachweis bei einer Amnion Infektionen im Fruchtwasser dienen und als Serum-Verlaufsparmeter bei Polyarthrits, bei entzündlichen Darmerkrankungen und beim multiplen Myelom eingesetzt werden (Barton, 1996).

Nach schwerem Trauma, Verbrennungen oder chirurgischen Eingriffen kann es zu verlängerten und übermäßigen, erhöhten zirkulierenden Zytokinwerten kommen, welche mit vermehrten Komplikationen und Mortalität assoziiert sind (Biffl *et al*, 1996). Dabei scheint nicht der kurzzeitige Spitzenwert, sondern vielmehr eine anhaltende Erhöhung der IL-6 Werte einen ungünstigen Einfluss auf die Genesung zu haben. Auch bei Patienten mit einem septischen Syndrom werden massiv erhöhte IL-6 Werte gefunden (Damas *et al*, 1992; Casey *et al*, 1993). IL-6 ist deshalb neben anderen Sepsismarkern als Überwachungs- und Verlaufsparemeter von klinischen Interesse, da es gut mit der Schwere der Erkrankung und der Mortalität korreliert (Spittler *et al*, 2000; Biffl *et al*, 1996; Antonelli *et al*, 1995; Damas *et al*, 1992; Patel *et al*, 1994).

Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)

Biochemisch werden zwei Formen des Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) unterschieden, das bekanntere TNF- α , auch Kachektin genannt, und das TNF- β , von manchen Forschern als Lymphokin bezeichnet. TNF wurde ursprünglich als Mediator entdeckt, der zur Tumornekrose führt (daher der Name) und im Serum von Tieren, die mit Lipopolysaccharide (LPS, auch Endotoxin genannt) behandelt wurden, anzutreffen ist (Ibelgauff, 1999).

TNF- α wird überwiegend von den Monozyten und Makrophagen gebildet, während TNF- β von Lymphozyten produziert wird. Als körperfremder Stimulus kommen besonders LPS und andere bakterielle Produkte sowie Viren in Betracht, aber auch körpereigene Substanzen wie Interferone (IFN- γ), IL-2 und GM-CSF stimulieren die Freisetzung. IL-6 und TGF- β haben einen hemmenden Effekt auf die Produktion (Ibelgauff, 1999; Giroir, 1993).

Auch wenn TNF- α für die normale Immunantwort unerlässlich ist, so kann eine Überexpression schwere Konsequenzen z.B. bei der Entwicklung des septischen Schocks bei einer gramnegativen Sepsis oder der Kachexie bei Tumor Patienten haben. Kreislauf-, Gerinnungs- und metabolische Störungen spielen dabei eine zentrale Rolle.

Erste klinische Versuche, den Verlauf der Sepsis oder des septischen Schocks mit monoklonalen TNF-Antikörpern oder löslichen TNF Rezeptoren zu beeinflussen, verliefen erfolglos (Abraham *et al*, 1998; Fisher *et al*, 1993).

Klinische Anwendung erfahren Anti-TNF- α Substanzen wie Etanercept® (ein Protein aus der Fusion von dem p75 TNF Rezeptor und IgG1) und Infliximab® (einem chimären, spezifischen, monoklonalen TNF-Antikörper) bisher bei schwerer rheumatoider Arthritis (Geborek *et al*, 2002; Spencer-Green, 2000). Auch bei therapieresistenten aktiven Morbus Crohn kommt Infliximab® zum Einsatz (Sandborn & Hanauer, 2002; Kalden, 2002). Auch bei Patienten mit anderen rheumatischen Erkrankungen wie der ankylosierenden Spondylarthritis, Polymyositis, Morbus Still oder Morbus Behçet zeigte Infliximab® vielversprechende Wirkung (Kalden, 2002; Aeberli *et al*, 2002).

IL-10

Auch das erst 1990 entdeckte Zytokin IL-10 hat sich als ein wichtiger Regulator der Funktion lymphatischer und myeloischer Zellen erwiesen. Bildungsort sind die TH₂-Untergruppe der T-Helfer-Zellen und einige aktivierte B-Zellen und Makrophagen, sowie TH₁-Zellen. IL-10 blockiert unter anderem die Synthese von einer Anzahl von Zytokinen (z.B. TNF- α und TNF- β , IL-2, IFN- γ , C-X-C Chemokine und IL-12) (Gemsa *et al*, 1991; Parry *et al*, 1997; Shin *et al*, 1999).

In Makrophagen, die durch Endotoxin stimuliert wurden, unterdrückt IL-10 die Synthese von IL-1, IL-6 und TNF- α auf mRNA Ebene (Ibelgauff, 1999; Remick *et al*, 1998).

Da eine überschießende Produktion von proinflammatorischen Zytokinen bei einer Infektion zu einem septischen Schock mit Multiorganversagen bis hin zum Tod führen kann, exprimiert der Organismus gegenregulatorisch antiinflammatorische Zytokine wie IL-10, die der Organschädigung entgegenwirken. IL-10 vermag bei systemischer Endotoxinämie die inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und MIP-2 herunterzuregulieren

(Kalyanaraman *et al*, 1998; Standiford *et al*, 1995; Rongione *et al*, 1997). Insgesamt führen diese Wirkungen dazu, dass die T-Zell vermittelte Immunentzündung gehemmt wird. Es wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass eine prophylaktische oder therapeutische Gabe von IL-10 einen positiven Einfluss auf das Management einer intraabdominellen Infektion und Sepsis hat (Rongione *et al*, 1997). In einem Rattenmodell zur Sepsis konnte durch äußerlich zugeführtes IL-10 allerdings kein Benefit bei Mortalität und Morbidität erreicht werden (Remick *et al*, 1998).

Transforming Growth Factor (TGF)

Bei den transformierenden Wachstumsfaktoren lassen sich die zwei, nicht miteinander verwandten Proteine TGF- α und TGF- β unterscheiden.

Als biologische Aktivitäten für TGF- α wird eine Kontrollfunktion bei der Entwicklung und Differenzierung von Zellen beschrieben. Desweiteren scheint TGF- α bei der Regeneration von Lebergewebe einen gewichtigen Einfluss zu haben. Darüber hinaus wurde TGF- α als Wachstumsfaktor beim Ovarialzellkarzinom identifiziert und spielt in der Angiogenese bei der Proliferation von Endothelialzellen eine Rolle. Da TGF- α von Tumorzellen produziert wird, wird ein Einfluss auf die Vaskularisierung des Tumorgewebes vermutet (Ibelgauf, 1999).

TGF- β ist ein multifunktionell wirkender Faktor, der auto- und parakrin wirksam ist und die Proliferation und Differenzierung von Zellen sowohl zu stimulieren als auch zu inhibieren vermag. TGF- β kann von vielen verschiedenen Zellen synthetisiert werden: Thrombozyten, Lymphozyten, Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen. TGF- β findet sich in hoher Konzentration im Serum und wird als wesentlicher natürlicher Regulator der Homöostase in der Epidermis vermutet (Gemsa *et al*, 1991). TGF- β ist einer der stärksten Wachstumshemmer auf eine ganze Reihe von Gewebezellen wie Endothel-, Nerven-, Lymph-, hämatopoetische Zellen und Fibroblasten, abhängig vom Zelltyp und der Konzentration. Auf hämatopoetischer Ebene inhibiert TGF die Synthese von GM-CSF, IL-3 und die Expression von G-CSF Rezeptoren.

Entgegen seiner Namensgebung wirkt TGF- β überwiegend antiproliferativ und vermag nahezu die gesamte Palette der Wirkungen proinflammatorischer Zytokine zu inhibieren. Die Aktivierung der Abwehrzellen und deren Proliferation wird durch diesen Mediator weitgehend supprimiert (Stadler *et al*, 1995).

Im Immunsystem besitzt TGF- β überwiegend suppressiven Charakter. TGF- β wirkt als funktioneller Antagonist zu IL-1 und IL-2, indem er die IL-2-abhängige überschießende klonale Expansion von T-Zellen verhindert und die IL-1 abhängige Proliferation von Lymphozyten hemmt (Ibelgauff, 1999). Ergebnisse aus einem Modell zur Sepsis konnten zeigen, dass von Makrophagen produziertes TGF- β auf parakrine Art die IL-2 mRNA Expression in T-Zellen supprimiert und die IL-2 Produktion und die Zell Proliferation vermindert (Ahmad *et al*, 1997). In LPS stimulierten Makrophagen der Maus konnte TGF- β die Expression von IL-1 β und TNF- α inhibieren. Auch in mehreren Organen vermochte TGF- β diese zwei Zytokine herunter zu regulieren (Imai *et al*, 2000).

1.3.8 Chemokine

Wie der Name schon impliziert, wirken die Peptide dieser proinflammatorischen Zytokine überwiegend chemotaktisch auf unterschiedliche Zellen. Neben einer wichtigen chemotaktischen Funktion für Leukozyten führen sie zur Aktivierung und Degranulation von Granulozyten, Verstärkung von anderen Zytokinen, Histaminfreisetzung aus Basophilen, Aktivierung von Killer-Zellen, Angiogenese und üben hämatopoetische Funktionen aus (Ibelgauff, 1999; Adams & Lloyd, 1997).

Die recht kleinen Peptide mit einer Molekülmasse von 8-10 kD besitzen eine 20-50% Übereinstimmung in ihrer Proteinsequenz und lassen sich anhand ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Rezeptoraffinität in drei große Gruppen einteilen: die Gruppe der **C**, **C-C** und der **C-X-C** Chemokine.

Der Unterschied in ihrer Struktur äußert sich vor allem in ihrer Funktion und Wirkung in der Immunantwort: **C-X-C** Chemokine (Prototyp IL-8, MIP-2) locken bevorzugt Neutrophile und Lymphozyten an, während **C-C** Chemokine (Prototyp MCP, MIP-1) besonders chemotaktisch auf Mono-

zyten/Makrophagen, NK-Zellen, B-Lymphozyten, Baso- und Eosinophile wirken. Lymphotaktin als Vertreter der **C** Unterfamilie wirkt besonders auf die T-Lymphozyten (Adams & Lloyd, 1997; Wolpe & Cerami, 1989).

Chemokine werden von einer Vielzahl von Zellen und Geweben gebildet. Eine massiv gesteigerte Sekretion lässt sich nach Stimulation durch proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-2, TNF- α , IFN- γ oder LPS beobachten, während TGF- β , IL-4 und IL-10 einen inhibitorischen Effekt zeigen (Kalyanaraman *et al*, 1998; Adams & Lloyd, 1997; Shemes *et al*, 2000).

Makrophage Inflammatory Protein (MIP)

Drei Varianten von MIP werden beschrieben: MIP-1, MIP-2 und MIP-3, alle jeweils noch mit zwei Untergruppen α und β (Ibelgauft, 1999; Driscoll, 1994).

Während MIP-1 und MIP-3 in die Gruppe der C-C Chemokine eingeordnet werden, zählt **MIP-2** zu den **C-X-C** Chemokinen. MIP-2 wirkt ausgesprochen chemotaktisch auf segmentierte neutrophile Granulozyten und kann deren Degranulation bewirken. Bei der Entwicklung der lokalen und systemischen Entzündungsreaktion bei einer Peritonitis spielt MIP-2 eine wichtige Rolle (Walley *et al*, 1997; Ibelgauft, 1999; Wolpe & Cerami, 1989; Kalyanaraman *et al*, 1998). Die Funktionen von MIP-2 in Nagetieren entsprechen im wesentlichen denen von IL-8 im Menschen (Ibelgauft, 1999).

Von *Tsujimoto et al.* wurde in einem CLP Tiermodell an Mäusen eine vermehrte MIP-2 mRNA Expression im Gewebe der Lunge mit einer Anhäufung von Neutrophilen beobachtet. Durch Anti-MIP-2 Antikörper konnte die CD11b Expression und die Chemotaxis der Lungen-Neutrophilen inhibiert und ein Lungenödem vermindert werden, was zu einer Reduktion der Mortalität bei einer Peritonitis beitrug (Tsujimoto *et al*, 2002).

1.4 Hämatoopoetische Wachstumsfaktoren

Hämatoopoetische Wachstumsfaktoren (HGF) sind Glykoproteine, die eine entscheidende Rolle bei der Proliferation, Reifung und Differenzierung der Vorläuferzellen im Knochenmark spielen. Sie beeinflussen die Produktion und Aktivität von *Neutrophilen*, indem sie die Anzahl und die Lebensdauer der zirkulierenden Zellen erhöhen und ihre phagozytischen und mikrobiziden Kräfte verstärken (Kullberg & van der Meer, 1996). Die Produktion von Neutrophilen und anderen Blutzellen, die in der Abwehr einer Infektion eine Rolle spielen, hängt von der Anwesenheit von sogenannten Wachstumsfaktoren ab. Diese vermögen im Falle einer Infektion die Population der phagozytierenden Zellen massiv zu erhöhen und damit die Überlebenschancen zu verbessern (Gregory *et al*, 1991). HGF's erhöhen die Anzahl und verlängern die Lebenszeit von hämatoopoetischen Zellen, insbesondere der Neutrophilen, die in der Wirtsabwehr eine entscheidende Rolle spielen. Die Wachstumsfaktoren wirken chemotaktisch auf die Zellen an den Ort der Entzündung und steigern deren phagozytische und zytotoxische Aktivität (Wang *et al*, 1988; Welte *et al*, 1996).

Bakterienprodukte und proinflammatorische Mediatoren bei einer Infektion stimulieren die Produktion körpereigenen Wachstumshormone. IL-1 und TNF- α aktivieren nicht nur Endothelzellen, Fibroblasten, Monozyten, sondern auch Knochenmarkzellen, die daraufhin verschiedene HGF's wie G-CSF (Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor), GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen-Kolonie Stimulierender Faktor) und IL-3 freisetzen (Kullberg & van der Meer, 1996; Nagata, 1994).

Der Hauptbildungsort der HGF's in Zellen sind die T-Lymphozyten, Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Bisher identifizierte Faktoren sind z.B. der Stammzellfaktor (SCF), IL-3 (oder Multi-CSF), M-CSF (Makrophagen-Kolonie Stimulierender Faktor), GM-CSF und G-CSF, benannt meist nach der Zelllinie, deren Proliferation sie überwiegend anregen (Kullberg & van der Meer, 1996; Gregory *et al*, 1991).

1.4.1 GM-CSF

Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) wird unter anderem von T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen sowie von einer großen Anzahl von Gewebezellen gebildet (Hartung *et al*, 2001). Das Hormon wirkt lokal in der frühen Reifungsphase der Vorläuferzellen und beeinflusst das Wachstum und die Proliferation von Neutrophilen, Eosinophilen, Monozyten und steigert die Reaktivität der reifen Zellen (Gregory *et al*, 1991; Peter & Pichler, 1991). Unter Einfluss von GM-CSF wird z.B. die Chemotaxis, der oxidative Burst und die Phagozytose von Neutrophilen und Monozyten verstärkt. In Tierstudien mit Endotoxin wurden proinflammatorische Eigenschaften von GM-CSF beschrieben (Hartung *et al*, 2001). Dafür scheint der Anstieg des inflammatorischen TNF- α , welches durch Monozyten freigesetzt wird, eine wichtige Rolle zu spielen (Goergen *et al*, 1994; Nelson, 1994). Im Gegensatz zu G-CSF wurde bei Applikation von GM-CSF sowohl bei septischen Tieren (Goergen *et al*, 1994), als auch bei septischen Patienten (Nelson, 1994) eine erhöhte Mortalität beobachtet. (Hartung, 1998; Ishikura *et al*, 1996).

Humaner GM-CSF ist spezies-spezifisch, als rekombinanter Faktor wird er zur Beschleunigung der Hämatopoese nach Chemotherapie eingesetzt. Unter GM-CSF expandiert der periphere Stammzellpool, so dass diese Zellen als Alternative zum Knochenmark von einem Spender entnommen und transplantiert werden können (Link, 1995).

1.4.2 G-CSF

Von den gleichen Zellen wie GM-CSF gebildet, stimuliert G-CSF die Reifung von Neutrophilen im Knochenmark und zirkuliert im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktoren in geringer Konzentration in der Peripherie (Peter & Pichler, 1991; Nelson, 1994; Hartung, 1998). In der Gruppe der hämatopoetischen Zytokinen hat G-CSF bisher die größte klinische Bedeutung. Rekombinant, in *E.coli* und Säugetier-Zellen hergestelltes G-CSF gibt es in zwei unterschiedlichen Formen: das nicht-glykolisierte Filgrastim (r-metHuG-CSF) und das glykolisierte Lenograstim. Die Wirkung des G-CSF erfolgt über Zellwandrezeptoren, die sich auf Zellen der

neutrophilen Stammreihe, auf Frühformen von Monozyten, auf Plazentazellen, Endothelzellen und einigen Karzinomzellen finden (Boneberg *et al*, 2000; Bauhofer *et al*, 1998a; Hartung *et al*, 2001). Während der Gabe von G-CSF wird ein deutlich erhöhter Plasmaspiegel von Neutrophilen beobachtet, mit vermehrter Infiltration in verschiedenen Organen wie Leber und Lunge (Cohen *et al*, 1987; O'Reilly *et al*, 1994; Lundblad *et al*, 1995; Nagata, 1994). Im Gegensatz zu GM-CSF und IL-3 konnte kein unerwünschter Angriff der Gewebe festgestellt werden (Nagata, 1994; Lundblad *et al*, 1996). Die Reifungszeit der Neutrophilen im Knochenmark wird durch G-CSF von 5 auf 1 Tag verkürzt, was eine schnelle Freisetzung der Zellen in die Zirkulation zur Folge hat. Neben der Rekrutierung neuer Zellen beeinflusst G-CSF die Effektor-Funktionen der Neutrophilen, wie z.B. den oxidativen Burst, die Phagozytose und die Chemotaxis (Welte *et al*, 1996; Wang *et al*, 1988). Zu einer verlängerten Lebensdauer der Zellen kommt es, indem das Hormon die Zell-Apoptose hinauszögert (DeLamarer, 1988; Lundblad *et al*, 1995). Alle diese Effekte führen zu einem Anstieg und einer höheren Aktivität der Neutrophilen am Entzündungsgeschehen (Hartung *et al*, 1998; Weiss *et al*, 1995; Bauhofer *et al*, 1997b). Anders als bei GM-CSF beobachtet, kommt es nach LPS-Stimulation von Vollblut unter G-CSF Prophylaxe nicht zu einer Erhöhung von TNF- α , jedoch zu vermehrter Expression löslicher TNF-Rezeptoren (sTNF-R) und Interleukin-1 Rezeptor-Antagonisten (IL-1ra) (Hartung *et al*, 1995). Insgesamt kann also unter G-CSF Applikation eine deutliche Tendenz zur Freisetzung antiinflammatorischen Mediatoren beobachtet werden.

1.4.3 G-CSF Dosis und Applikationsschemata

In Studien zur Kinetik hat sich gezeigt, dass subkutane Injektionen die effektivste Applikationsmethode für CSF's darstellen. Nach intravenöser (i.v.) Injektion kommt es zu einer raschen Konzentrationsabnahme, während die subkutane Gabe zu einer langsameren und anhaltenderen systemischen Freisetzung von G-CSF führt (Tanaka & Kaneko, 1991). Eine G-CSF Gabe in vivo bewirkt einen schnellen Dosis-abhängigen Anstieg

der Neutrophilen im Blut und wird nach Absetzen rasch eliminiert, mit gleichzeitigem Abfall der Neutrophilenzahl (Nagata, 1994).

Für die Wirksamkeit des G-CSF in Bezug auf die Mortalität, ist es von Bedeutung, dass die Gabe vor der Infektion erfolgt, damit die Neutrophilen schon vor der eigentlichen Entzündung zur Abwehr bereitstehen (Villa *et al*, 1998; Hartung *et al*, 1998). Nach Absetzen der Injektionen wird ein Rückgang der weißen Blutzellen auf Normalniveau in 1-3 Tagen beobachtet (Metcalf, 1991).

1.4.4 G-CSF Anwendungen

Klinische Anwendung findet G-CSF bisher in größerem Umfang bei Patienten mit schweren Leukopenien, bei Patienten, die eine Chemotherapie (mit/ohne Knochenmark Transplantation) bekommen, sowie bei immunsupprimierten Patienten nach Organtransplantation (Nagata, 1994; Welte *et al*, 1996). Auch die schweren kongenitalen, zyklischen und idiopathischen Neutropenien mit einer Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten $<500/\mu\text{l}$ und neutropenischem Fieber stellen eine Indikation für die G-CSF Therapie dar (Link, 1995; Link *et al*, 1994; Garcia-Carbonero *et al*, 2001). Weitere wichtige klinische Anwendungen erfährt G-CSF bei akuter Leukämie, bei aplastischer Anämie (AA), bei myelodysplastischen Syndromen (MDS) und zur Mobilisierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen in das periphere Blut, die dann durch Leukopherese zur Transplantation gewonnen werden (Welte *et al*, 1996; Bishop *et al*, 2000). Bei Frühgeborenen mit drohender Sepsis konnte ein deutlicher Anstieg von Neutrophilen im Blut erreicht und konnten darauffolgende nosokomiale Infektionen vermindert werden (Miura *et al*, 2001).

Studien mit G-CSF in den letzten Jahre konnten über einen günstigen Effekt bei infizierten, nicht-neutropenischen Patienten berichten. In experimentellen Studien verringerte G-CSF in Kombination mit Antibiotika die Mortalität bei Tieren mit schweren Verbrennungen (Silver *et al*, 1989), mit einer Pneumonie (Preheim *et al*, 1996) oder einer Peritonitis (Villa *et al*, 1998). In klinischen Studien wurde bisher ein Schwerpunkt auf die Sicher-

heit einer G-CSF Applikation bei Patienten mit verschiedenen Infektionen gelegt. Eine Prophylaxe mit G-CSF wurde bisher als sicher und effektiv in der Behandlung nach operativen Eingriffen (Wiik *et al*, 1999; Gross-Weege *et al*, 1999; Weiss *et al*, 1995) und bei der Behandlung von infizierten Füßen bei Diabetikern beschrieben (Gough *et al*, 1997). In einer klinischen Studie zur Sepsis aufgrund schwerer Verbrennungen konnte durch die Applikation von G-CSF die Mortalität deutlich gesenkt werden (Arslan *et al*, 2000). Stephens *et al*. beschrieben den adjuvanten Einsatz von G-CSF bei der Behandlung des septischen Schocks als sicher und empfahlen den Einsatz bei dem endemischen Erreger *Burkholderia pseudomallei* (Stephens D.P. *et al*, 2002). Bei der Behandlung von ambulant erworbenen Pneumonien konnten Nelson *et al*. eine gute Verträglichkeit von G-CSF mit tendenziell verminderten Komplikationen beobachten (Nelson *et al*, 1998). In einem Cochrane Literatur Review zur adjuvanten Gabe von G-CSF zu einer Antibiotikatherapie bei Pneumonie bei nicht-neutropenischen Erwachsenen fanden Cheng *et al*. keinen Hinweis für eine verbesserte Mortalität bei der Routinebehandlung (Cheng A.C. *et al*, 2004).

Schwere Nebenwirkungen werden kaum beobachtet, vereinzelt wird über leichte Knochenschmerzen, Kopfwegh und Müdigkeit berichtet (Hartung *et al*, 1995; Weiss *et al*, 1995).

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass G-CSF mit seinen antiinflammatorischen Eigenschaften die Immunabwehr des Organismus nicht nur in vorklinischen Modellen, sondern auch in der klinischen Situation verbessern kann (Hartung, 1998).

1.4.5 G-CSF bei Peritonitis und Sepsis

Die antiinfektiösen und antiinflammatorischen Eigenschaften von G-CSF sind auch in der Allgemeinchirurgie von besonderem Interesse bei der Bekämpfung von mikrobiellen Erregern, die eine Peritonitis oder Sepsis hervorrufen. Für Situationen des klinischen Alltags ist insbesondere die gleichzeitige prophylaktische Gabe von G-CSF in Kombination mit Antibi-

otika von Bedeutung (Villa *et al*, 1998). Dieses muss in Tiermodellen zur abdominalen Sepsis berücksichtigt werden.

Mehrere Tierstudien zur intraabdominaler Sepsis mit G-CSF Prophylaxe wurden bisher durchgeführt und konnten eine Verbesserung der Überlebensrate der Tiere insbesondere in der Kombination mit Antibiotika nachweisen (O'Reilly *et al*, 1994; Lorenz *et al*, 1994; Lundblad *et al*, 1995; Lundblad *et al*, 1996; Villa *et al*, 1998; Ishikura *et al*, 1996; Bauhofer *et al*, 2002a; Bauhofer *et al*, 2002b). Es wurde gezeigt, dass es unter G-CSF Therapie zu einer deutlichen Abnahme der Bakterien sowie auch der Endotoxine im Blut und zu einer verringerten Ansammlung von Bakterien in Organen kommt (Lundblad *et al*, 1995; Lundblad *et al*, 1996).

Auf hormoneller Ebene kam es zu einer geringeren Freisetzung proinflammatorischen Serumzytokine wie TNF- α , IL-6 und MIP-2 und gleichzeitig zu einer Zunahme von antiinflammatorischen Mediatoren wie IL-10, löslichen TNF Rezeptoren (sTNF-R) und IL-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) (Lorenz *et al*, 1994; Villa *et al*, 1998; Bauhofer *et al*, 1999b; Pajkrt *et al*, 1997). Eine regelmäßig bei Sepsis zu beobachtende Hämokonzentration und Lactatazidose wurde durch G-CSF Gabe verhindert. Histopathologisch konnten keine signifikanten Veränderungen durch Sepsis in den Geweben der Lunge, Leber, Milz oder Niere unter G-CSF Therapie gefunden werden (Lundblad *et al*, 1996). Durch G-CSF konnte die Chemotaxis und die O₂ Produktion von den PMN's deutlich verbessert und durch ein Antibiotika zusätzlich verstärkt werden (Ishikura *et al*, 1996; Goya *et al*, 1993).

Neben messbaren Werten wie Überlebensrate oder Hormonkonzentrationen spielt bei der Beurteilung einer erfolgreichen Patientenbehandlung auch zunehmend das persönliche Genesungsverhalten, die sog. Lebensqualität eine wichtige Rolle. In einer Studie von Bauhofer *et al*. zum Krankheitsverhalten bei septischen Ratten konnte ein positiver Einfluss von G-CSF in Kombination mit Antibiotika nicht nur auf die Überlebensrate sondern auch auf das Krankheitsverhalten (sickness behaviour) beobachtet werden (Bauhofer *et al*, 2002b). Dieses Verhalten entspricht in einigen Punkten der Lebensqualität.

Hinweise, dass das Infektions- und Sepsisrisiko bei chirurgischen Intensivpatienten mit SIRS durch die Gabe von G-CSF vermindert wird, liefert eine erste Pilotstudie von *Gross-Weege* (*Gross-Weege et al*, 1999).

1.5 Sepsis Therapie bisher und neue Ansätze

Trotz verbesserter diagnostischer Möglichkeiten, wirksamen Antibiotika, moderner Intensivbehandlung und aggressiver chirurgischer Behandlungen verstirbt immer noch gut ein Drittel aller Patienten mit schwerer sekundärer Peritonitis (*Wittmann et al*, 1996). Die bisherige Therapie der Peritonitis beruht auf drei Säulen: der chirurgischen Herdsanierung, der antibiotischen Therapie und der Intensivbehandlung. Bei der Herdsanierung gelten immer noch die von Kirschner (*Kirschner*, 1926) aufgestellten Maximen der Sanierung des Infektionsherdes mit: Verschließung der Infektionsquelle, der Drainage und der intensivmedizinischen Nachbehandlung mit Flüssigkeitssubstitution, parentraler Ernährung und Antibiotikatherapie (*Woltmann et al*, 1998; *Bohnen*, 1996). Mit der Einführung der Prinzipien der chirurgischen Behandlung bei Peritonitis konnte im Vergleich zur rein konservativen Therapie eine deutliche Reduktion der Mortalität von ca. 90% im 19ten Jahrhundert auf ca. 40% in 1926 erreicht werden (*Kirschner*, 1926; *Christou et al*, 1993). Zur weiteren Optimierung der Sepsistherapie wurde im Jahr 2002 die Surviving Sepsis Campagne ins Leben gerufen. Die neuesten Erkenntnisse aus der Intensivtherapie sollen zur Verbesserung der Überlebensrate von Sepsispatienten beitragen. Hierzu wurde eine evidence basierte Leitlinie der Sepsistherapie im Jahr 2004 publiziert (*Dellinger et al*, 2004).

Bei Entzündungen, die vom Darm - besonders des Kolons - herrühren, können Hunderte verschiedener bakterieller Spezies das Peritoneum besiedeln, von denen aber nur eine geringe Anzahl eine Rolle bei der Infektion spielen (*Bohnen et al*, 1992; *Wittmann et al*, 1996). Wie *Onderkonk* in einem Tiermodell nachweisen konnte, spielt besonders *E.coli* bei der frühen Mortalität eine Rolle, während Enterokokken bei der späteren Abszessbildung einen wesentlichen Anteil haben. Dabei wurde auch erstmals ein Synergismus der verschiedenen Erreger deutlich, der den Ablauf der

Entzündung beeinflusst (Weinstein *et al*, 1975). Die Auswahl des Antibiotikums im klinischen Alltag muss sich also gegen eine Mischinfektion richten und sollte besonders fakultativ gramnegative Bakterien und obligate Anaerobier abdecken. *Bacteroides fragilis* und *E.coli* gehören zu den Erregern, die bei einer intra-abdomineller Entzündung am häufigsten isoliert werden können und stellen daher wahrscheinlich die Organismen, die an ehesten eine Bakteriämie oder Sepsis verursachen (Engemann, 1993; Wittmann *et al*, 1996; Bohnen *et al*, 1992; Christou *et al*, 1993).

Bohnen *et al.* erstellten 1992 eine erste Leitlinie zur Verwendung von Antibiotika bei intraabdominellen Infektionen (Bohnen *et al*, 1992). In einer Konsensus Konferenz wurde 1996 von internationalen Experten eine Leitlinie zum Einsatz und zur Dauer der antibiotischen Behandlung bei chirurgischen Infektionen des Abdomens erarbeitet, um zu einer einheitlichen und optimalen antibiotischen Therapie bei schweren chirurgischen (auf intraabdominelle Ursachen beschränkte) Infektionen zu gelangen (Schein *et al*, 1996). Neben den herkömmlichen Ansätzen zur Bekämpfung von bakteriellen Infektionen und Sepsis, wie antibiotische Therapie und chirurgische Intervention, werden seit Jahren neue Ansätze getestet, um die Wirtsabwehr zu beeinflussen. Eine zunehmende Resistenz gegen Antibiotika (besonders der Pneumokokken), das Entstehen von multiresistenten Enterokokkenstämmen und die abnehmende Sensitivität von Anaerobiern und gramnegativen Darmbakterien verlangen eine permanente Anpassung von Therapiestrategien (Elsakr *et al*, 1998).

Die unverändert hohe Mortalität bei kritisch kranken Patienten und neue Erkenntnisse im Verständnis des Immunprozesses im menschlichen Organismus haben zur Erprobung neuer Therapieansätze geführt. Den Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren werden dabei besondere Aufmerksamkeit gewidmet (Neugebauer *et al*, 1996; Kullberg & van der Meer, 1996; Bauhofer *et al*, 1998a). Voraussetzung für den Einsatz neuer Mittel ist aber, dass der Entzündungsprozess in seiner Entstehung und in seinem Ablauf besser verstanden wird.

Der bei SIRS oder Sepsis ablaufende immunologische Prozess wurde von mehreren Autoren in unterschiedliche Stadien eingeteilt (Stadler *et al*,

1995; Döcke *et al*, 1994; Neugebauer *et al*, 1996). Die frühe Phase ist durch eine Hyperinflammation gekennzeichnet, mit einer massiven Produktion und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren (z.B. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8) und Aktivierung von Abwehrzellen. Parallel werden immunsuppressive Mediatoren (z.B. PGE₂, IL-10, TGF- β) gebildet, um das Entzündungsgeschehen unter Kontrolle zu halten (Neugebauer *et al*, 1996; Pinsky, 2001). In der späteren Phase, die von manchen Autoren als Immunparalyse bezeichnet wird, überwiegt die antiinflammatorische Gegenregulation mit Unterdrückung der zellulären Immunabwehr (siehe Abbildung 1.2) (Döcke *et al*, 1994; Volk *et al*, 2000). Für den Verlauf einer Entzündungsreaktion ist es daher von entscheidender Bedeutung, wie die Kräfte zwischen pro- und antiinflammatorischen Mediatoren verteilt sind. Ebenso kann es für den Einsatz und die Effektivität möglicher therapeutischer Mittel entscheidend sein, in welcher Phase das Immunsystem sich befindet, um in dem jeweiligen Stadium mit unterschiedliche Therapien einzugreifen (Stadler *et al*, 1995; Volk *et al*, 2000). Anti-Endotoxin oder antiinflammatorische Strategien sollten demzufolge zu Beginn eines entzündlichen Geschehens eingesetzt werden. Die Blockierung von immunsuppressiven Mediatoren, Plasmaaustauschtherapie oder Immunstimulation sollten im späteren Stadium der „Immunparalyse“ angewandt werden (Neugebauer *et al*, 1996; Döcke *et al*, 1994).

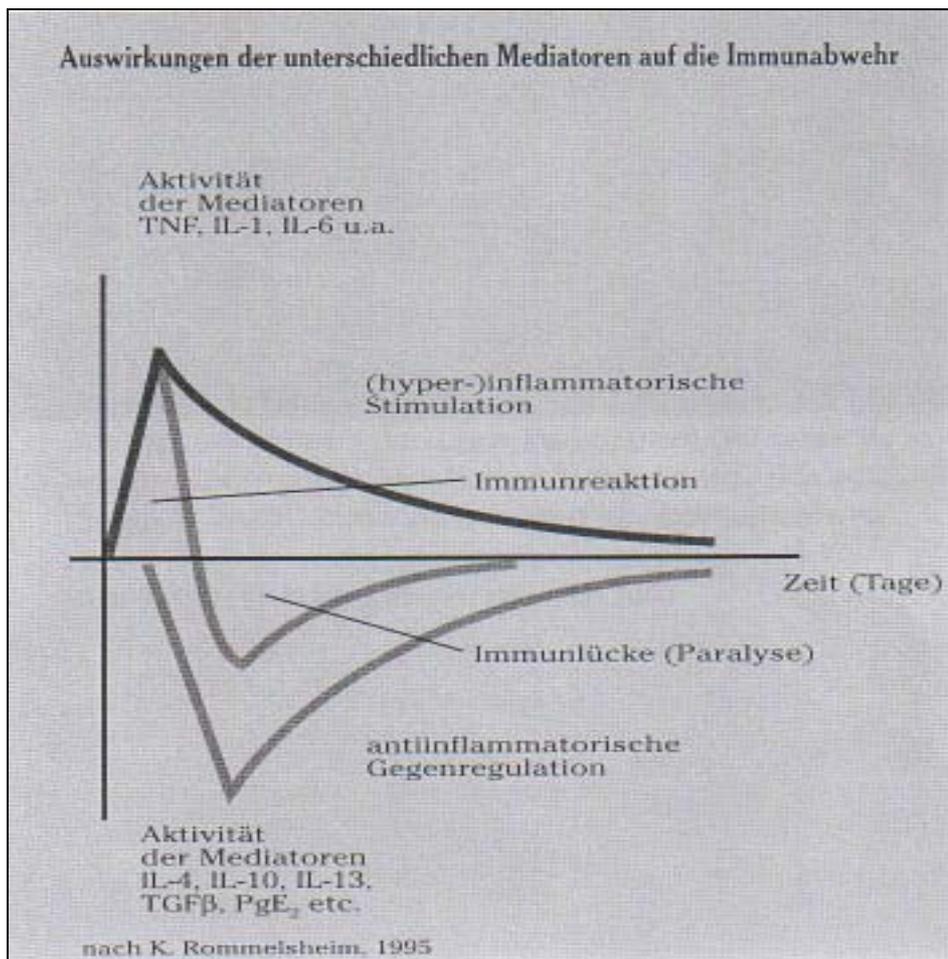


Abbildung 1.2 Verschiedene Stadien mit hämatologischen Mediatoren im Verlauf einer Immunabwehr bei einem infektiösen Geschehen (Peter & Pichler, 1991)

Von *Neugebauer* und *Lorenz* wurde schon 1987 ein Überblick über wichtige Mediatoren im Zusammenhang mit dem septischen Schock gegeben und gleichzeitig kritisch bemerkt, nicht einen einzelnen Mediator allein für das komplexe Sepsisgeschehen verantwortlich zu machen (*Neugebauer et al*, 1987). Die Annahme eines Unikausalprinzips als Korrelation zwischen einer Mediatorveränderung und dem aktuellen klinischen Bild des Patienten führt zu einem falschen Verständnis und zu unzureichenden Behandlungsschlussfolgerungen.

Studien, in denen versucht wurde, mit Antikörpern oder Rezeptor-Blockern den Entzündungsprozess auf der Ebene eines Mediators zu beeinflussen, haben die Entwicklung und die Ausprägung der Sepsis nicht wesentlich beeinflussen können (*Dinarello et al*, 1993; *Fisher et al*, 1994; *Ziegler et al*, 1991; *Abraham et al*, 1998; *Marchant et al*, 1996; *Greenman et al*, 1991; *Bone et al*, 1987).

Einen Therapieansatz, der nicht nur auf die Beeinflussung eines einzelnen Mediators abzielt, bieten die hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (HGF). Sie nehmen Einfluss auf die Immunabwehr unabhängig von der Erregerursache und sind nicht auf einen Mediator fixiert. In ihrer Wirkung sind sie zielgerichteter als die multifunktionellen Zytokine, besonders solche Faktoren wie G-CSF, GM-CSF und M-CSF, die insbesondere die Anzahl und Aktivität von Phagozyten während der Infektion erhöhen (*Kullberg & van der Meer*, 1996; *Bauhofer et al*, 1998a).

1.6 Experimentelle Tiermodelle zur Sepsis

Tierversuche stellen eine wesentliche Grundlage zur Erprobung neuer Medikamente oder Therapien dar, bevor sie in klinischen Studien getestet werden. In Tierversuchen, die unmittelbar zur Entwicklung neuer Therapieansätze führen, sollte versucht werden, die klinische Situation möglichst genau nachzustellen und Rücksicht auf die verschiedenen Einflussfaktoren zu nehmen, um möglichst übertragbar auf den Menschen zu sein. Ein gutes Sepsismodell sollte einfach und gut reproduzierbar durchführbar sein und im Verlauf den klinischen Entwicklungsprozess von der lokalen Infektion bis hin zum septischen Schock mit Organversagen widerspie-

geln. In der Forschung auf dem Gebiet der Sepsis gibt es eine Vielzahl an unterschiedlichen Ansätzen, um in Tiermodellen eine Infektion zu induzieren (Parker & Watkins, 2001):

Um eine gramnegative Sepsis zu induzieren, ist es z.B. möglich den Tieren LPS oder lebende Bakterien (z.B. E.coli) parenteral zu verabreichen (Remick *et al*, 2000; Swensson *et al*, 1991). Beide Modelle sind weit entfernt von einer klinisch relevanten Situation. Künstliche Perforationen im Magen-Darmtrakt, das Einbringen von infiziertem, fremdem Gewebe in Weichteilgewebe, fäkale Inokulation oder Verabreichung von bestimmten Bakterienkulturen in die Bauchhöhle (Mathiak *et al*, 2000) und chirurgische Operationen, welche die normale Barriere des Gastrointestinaltrakts stören, kommen zur Anwendung (Wichterman *et al*, 1980; Baue *et al*, 1996). Das „Caecal Ligation and Puncture Modell“ (CLP) und die fäkale Inokulation werden in der Sepsis Forschung häufig verwendet (Wichterman *et al*, 1980; Remick *et al*, 2000; Parker & Watkins, 2001). In beiden Modellen kommt es zu einer multimikrobiellen Infektion. Im CLP-Modell lässt sich allerdings die Erregermenge nicht besonders genau dosieren. Die Verwendung von humanen Stuhl hat zwei Vorteile. Einerseits kann eine Toleranz gegenüber eigenem Stuhl mancher Tierspezies vermieden werden und andererseits das gleiche Keimspektrum und den auftretenden Antibiotikaresistenzen getestet werden. Bei den meisten Tiermodellen wird der Einfluss einer klinisch komplexen Situation mit Antibiotikagabe, Volumenmanagement, Schmerztherapie und deren Wirkung auf das Immunverhalten vernachlässigt (Parker & Watkins, 2001; Baue *et al*, 1996).

1.6.1 CMRT (Klinik modellierende randomisierende Studien)

Als Untersuchungsmodell für ein Konsensus unterstütztes Sepsis-Studienprotokoll Entwicklung mit G-CSF wurde von Lorenz *et al*. 1994 ein Tiermodell entwickelt, das eine klinisch relevante Situation nachstellt (Lorenz *et al*, 1994). Ziel dieses Konzepts ist es, die Auswirkung von neuen immunmodulierenden Medikamenten besser zu verstehen und das mögliche Risiko für den Patienten abzuschätzen. Der Einfluss von verschiedenen therapeutischen Interventionen im klinischen Alltag auf das komplexe Verhalten der Zytokine wird in dem Modell stärker berücksich-

tigt. Es wurde ein Tiermodell zur postoperativen Peritonitis entwickelt, das den Einfluss der Anästhesie, der prophylaktischen perioperativen Antibiotikagabe, der Laparatomie als umfangreichen chirurgischen Eingriff, der Infektion durch menschliche Stuhlerreger und der Analgesie durch Opiode beinhaltet. In diesem Modell wurde dann der Effekt des immunstimulierenden Zytokins G-CSF untersucht (Bauhofer *et al*, 1998a; Bauhofer *et al*, 2002a). Neben der Modellierung der klinischen Komplexität enthält das Modell die Bedingungen von randomisierten, kontrollierten, klinischen Studien. Für diese neue Art des Tiermodells wurde der Name **CMRT** („Clinic Modelling Randomized Trials“) geprägt.

Das Modell der CMRT wurde bisher für eine Reihe von Untersuchungen verwendet. Der Einfluss von G-CSF bei Sepsis auf die Mortalität mit und ohne Antibiotika wurde getestet (Lorenz *et al*, 1994) und die Auswirkungen von G-CSF auf die Leukozyten und ihre veränderten zellulären Funktionen wurden bei der Bekämpfung der Bakterien studiert (Bauhofer *et al*, 1996c; Bauhofer *et al*, 1996b). Bei Untersuchungen von Interaktionen mit therapeutisch-chirurgischen Eingriffen wie der Peritoneallavage zeigte sich ein Vorteil der G-CSF Prophylaxe gegenüber einem eher negativen Einfluss des interventionellen Eingriffes (Bauhofer *et al*, 2001b; Bauhofer *et al*, 2002a). Auch konnte ein positiver Einfluss auf das Verhalten der septischen Tiere mit G-CSF und Antibiotika Prophylaxe beobachtet werden (Bauhofer *et al*, 2002b; Bauhofer *et al*, 2001d).

In Studien an mehreren hundert männlichen Wistar-Ratten wurde die Interaktion von G-CSF in Kombination mit verschiedenen Antibiotika untersucht (Bauhofer *et al*, 2004b). Es wurde gezeigt, dass im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe die Mortalität unter G-CSF Gabe in Kombination mit Antibiotikum deutlich gesenkt werden konnte. Dabei wurde deutlich, dass nicht jedes Antibiotikum im Zusammenspiel mit G-CSF den gleichen positiven Effekt aufwies. Von den getesteten Antibiotika war eine Kombination mit Co-Amoxiclav oder mit Cefuroxim/Metronidazol am wirksamsten in der Reduktion der Mortalitätsrate, während die Kombination von G-CSF mit Ceftriaxon/Metronidazol keinen zusätzlich positiven Effekt zeigte (Bauhofer *et al*, 1997a; Bauhofer *et al*, 2004b).

Da das Patientengut bei klinischen Studien eine große Heterogenität aufweist und Vorerkrankungen einen entscheidenden Einfluss auf den Ausgang bei schweren Erkrankungen haben können, wurde in mehreren CMRT's der Einfluss von verschiedenen Risikofaktoren untersucht. Die Auswirkungen von prä- und intraoperativen Blutverlust und Diabetes mellitus mit und ohne G-CSF Prophylaxe auf die Überlebensrate bei septischen Ratten wurde getestet (Bauhofer *et al*, 1998b). Diese vielfältigen Untersuchungen mit G-CSF in Tierversuchen bildeten die Grundlage für eine Studienprotokollentwicklung für eine randomisierte Multizenterstudie. In der Studie mit Patienten, die auf Grund eines kolorektalen Krebs operiert wurden und ein erhöhtes perioperatives Risiko (ASA 3 und 4) aufwiesen, wurde untersucht, ob durch G-CSF Prophylaxe das postoperative Outcome verbessert werden kann. Als primäre Endpunkte wurden die Lebensqualität und der McPeck Wiederherstellungsindex festgelegt (Lorenz *et al*, 2001; Bauhofer *et al*, 2001a; Stinner *et al*, 2001).

Der McPeck Index wurde 1986 von McPeck *et al.* als neuer Bewertungsmaßstab zur Beurteilung der Qualität und Wirksamkeit einer anästhesiologischen und chirurgischen Behandlung entwickelt. Neben dem Alter des Patienten, dem präoperativen physischen Status und der durchgeführten Operation gehen in die Bewertung die Mortalität, die postoperativ nötige intensivmedizinische Betreuung und der postoperative Krankenhausaufenthalt mit ein (McPeck *et al*, 1986).

Die Studie mit 80 Patienten ist abgeschlossen, die Auswertung wird derzeit durchgeführt (Lorenz *et al*, 2001; Bauhofer *et al*, 2001a; Stinner *et al*, 2001). Erste Ergebnisse zeigen eine vielversprechende Wirkung von G-CSF in Kombination mit Cefuroxim/Metronidazol auf die Lebensqualität, den Krankenhausaufenthalt und die Komplikationsrate (Bauhofer *et al*, 2004a).

2 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel der hier vorgestellten Untersuchungen ist es, die Auswirkungen des Risikofaktors Hypertension auf den septischen Verlauf und den Einfluss auf die G-CSF Prophylaxe in zwei verschiedenen Hypertensions-Modellen zu untersuchen. Hierzu wurden Klinik modulierende, randomisierte Studien (CMRT) am Modell der fäkalen Peritonitis durchgeführt. Endpunkte der Studien sind das Überleben und systemische sowie organspezifische Zytokin Expressionsanalysen. Neben Veränderung von Zytokinkonzentration von IL-6, IL-10 und MIP-2 im Blut wurden von den Organen Leber, Lunge, Milz und Niere Proben entnommen, und die Expression der Zytokine (IL-1, IL-6, IL-10, MIP-2, TNF- α , TGF- β) auf mRNA Ebene untersucht.

Diese Untersuchungen wurden parallel zu der randomisierten, klinischen Multizenterstudie durchgeführt. Die Experimente wurden mit der Absicht durchgeführt, das Verständnis bei Tiermodellen zur Hypertension zu vertiefen, aber noch wichtiger die Interaktion von G-CSF mit anderen klinischen Interventionen bei Vorliegen einer Hypertension zu untersuchen, da diese auch bei einer Vielzahl von Studienpatienten (ASA 3 und 4) vorliegt (Bauhofer *et al*, 2001a).

3 Material und Methoden

3.1 Studienaufbau

Den Studien liegt das Konzept der CMRT's (siehe Einleitung) zu Grunde. Die Versuche wurden am Modell der peritonealen Kontamination und Infektion (PCI) bei Ratten durchgeführt.

Die Genehmigung für die Experimente wurde durch die regionale Tierethikkommission in Gießen, Deutschland gegeben (Az: II 25.3-19 c 20-15(1) 55/97-20/19-1/97) und die Versuche wurden am Institut für Theoretische Chirurgie der Philipps-Universität Marburg bei Prof. Dr. W. Lorenz und bei PD Dr. A. Bauhofer durchgeführt.

3.2 Vorversuche

Vor dem Beginn der Versuche an hypertensiven Tieren wurde für die verwendete Stuhlsuspension eine Stuhl-Dosis-Wirkungskurve erstellt, anhand derer die zu verwendende Stuhldosis ermittelt wurde, die den klinischen Ergebnissen entsprechend einer Mortalität von 80% ohne und von 50% mit Antibiose entspricht. Alle Tiere erhielten eine Laparatomie mit anschließender peritonealer Kontamination und Infektion (**PCI**).

Um zu bestimmen, ob die SHR Ratten mit Bluthochdruck im CMRT Modell ein ähnliches Verhalten im Mortalitätsverlauf wie die Wistar Ratten zeigen, wurde ein Vorversuch mit einer geringen Gruppengröße (n= 6 Tiere) mit drei verschiedenen Bedingungen durchgeführt: PCI ohne Prophylaxe, PCI mit Antibiotika und PCI mit Antibiotika und G-CSF Prophylaxe.

3.3 Hauptversuche

Männliche spontane hypertensive Ratten (SHR) wurden in Vergleich zu Wistar Ratten behandelt, um den Effekt des Bluthochdruckes auf die Mortalität und den Verlauf der Zytokinexpression bei septischen Ratten unter G-CSF Therapie zu untersuchen. In dem Vergleich von hypertonen Dahl Salz sensitiven (DS) Ratten zu Wistar Ratten wurde kontrolliert, ob sich ein Rückschluss auf die Hypertonie allgemein als Risikofaktor bei septisch infizierten Tieren schließen lässt.

Die Hauptversuche bestanden aus zwei randomisierten Gruppen mit jeweils achtzehn (n=18) Versuchstieren. Der primäre Endpunkt war das 120 Stunden Überleben nach PCI.

Insgesamt wurden drei unabhängige Versuche zur Mortalität und einer zur Organentnahme durchgeführt:

Versuch 1: Wistar Ratten gegen SHR Ratten ohne Prophylaxe (geringe Komplexität)

Die Studienpopulation bestand aus 36 männlichen Tieren, davon je 18 Wistar und 18 SHR Ratten. Alle Tiere erhielten eine Laparatomie mit PCI.

Gruppe 1: Wistar mit PCI, ohne Prophylaxe

Gruppe 2: SHR mit PCI, ohne Prophylaxe

Versuch 2: Wistar Ratten gegen SHR Ratten mit Antibiotika und G-CSF Prophylaxe (hohe Komplexität)

Gleiche Versuchsbedingungen wie in Versuch 1, mit n=18/Gruppe.

Gruppe 1: Wistar mit PCI, mit Antibiotika und G-CSF Prophylaxe

Gruppe 2: SHR mit PCI, mit Antibiotika und G-CSF Prophylaxe

Versuch 3: Wistar Ratten gegen Dahl Salz sensitive Ratten, DS-Ratten mit Antibiotika und G-CSF Prophylaxe (hohe Komplexität)

Gleiche Versuchsbedingungen wie in Versuch 2, mit n=18/Gruppe.

Gruppe 1: Wistar mit PCI, mit Antibiotika und G-CSF Prophylaxe

Gruppe 2: DS mit PCI, mit Antibiotika und G-CSF Prophylaxe

Versuch 4: Entnahme der Organe Leber bei n=3 Tieren pro Gruppe

Gruppe 1: Wistar, Wistar + PCI, Wistar + PCI+AB+G-CSF

Gruppe 2: SHR, SHR + PCI, SHR + PCI+AB+G-CSF

In dieser Gruppe wurden zusätzlich auch Lunge, Niere und Milz entnommen.

Gruppe 3: DS, DS + PCI, DS + PCI+AB+G-CSF

3.4 Tiere und Material

3.4.1 Versuchstiere

Es wurden drei verschiedene Arten von Ratten verwendet, allesamt männliche Tiere mit einem Gewicht von ca. 200-250 g. Die Wistar Ratten (WKY) und die SHR Ratten wurden von Charles River Wiga (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Dahl Salz-sensitiven (DS) Ratten wurden von M&B (Ry, Dänemark) erworben. Für eine mindestens fünftägige Akklimatisation vor Versuchsbeginn wurden die Tiere unter Standardbedingungen bei 23°C Raumtemperatur und 55% Raumluftfeuchtigkeit in Macrolon-Käfigen Typ 3 bei künstlichem 12 Stunden Tag/Nachtrhythmus untergebracht (Bauer & Herrmann, 1991). Jede Ratte wurde mit einer Ohrmarke gekennzeichnet. Die DS Ratten wurden mit einer Salz Diät (4% NaCl) ernährt, während die beiden anderen Stämme eine Standard Diät (Altromin 1324, Lage, Deutschland) bis ca. 12 Stunden vor Versuchsbeginn und Wasser ad libitum erhielten. Zur Festlegung der genauen Dosierungen von Medi-

kamenten und Stuhlmenge wurden die Ratten vor Versuchsbeginn gewogen. Die einzelnen Rattenstämme wurden streng getrennt voneinander zu max. je fünf Tieren pro Käfig gehalten. Postoperativ erhielten die Tiere wieder ihre ursprüngliche Nahrung.

3.4.2 Stuhlsuspension

Als Infektionsauslöser wurde eine standardisierte Stuhlsuspension verwendet. Aus Stuhlproben von 3 gesunden, männlichen Spendern wurde unter anaeroben Bedingungen und Zusatz (1:1) von reduzierter Thioglycolatboullion (14,5 g Thioglykolat, 50 g Bariumsulfat und 500 ml Aqua bidest) und Glycerin (10%) sowie Zugabe von 0,19mg/100ml Katalase (entsprechen 2000-5000 U/mg) das Inokulum hergestellt. Nach der Aufbereitung wurden die Stuhlproben zu 5 und 10 ml aliquotiert und in luftdichten Röhrchen bei minus 80°C gelagert. Bei den verschiedenen Versuchen war somit sichergestellt, dass alle Tiere die gleiche Stuhlprobenqualität erhielten. In früheren Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Pathogenität des Stuhls durch die Lagerung nicht wesentlich beeinträchtigt wird (Lorenz *et al*, 1994). Ungefähr 20 min vor Verwendung der Stuhlsuspension wurden die Stuhlproben aufgetaut und mit N₂ begaster Ringerlösung im Verhältnis 1:2,5 verdünnt. Um das anaerobe Keimspektrum zu erhalten, wurden die Stuhlproben vom Zeitpunkt des Auftauens bis kurz vor Einbringen in die Bauchhöhle der Tiere mit Stickstoff (N₂) weiter begast.

Aus den Ergebnissen der Stuhl-Dosis-Wirkungskurve im Vorversuch wurde die Menge an Stuhlinokulum für eine ca. 50% Mortalitätsrate unter Antibiotika Prophylaxe bestimmt. Aus Erfahrungen früherer Versuche wurde die Stuhlmenge für die Rattengruppen ohne Antibiotika Prophylaxe um ca. ein Drittel reduziert, um vergleichbare Mortalitätsraten zu erhalten. Im **Versuch 1** (ohne Prophylaxe) wurde den Tieren eine Stuhlmenge von 1,2 ml/kg, im **Versuch 2 und 3** (mit Prophylaxe) eine Menge von 1,9 ml/kg appliziert.

3.4.3 Erregerspektrum

Bei der Untersuchung des Erregerspektrums durch das Zentrum für Hygiene und medizinische Mikrobiologie (Marburg) ergab sich ein breites Spektrum aus Aerobiern und Anaerobiern aus dem gram-positiven und gram-negativen Spektrum. Vorherrschende Komponente der Mikroflora waren die Enterokokken, gefolgt von *Bacillus* ssp. und *Escherichia coli*. Alle anderen Spezies ließen sich in wesentlich geringeren Mengen nachweisen.

Tabelle 3.1 Erregerspektrum von zwei Stuhlproben mit den häufigsten Keimen

| Aerob/fakultativ anaerobe Mikroflora | | Anaerobe Mikroflora | |
|--------------------------------------|------------------------|----------------------|-----------------------------|
| gram-neg. | gram-pos. | gram-neg. | gram-pos. |
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Enterococcus</i> | <i>Bacteroides</i> | <i>Clostridium</i> |
| <i>Enterobacter cloa.</i> | <i>Staphylococcus</i> | <i>Prevotella</i> | <i>Propionibacterium</i> |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | <i>Corynebacterium</i> | <i>Fusobacterium</i> | <i>Eubacterium</i> |
| <i>Proteus mirabilis</i> | <i>Bacillus</i> ssp. | | <i>Bifidobacterium</i> ssp. |
| | | | <i>Peptostreptococcus</i> |

3.4.4 Antibiotika

Tiere mit Antibiotikaprophylaxe erhielten eine Stunde vor und eine Stunde nach der Operation eine Kombination von Cefuroxim/Metronidazol (10/3,5 mg/kgKG) (Fresenius-Kabi, Bad Homburg, Serag-Wiessner, Naila, Deutschland) intravenös über einen Schwanzvenenkatheter. Die Antibiotika wurden erst unmittelbar vor dem Versuchsbeginn angesetzt. Die Antibiotika wurden so verdünnt, dass pro Tier ein Volumen von 0,5 - 0,8 ml eingesetzt werden konnte.

3.4.5 Blutdruckmessung

Der Verlauf des arteriellen Hochdrucks wurde durch dreimalige Messung mittels nicht-invasiver Methode über den Rattenschwanz kontrolliert. Für die indirekte Blutdruckmessung wurde ein manueller Blutdruckmonitor der

Firma TSE GmbH (Deutschland) mit Manschette und optischem Pulssensor verwendet. Ein Zweiphasen-Schreiber diente zur graphischen Dokumentation. Für die Messung wurden die Tiere mit Fentanyl/Droperidol (0,05/2,5 mg/ml) i.p. narkotisiert. Da die Messung des Pulssignals sehr sensibel reagiert und leicht Störsignale erfasst, lassen sich verlässliche Ergebnisse besser bei anästhesierten Ratten gewinnen (Bunag *et al*, 1971). Eine flache Narkose war erforderlich, damit der Blutdruck durch die Anästhesie nicht zu stark gesenkt wurde. Durch eine Erwärmung der Ratten unter einer Rotlichtlampe auf ca. 39°C Körpertemperatur konnte der Blutdruck am besten bestimmt werden. Die Erwärmung der Ratten hat nur einen geringen Einfluss auf den Blutdruck, so dass die indirekte Methode der Blutdruckbestimmung gut mit der direkten arteriellen Bestimmung korreliert (Sakamaki *et al*, 1987; Ikeda *et al*, 1991). Die Temperaturmessung erfolgte rektal mit digitalen Fieberthermometern. Der Pulsausschlag wurde durch den Pulssensor erfasst und über das Blutdruckgerät auf den Schreiber weitergeleitet. Abbildung 3.1 zeigt eine Messung, bei der über das eindeutige Verschwinden des Pulssignals der systolische Blutdruck bestimmt werden konnte. Bei Abbildung 3.2 überlagern zahlreiche Störausschläge das Pulssignal, so dass eine Ermittlung des Blutdrucks unmöglich wird.

Das durchschnittliche Gewicht der SHR Ratten lag bei 240 g, einem Alter von ca. 9 Wochen entsprechend. Die SHR Ratten wiesen im Durchschnitt eine Hypertension mit systolischen Werten von über 180 mmHg auf.

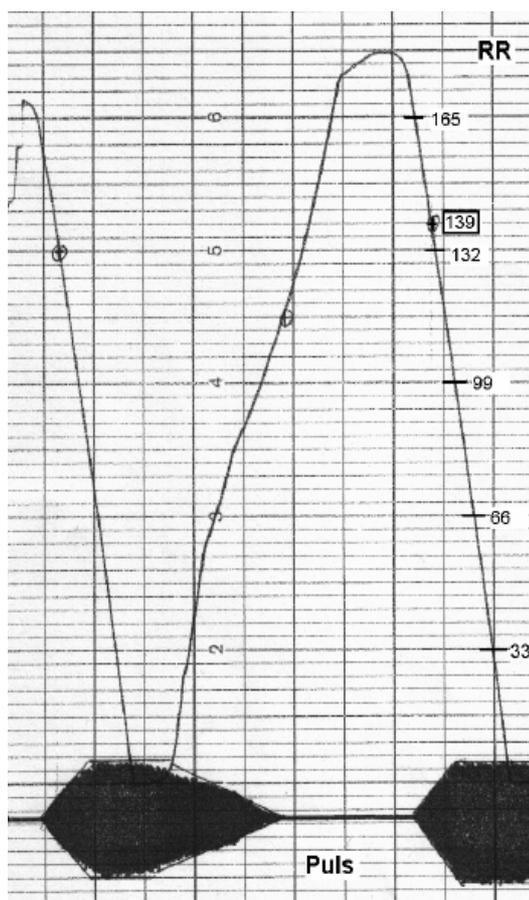


Abbildung 3.1 Aufzeichnung einer Puls-
kurve mit gut bestimmbaren
Blutdruckwerten

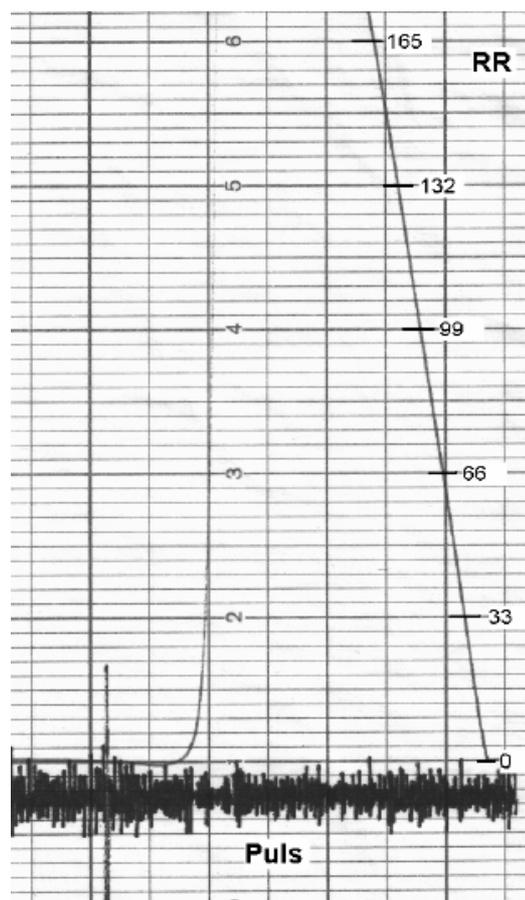


Abbildung 3.2 Beispiel einer Puls-
kurve mit Störsignalen, aus der kein
Blutdruck bestimmt werden
kann

3.5 Versuchsablauf

3.5.1 Präoperativ

Die Versuchstiere wurden zwölf Stunden vor dem Versuchsbeginn gewogen, nüchtern gesetzt und erhielten Wasser ad libitum. Den Ratten mit Zytokin Prophylaxe wurde dreimal G-CSF (Filgrastim, Amgen, München, Deutschland), in 5%iger Glucose 1:15 verdünnt, subkutan injiziert (20µg/kgKG): 12 Stunden vor, sowie 12 und 36 Stunden nach peritonealer Kontamination und Infektion (PCI) (siehe Abbildung 3.3). Dieses Zeitschema und Dosierung erwiesen sich in früheren Versuchen als die wirkungsvollsten und fanden deshalb Anwendung für diese Versuche

3.5.2 Operation

Zum Zeitpunkt $t = 0$ wurde die Laparatomie mit einem ca. 1-2 cm großen Bauchschnitt entlang der Linea alba im mittleren Drittel des Abdomens durchgeführt und den Ratten verdünnter Stuhl (1,2ml/kg oder 1,9ml/kg) mit einer Spritze und einer dicklumigen Braunüle (14 G 2“) ins kleine Becken zur PCI verabreicht (Lorenz *et al*, 1994). Dafür wurden die Tiere in Rückenlage mit Leukosilk®-Klebestreifen auf einer mit Alufolie bezogenen Styroporplatte fixiert. Bei Bedarf wurde im Laufe des Versuches Anästhetikum i.v. nachgegeben (durchschnittlich 0,005/0,25 mg/ml pro Tier, entspricht einer Menge von 100 µl).

Abschließend erfolgt ein durchgreifender Bauchraumverschluß mit Einzelknopf-Hautnaht (Vicryl® 2-0, Ethicon, Hamburg, Deutschland).

3.5.3 Postoperativ

Eine Stunde nach dem operativen Eingriff zum Zeitpunkt $t = +1$ Stunde erfolgte die zweite intravenöse Antibiotikagabe in gleicher Konzentration. Als postoperative Analgesie wurde den Ratten 20 mg/kg Tramadol (Mundipharma, Limburg, Deutschland) subcutan (s.c.) täglich in eine Nackenfalte appliziert.

Während des gesamten Versuches wurde in regelmäßigen Abständen die Vitalfunktionen (Atmung, Puls) der Tiere optisch kontrolliert, um gegebenenfalls mit Herzdruckmassage und Volumensubstitution eingreifen zu können.

Anschließend wurden die Tiere bei Futter und Wasser für einen Beobachtungszeitraum von fünf Tagen in den Käfigen gehalten und die Tiere zur Ermittlung des Todeszeitpunktes mehrmals täglich beobachtet. Am Endpunkt der Versuche (120 Stunden) wurden die überlebenden Tiere mit CO₂ eingeschläfert.

3.6 Auswertung der Zytokine

3.6.1 Systemische Zytokine/ELISA Technik

Für die Bestimmung der systemischen Zytokin Konzentrationen wurde 1 h vor, sowie 1 h und 24 h nach der Operation (jeweils vor Antibiotikagabe) Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus mittels einer abgebrochenen, heparinbeschichteten Glaskapillare in vorbereitete Eppendorfcups mit Heparin (50 µl 25.000 I.E.) oder EDTA (100 µl) gewonnen. Bis zur weiteren Verwendung wurden beschriftete Cups mit den abzentrifugierten (10.000xg, Mikrofuge, Hettich) Plasmaproben bei –40°C gelagert.

Die Bestimmung der Zytokine IL-6, IL-10 und MIP-2 aus den Serumproben erfolgt mittels kommerziell erhältlicher Kits von Pharmingen (Ratten ELISA Pharmingen/BD, Heidelberg, Deutschland) und ELISA-Komponenten zum Selbstbeschichten von 96-well Platten (Biosource, Camarillo, USA). Die Auswertung wurde an einem ELISA Reader SLT 340 ATTC (SLT Lab Instruments, Gröding, Österreich) bei einer Wellenlänge von 450 nm und mit dem Auswertungsprogramm SLT EasyFit durchgeführt.

3.6.2 Lokale Zytokinexpression

Zur Analyse der Zytokin mRNA Expression auf Organebene wurde ein zusätzlicher Versuch (Versuch 4) mit je 3 Tieren durchgeführt. Um die Zytokin Expression in den unterschiedlichen Rattenstämmen zu untersuchen, wurde den Tieren die Leber unter drei verschiedenen experimentellen Bedingungen entnommen:

- A) Keine Infektion (Kontrolle)
- B) PCI
- C) PCI+AB+G-CSF

Für den SHR Stamm wurden die Zytokinexpression detaillierter in den Geweben der Leber, der Lunge, der Milz und der Niere unter vier verschiedenen Bedingungen untersucht: keine Infektion; PCI; PCI mit Antibiotika Prophylaxe und PCI mit Antibiotika und G-CSF Prophylaxe.

Zur Organentnahme wurde die Tiere 24 Stunden nach der Operation mit einer Überdosis Fentanyl/Droperidol eingeschläfert. Unmittelbar nach Präparation wurden die Organe in einer Schale mit Ringerlösung ab gespült, in Stücke von 100 mg geschnitten und in beschrifteten Eppendorfcups in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebeproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

3.6.3 PCR

Die Bestimmung der lokalen Organ mRNA Zytokinexpression erfolgte mittels kompetitiver Polymerase Kettenreaktion (PCR). Das von K. B. Mullis in den 80er Jahren eingeführte Verfahren ist eine sensitive Methode, um DNA zu quantifizieren (Schutzbank & Stern, 1993; Erlich, 1999; Baumforth *et al*, 1999; Saiki *et al*, 1985). Nach RNA Extraktion mit RNA-Clean[®] (ASG, Heidelberg, Deutschland), wurde die RNA mit 40 U/ μl RNasin[®] (Promega, Madison, USA) stabilisiert. Anschließend wurde die mRNA mittels Reverse-Transkription in cDNA umgeschrieben. Für die semi-quantitative, kompetitive rt-PCR wurde ein multispezifisches Kompetitor Fragment für Ratten Zytokine verwendet (Siegling *et al*, 1994). Vor der Vervielfältigung der Zytokine TNF- α , IL-6, IL-10 und MIP-2 erfolgte probenhalber ein PCR mit dem Haushaltsgen β -Actin, um die Menge an cDNA, die in der Reverse-Transkriptase-Reaktion entstanden ist, zu überprüfen. Falls nötig konnte so eine Korrektur durchgeführt werden, um mit der gleichen Menge an cDNA in allen zu untersuchenden Cups zu beginnen. Für die kompetitive PCR wurden 0,125 pg, 0,5 pg und 2,0 pg Kompetitor Fragment eingesetzt. Nach der PCR im PTC-200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc., USA) wurden die Proben durch Elektrophorese in 1% Agarose Gel getrennt, durch Ethidiumbromid gefärbt, digital aufgezeichnet und mit der Software Gelscan[®] 4.0 (BioSciTec, Marburg, Deutschland) ausgewertet. Zur Quantifizierung wurden die Banden verwendet, die mit dem Kontrollfragment am besten übereinstimmten.

3.7 Statistische Analyse

3.7.1 Fallzahlberechnung

Die einzelnen Gruppengrößen von 36 Tieren (18 pro Gruppe) wurden anhand der vorliegenden Formel nach Friedmann berechnet (Friedmann *et al.*, 1985):

$$N = \frac{\left(Z_{\alpha} \sqrt{2\bar{p}(1-\bar{p})} + Z_{\beta} \sqrt{p_1(1-p_1) + p_2(1-p_2)} \right)^2}{(p_2 - p_1)^2}$$

Abbildung 3.4 Fallzahlberechnung nach Friedmann (1985)

Es wurde ein α -Fehler von 0,025 angenommen (Verwerfung der Nullhypothese, obwohl Gleichheit vorliegt). Bei der Berechnung wurde ein β -Fehler von 0,1 zu Grunde gelegt (der Test ergibt keine Unterschiede, obwohl solche vorliegen), dadurch ließen sich geringfügige Behandlungsunterschiede erfassen und gleichzeitig wurde die Sicherheit der Testaussage erhöht.

Aus Vorversuchen wurde eine bedeutsame Differenz $\delta=0,5$ für die Mortalität ermittelt.

p_1 entspricht der Mortalitätsrate der Wistar Gruppe, p_2 bezeichnet die Mortalitätsrate der anderen Gruppe (SHR oder DS), die gegeneinander verglichen werden. Weiterhin galt $\bar{p} = \frac{1}{2} (p_1 + p_2)$, die kritischen Werte der Standardnormalverteilung zum Signifikanzniveau α und zu einer Power des Tests von $1-\beta$ waren z_{α} und z_{β} .

Beim Peritonitismodell der Ratte wurde nach Angaben aus der Literatur eine Mortalität von 80% für die unbehandelte Kontrollgruppe angenommen; für die Verumgruppe (Antibiotika) galt eine Mortalität von 30%, dieser Wert entspricht der Mortalitätsrate bei Sepsispatienten mit Antibiotika Prophylaxe in Amerika (Bone *et al.*, 1987; Rangel-Frausto *et al.*, 1995).

Für die Fallzahlberechnung wurden folgende Parameter verwendet:

$$p_1 = 0,3; p_2 = p_1 + d, \text{ also } p_2 = 0,8; \alpha = 0,025; \beta = 0,1; 1 - \beta = 0,9$$

Bei der Anwendung dieser Parameter errechnet sich eine Gruppengröße von $n=18$ Tieren. Um eventuelle Ausfälle (Narkosetote) ersetzen zu können, wurden für jede Gruppe zwei Ersatztiere mit eingeplant.

3.7.2 Auswertung

Ab dem Zeitpunkt der Inokulation gingen verstorbene Tiere in die Mortalitätsbewertung ein. Häufigste Ursache für frühzeitig (vor der Operation) verstorbene Tiere war der Narkosetod. Tiere, die nach der OP im Verlauf der folgenden 120 Stunden (5 Tage) verstarben, wurden mit Nummer und Todeszeitpunkt (Datum und Uhrzeit) dokumentiert. Als primärer Endpunkt wurde die 120 Stunden Überlebenszeit der Ratten festgelegt.

Die Mortalitätsraten wurden mit dem Chi-Quadrat Test analysiert und die Auswertung der Überlebenskurve mit dem Log-Rank-Test mit Hilfe des SPSS Statistikprogramms durchgeführt (Bühl & Zöfel, 2000). Die Serum Zytokine wurden mit dem U-Test nach Mann-Whitney für zwei unabhängige Variablen für die SHR und Wistar Gruppen und mit dem Wilcoxon Test für zwei abhängige Variablen für den Zeitverlauf der jeweiligen Zytokine einer Gruppe analysiert. Zytokinwerte im Serum wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) angegeben.

Die PCR Daten der Rattenstämme und der Organproben wurden mit dem Kruksal-Wallis Test und dem post hoc Test mit Bonferroni Korrektur für multiple Tests analysiert. Alle Zytokinwerte wurden als Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) angegeben. Werte für $p < 0,05$ wurden in allen Tests als signifikant akzeptiert.

4 Ergebnisse der Tierversuche

4.1 Ergebnisse der Vorversuche

4.1.1 Stuhl-Dosis-Wirkungsdiagramm

Zunächst wurde als Grundlage für die Hauptversuche ein Stuhl-Dosis-Wirkungsdiagramm erstellt, anhand dessen die gewünschte Mortalität des zu applizierenden Inokulums eingestellt wurde. In diesem Versuch wurde den Tieren neben der klinisch relevanten Dosis von 10/3,5 mg/kgKG Cefuroxim/Metronidazol eine definierte Menge an Stuhlsuspension intraperitoneal verabreicht. Die Tiere (n=10/Gruppe) erhielten 1,4; 1,8; 2,2; und 2,6 ml/kgKG der aufbereiteten Stuhllösung. Unter der Antibiotika Prophylaxe zeigte sich am Ende des Beobachtungszeitraums (120 h) folgende Verteilung der Überlebensraten (siehe Abbildung 4.1):

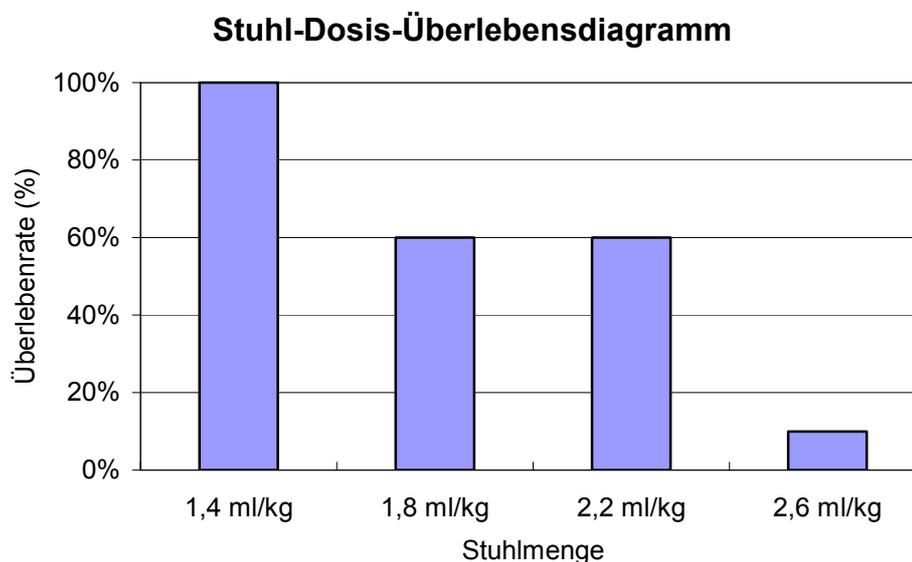


Abbildung 4.1 Verteilung der Überlebensraten bei Wistar Ratten in Abhängigkeit zur Stuhldosis (n=10 Tiere/Gruppe) mit Antibiotika Prophylaxe Cefuroxim/Metronidazol (10/3,5 mg/kgKG)

Bei einer Gabe von 1,4 ml/kgKG überlebten 100% der Ratten, bei einer Menge von 1,8 ml/kgKG überlebten 60%, bei 2,2 ml/kgKG Stuhlsuspension überlebten ebenfalls 60%, und lediglich 10% der Ratten überlebten bei einer Menge von 2,6 ml/kgKG.

4.1.2 Wistar und SHR Ratten im CMRT Modell

In einem Vorversuch wurde der Einfluss des unterschiedlichen genetischen Hintergrundes von Wistar und SHR Ratten auf die Mortalitätsraten im CMRT Modell mit drei unterschiedlichen experimentellen Bedingungen untersucht (Abbildung 4.2). Es wurde die Überlebensrate der zwei Rattenstämme im PCI Model ohne Prophylaxe, mit Antibiotika und mit Antibiotika und G-CSF Prophylaxe bestimmt. Auch wenn die Fallzahl mit $n=6$ Tieren/Gruppe klein war, konnte davon ausgegangen werden, dass die SHR Tiere grundsätzlich in vergleichbarer Weise auf eine Antibiotika und G-CSF Gabe im Peritonitis Modell reagieren.

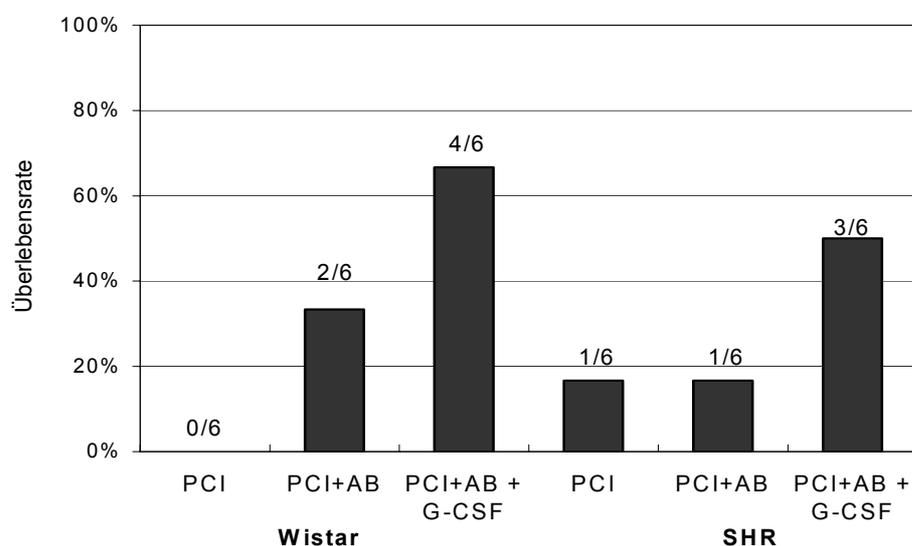


Abbildung 4.2 120-Stunden Überlebensraten von Wistar und SHR Ratten im Vergleich unter verschiedenen experimentellen Bedingungen ($n=6$ Tiere/Gruppe); Antibiotika Prophylaxe Cefuroxim/Metronidazol (10/3,5 mg/kgKG); G-CSF Gabe (20 μ g/kgKG) 12h prä-, 12h und 36h post-OP

4.2 Ergebnisse der Hauptversuche

4.2.1 Mortalitätsverlauf

Zur Ermittlung der Überlebensrate von SHR Ratten und DS Ratten als Risikopopulation, im Vergleich zu Wistar als Kontrollgruppe wurden je Gruppe achtzehn Tiere in drei Versuchsdurchgängen dem standardisierten Infektionsmodell der PCI unterzogen. Bei keiner Ratte traten Probleme, technische oder sonstige Schwierigkeiten auf.

Im **Versuch 1** mit geringer Komplexität (nur PCI ohne Prophylaxe) und verringertem Stuhlinokulum (1,2 ml/kgKG) überlebten in der Wistar Gruppe 28% (5/18) (siehe Abbildung 4.3), in der SHR Gruppe waren es 50% (9/18) ($p= 0.17$ im χ^2 -Test, $p= 0.38$ im Log-Rank Test, siehe Abbildung 4.6).

Im **Versuch 2** mit erhöhter Komplexität (Antibiotika und G-CSF Prophylaxe) überlebten bei den SHR Ratten 89% (16/18) im Vergleich zu 50% (9/18) bei den Wistar Ratten (siehe Abbildung 4.4). In der statistischen Berechnung mit dem χ^2 -Test zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Überlebensrate zwischen der SHR und der Wistar Gruppe mit $p<0.01$. Bei der Betrachtung der Überlebenskurve fällt auf, dass ein relativ langes Intervall von 70 Stunden bei den SHR Tieren vergeht, bis der erste Todesfall eintritt (Todesfälle bei 72 und 93 Stunden). In diesem Zeitraum sind bei den Wistar-Ratten schon die meisten Todesfälle zu verzeichnen. Die Überlebensanalyse ergibt im Log-Rank Test einen signifikanten Unterschied von $p<0.01$ (siehe Abbildung 4.7).

Im **Versuch 3** überlebten 67% (12/18) in der Wistar Kontrollgruppe im Vergleich zu 44% (8/18) in der DS Gruppe (siehe Abbildung 4.5). Das Ergebnis ergibt im χ^2 -Test mit $p= 0.18$ und im Log-Rank Test mit $p= 0.27$ keinen statistisch signifikanten Unterschied (siehe Abbildung 4.8).

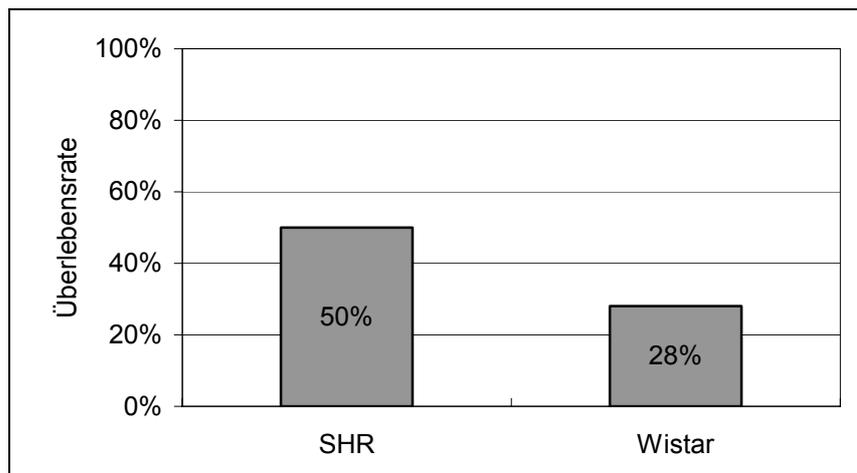


Abbildung 4.3 Die 120h Überlebensrate in von **SHR** und **Wistar** Ratten ($n=18$ /Gruppe) **ohne** Prophylaxe im PCI-Modell. Chi-Quadrat-Test $p=0.17$

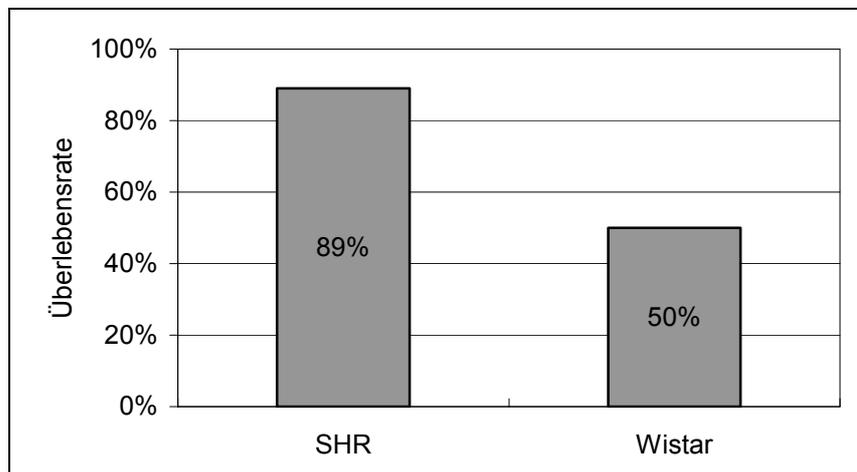


Abbildung 4.4 Die 120h Überlebensrate in von **SHR** und **Wistar** Ratten ($n=18$ /Gruppe) mit Antibiotikaprophylaxe (Cefuroxim/Metronidazol 3,5/10ml/kgKG) und dreimaliger G-CSF Gabe (20 μ g/kgKG) im PCI-Modell. Chi-Quadrat-Test $p<0.01$

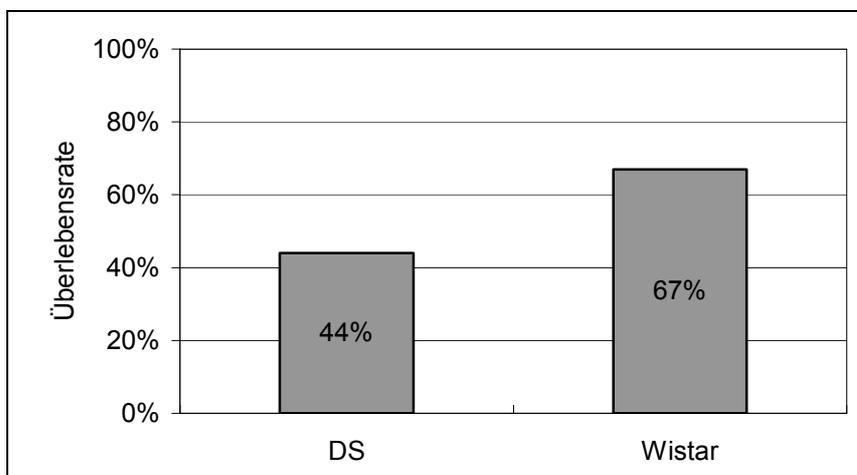


Abbildung 4.5 Die 120h Überlebensrate in von **DS** und **Wistar** Ratten mit Antibiotikaprophylaxe (Cefuroxim/Metronidazol 3,5/10ml/kgKG) und dreimaliger G-CSF Gabe (20 μ g/kgKG) im PCI-Modell. Chi-Quadrat-Test $p=0.18$

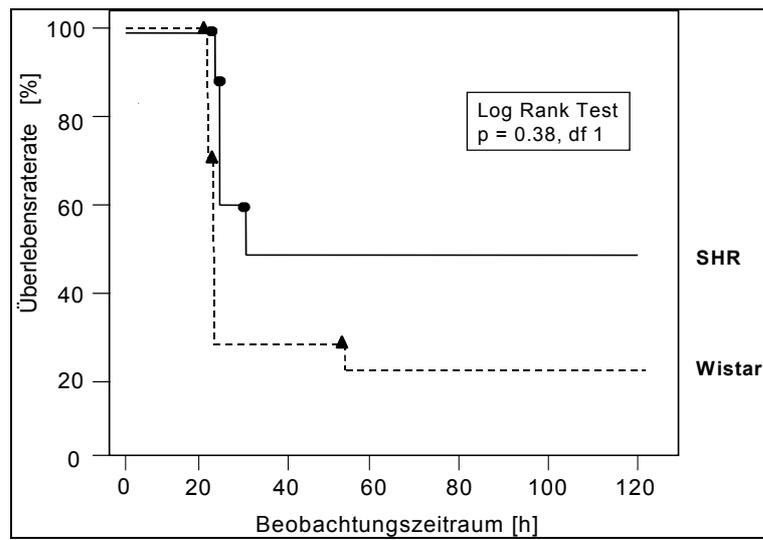


Abbildung 4.6 Kaplan-Meier 120h Überlebensanalyse, n=18 Ratten, **geringe** Komplexität

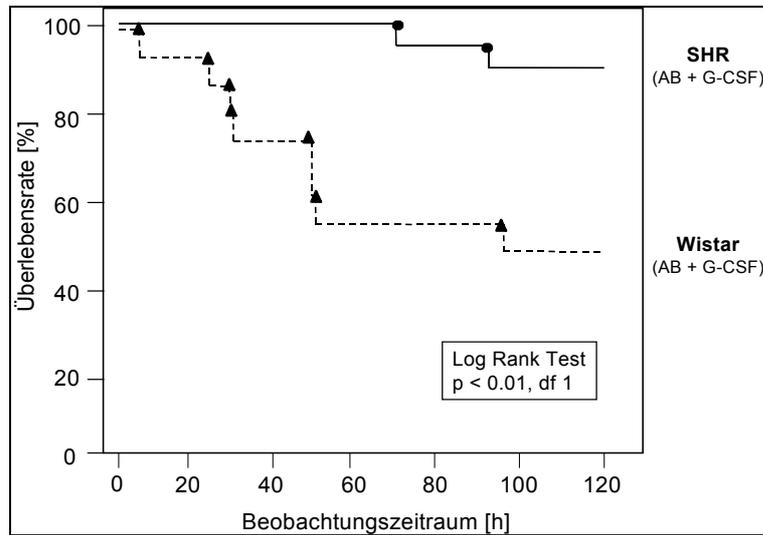


Abbildung 4.7 Kaplan-Meier 120h Überlebensanalyse, n=18 Ratten, **hohe** Komplexität

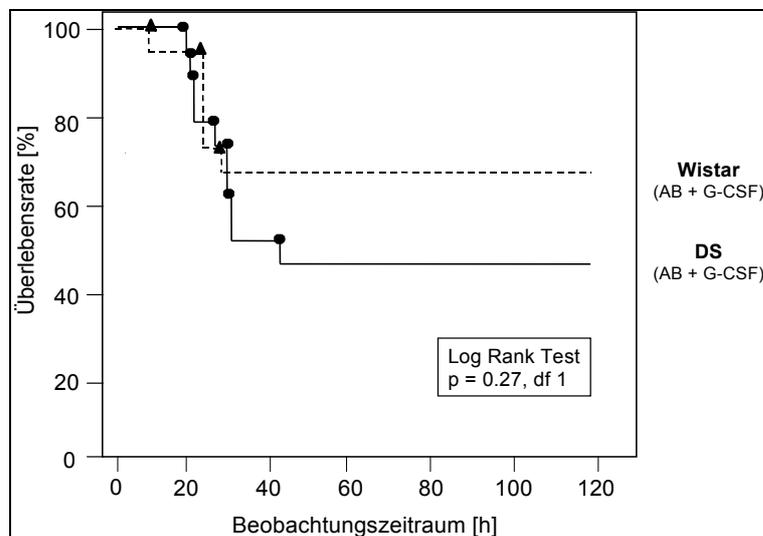


Abbildung 4.8 Kaplan-Meier 120h Überlebensanalyse, n=18 Ratten, **hohe** Komplexität

4.2.2 Systemische Zytokinspiegel

Die Ausgangswerte der Zytokine im Plasma vor dem operativen Eingriff liegen jeweils an der Nachweisgrenze der verwendeten Assays und zeigen keinen Unterschied zwischen den SHR und Wistar Ratten. Eine Stunde nach der abdominalen Kontamination und Infektion steigen die Zytokinwerte im Plasma in der SHR Gruppe im Mittel (Mittelwerte \pm SD) auf 96 ± 33 pg/ml für IL-6, auf 365 ± 40 pg/ml für IL-10 und auf 212 ± 41 pg/ml für MIP-2 an, verglichen mit 146 ± 51 pg/ml ($p=0,57$), 604 ± 125 pg/ml ($p=0,26$) und 208 ± 70 pg/ml ($p=0,78$) in der Wistar Gruppe. Ein Vergleich der Zytokine nach 24 Stunden zeigt ähnliche Werte: 166 ± 21 pg/ml für IL-6, 374 ± 121 pg/ml für IL-10 und 132 ± 37 pg/ml für MIP-2 bei den SHR Tieren, im Vergleich zu 172 ± 52 pg/ml ($p=0,2$), 378 ± 88 pg/ml ($p=0,62$) und 40 ± 4 pg/ml ($^{\S}p<0,001$) bei den Wistar Ratten.

Im Zeitverlauf von 24 Stunden zu einer Stunde nach der Operation zeigte sich sowohl für die SHR Ratten bei den Serum Zytokinen IL-6 ($p=0,075$) und bei IL-10 ($p=0,209$), als auch für die Wistar Ratten mit $p=0,767$ und $p=0,11$ respektive keine signifikante Veränderung. Bei MIP-2 zeigte sich nach 24 Stunden in der Wistar Gruppe ein signifikanter Rückgang im Vergleich zu einer Stunde nach der Operation ($^{\#}p<0,01$), in der SHR Gruppe war mit $p=0,11$ keine signifikante Veränderung nachweisbar.

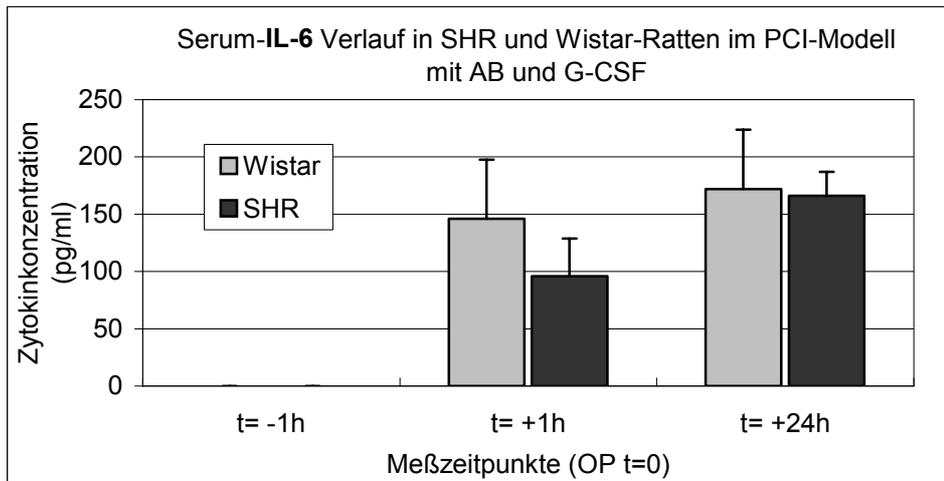


Abbildung 4.9 Serum **IL-6** perioperativ von Wistar und SHR Ratten im Vergleich

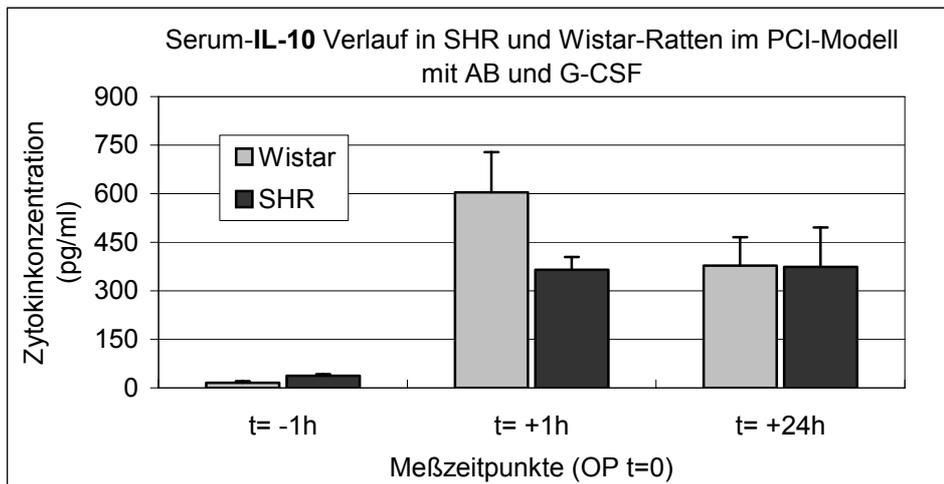


Abbildung 4.10 Serum **IL-10** perioperativ von Wistar und SHR Ratten im Vergleich

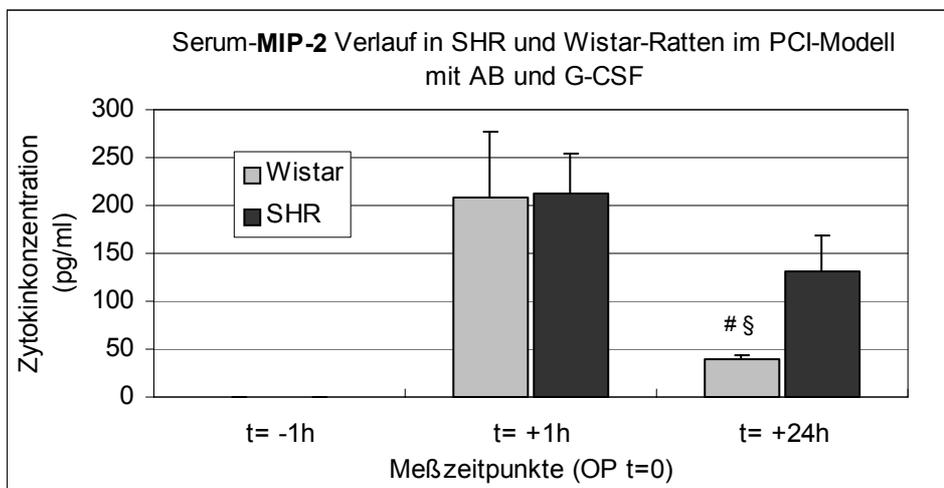


Abbildung 4.11 Serum **MIP-2** perioperativ von Wistar und SHR Ratten im Vergleich.
[§] $p < 0,001$ vs. SHR +24h, [#] $p < 0,01$ vs. Wistar +1h

4.2.3 Zytokinexpression in der Leber bei Wistar, SHR und Dahl Ratten

24 Stunden nach der PCI wurden die Ratten geopfert und Leber Proben der Wistar, DS und SHR Stämme aus den jeweiligen Gruppen (Kontrolle, PCI, PCI plus Antibiotika und PCI plus Antibiotika plus G-SCF) gewonnen. Die Ergebnisse der semi-quantitativen, kompetitiven RT-PCR in den Abbildung 4.12 bis Abbildung 4.16 zeigen die Werte für IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL-10 und MIP-2. Alle Werte zeigen die Mittelwerte + SEM (n=3 pro Fall). Signifikante Ergebnisse wurden mit dem Kruskal-Wallis Test für MIP-2 ($p < 0,05$, $df=8$) und IL-1 β ($p < 0,05$, $df=7$) sowie für TNF- α , IL-6 und IL-10 ($p < 0,01$, $df=8$) erhalten. Im post hoc Bonferroni Test ($df=1$) zeigten sich folgende Signifikanzen: $^{\$}P < 0,01$ vs. Wistar Kontrolle (**IL-6**), $^{\#}P < 0,001$ vs. Wistar Kontrolle, $^{\#\#}P < 0,01$ vs. DS Kontrolle, $^{\$}P < 0,05$ vs. DS PCI, $^{\$\$}P < 0,01$ vs. Wistar PCI, $^{\$}P < 0,001$ vs. Wistar PCI, $^{\$\$}P < 0,05$ vs. DS PCI (**TNF- α**), $^*P < 0,05$ vs. DS Kontrolle, $^{**}P < 0,05$ vs. SHR Kontrolle, $^{\&}P < 0,05$ vs. Wistar PCI+AB+G-CSF (**IL-1 β**), $^{\text{K}}P < 0,01$ vs. Wistar Kontrolle (**MIP-2**), $^{\text{£}}P < 0,001$ vs. Wistar Kontrolle, $^{\text{££}}P < 0,05$ vs. Wistar PCI, $^{\text{^}}P < 0,001$ vs. Wistar PCI, $^{\text{^}}P < 0,001$ vs. DS PCI, $^{\text{^^}}P < 0,05$ vs. DS PCI+AB+G-CSF, $^{\text{Ø}}P < 0,001$ vs. SHR Kontrolle, $^{\text{¥}}P < 0,05$ vs. SHR Kontrolle, $^{\text{^}}P < 0,001$ vs. SHR PCI (**IL-10**).

Im Vergleich der Leber mRNA Zytokin Expression zwischen den Stämmen der Wistar, SHR und Dahl Ratten sind die Werte von TNF- α , IL-6 und MIP-2 am höchsten bei der Wistar Gruppe 24 Stunden nach PCI. Deutlich niedrigere Zytokinwerte werden in der SHR und DS Gruppe beobachtet. Die prophylaktische Gabe von G-CSF bewirkt eine Verringerung von mRNA Expression dieser Zytokine gleichsam in allen Stämmen. Im Gegensatz zu den oben genannten Zytokinen fand sich in der Leber des SHR Stammes die höchste Expression von IL-10, während bei den DS Ratten die niedrigste Menge gebildet wurde.

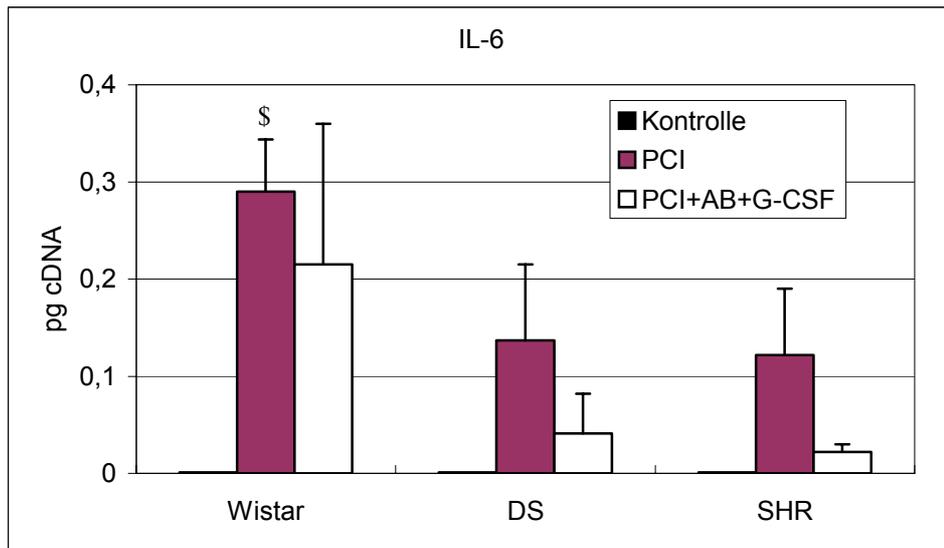


Abbildung 4.12 **IL-6** Zytokinwerte der **Leber** bei Wistar, SHR und Dahl Stamm unter drei verschiedenen Bedingungen.
^{\$} $P < 0,01$ vs. Wistar Kontrolle

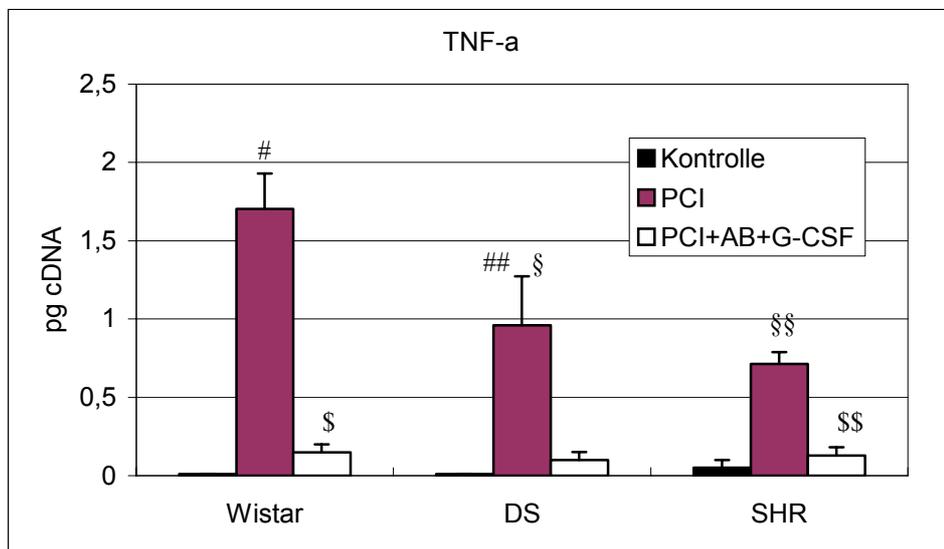


Abbildung 4.13 **TNF-α** Zytokinwerte der **Leber** bei Wistar, SHR und Dahl Stamm unter drei verschiedenen Bedingungen.
[#] $P < 0,001$ vs. Wistar Kontrolle, ^{##} $P < 0,01$ vs. DS Kontrolle, ^{\$} $P < 0,05$ vs. DS PCI,
^{\$\$} $P < 0,01$ vs. Wistar PCI, ^{\$} $P < 0,001$ vs. Wistar PCI, ^{\$\$} $P < 0,05$ vs. DS PCI

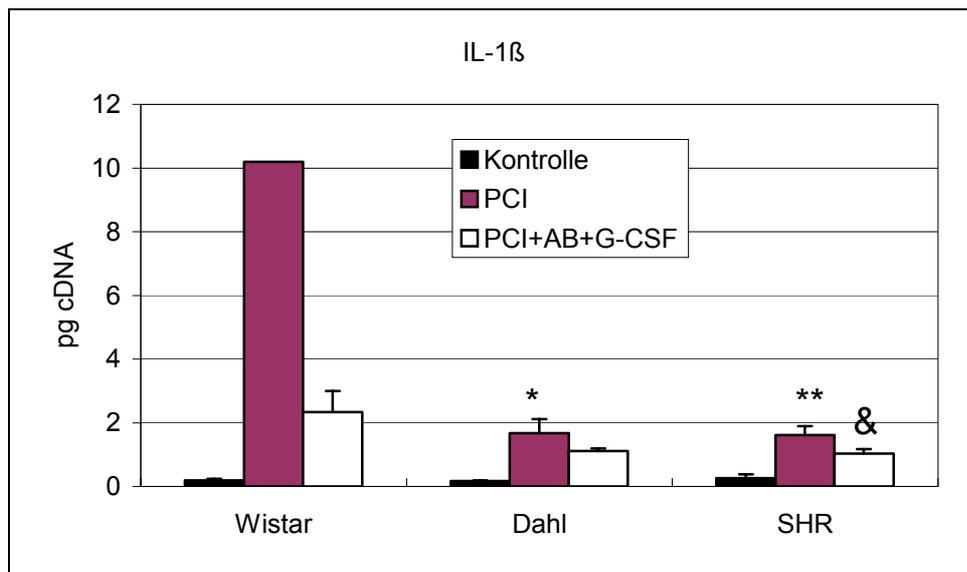


Abbildung 4.14 **IL-1 β** Zytokinwerte der **Leber** bei Wistar, SHR und Dahl Stamm unter drei verschiedenen Bedingungen.

* $P < 0,05$ vs. DS Kontrolle, ** $P < 0,05$ vs. SHR Kontrolle, & $P < 0,05$ vs. Wistar PCI+AB+G-CSF

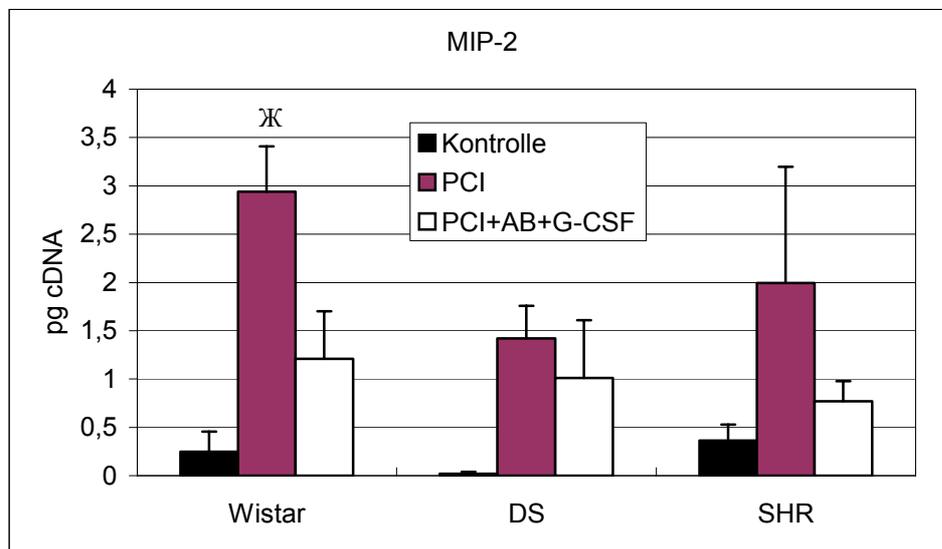


Abbildung 4.15 **MIP-2** Zytokinwerte der **Leber** bei Wistar, SHR und Dahl Stamm unter drei verschiedenen Bedingungen.

$\mathcal{K}P < 0,01$ vs. Wistar Kontrolle

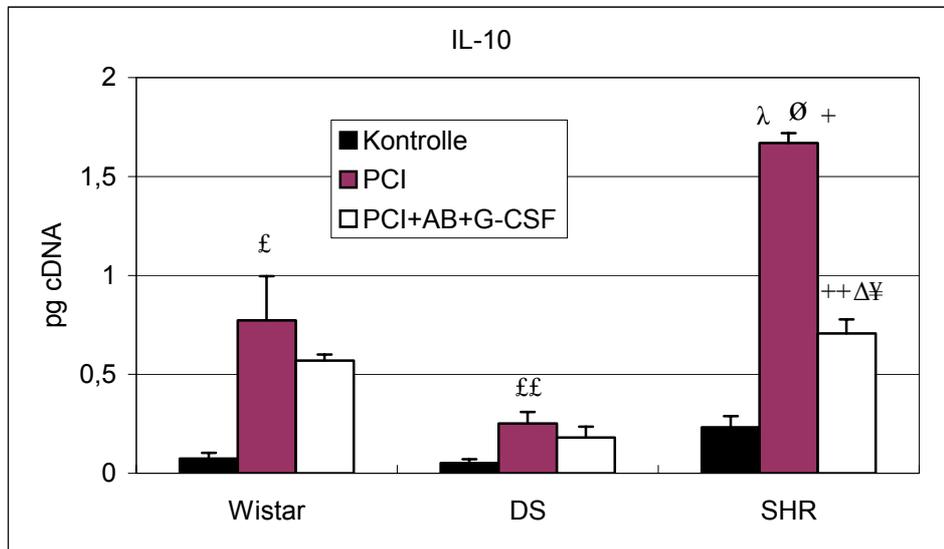


Abbildung 4.16 IL-10 Zytokinwerte der Leber bei Wista-, SHR und Dahl Stamm unter drei verschiedenen Bedingungen.

£ $P < 0,001$ vs. Wistar Kontrolle, ££ $P < 0,05$ vs. Wistar PCI, λ $P < 0,001$ vs. Wistar PCI, + $P < 0,001$ vs. DS PCI, ** $P < 0,05$ vs. DS PCI+AB+G-CSF, ∅ $P < 0,001$ vs. SHR Kontrolle, * $P < 0,05$ vs. SHR Kontrolle, Δ $P < 0,001$ vs. SHR PCI

4.2.4 Zytokinexpression bei SHR Ratten

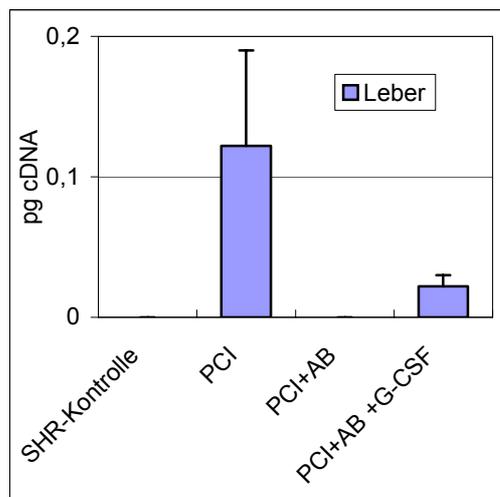
Bei der detaillierten Betrachtung der mRNA Expression in den Organen der Leber, Lunge, Milz und Niere von Tieren der SHR Gruppe zeigt sich ein ähnliches Muster der Zytokine TNF- α , IL-6 und MIP-2. In allen vier Organen sind die Zytokinspiegel nach PCI erhöht. Alle Werte zeigen die Mittelwerte + SEM (n=3 pro Fall). Signifikante Ergebnisse wurden mit dem Kruskal-Wallis Test für MIP-2 und IL-6 ($p < 0,05$, $df=15$), sowie für IL-10 und IL-1 β ($p < 0,01$, $df=15$) erhalten. Keine Signifikanz für TNF- α und TGF- β . Im post hoc Bonferroni Test ($df=1$) zeigten sich folgende Signifikanzen: $^{\$}p < 0,05$ vs. SHR Kontrolle (**MIP-2**), $^{\#\$}p < 0,01$ vs. SHR Kontrolle, PCI+AB und PCI+AB+G-CSF (**IL-6**), $^*p < 0,05$ vs. SHR Kontrolle (**IL-1**) und $^+p < 0,001$ vs. PCI und $^{\#}p < 0,001$ vs. PCI (**IL-10**).

Bei den TNF- α Werten bewirkt schon eine alleinige Antibiotika Gabe eine Verringerung in der Expression in allen Organen. In der Kombination von Antibiotika mit G-CSF konnte die TNF-Expression in den Organen noch weiter verringert werden. Signifikante Veränderungen wurden für TNF- α jedoch nicht gefunden. Bei MIP-2 wurde in der Gruppe SHR PCI+AB+G-CSF mit $P=0,057$ vs. SHR PCI eine signifikante Veränderung nur knapp verfehlt. In den Organen der Leber, Lunge und Niere bewirkt die zusätzliche G-CSF Gabe zur Antibiotika Prophylaxe einen Anstieg der Zytokinexpression von TGF- β .

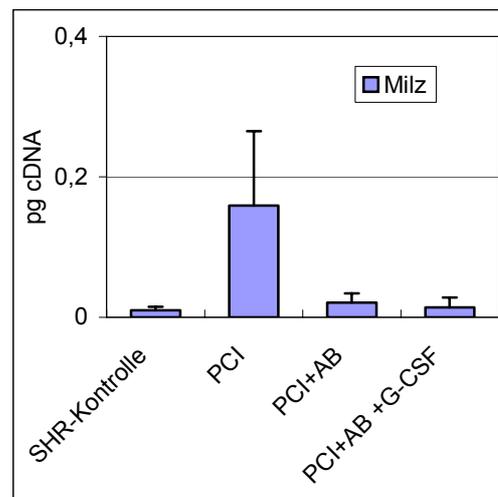
Im folgenden sind die Abbildungen für die einzelnen Zytokinexpression in den jeweiligen Organen dargestellt (siehe Abbildung 4.17 bis Abbildung 4.22)

IL-6

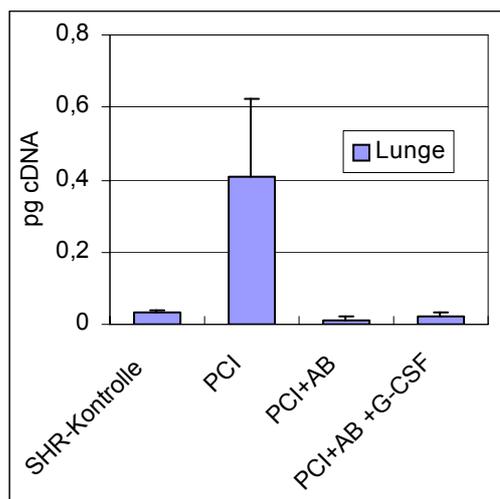
Unter Antibiotika und G-CSF Gabe zeigt sich eine wesentlich niedrigere IL-6 Konzentrationen im Vergleich zu den Ratten ohne medikamentöser Behandlung. Werte in der PCI Gruppe sind um ein 7-10faches höher als bei den Tieren mit Antibiotika. Die zusätzliche Gabe von G-CSF bewirkt keine wesentliche Verringerung der IL-6 Gewebekonzentration. Signifikante Veränderungen werden nicht erreicht.



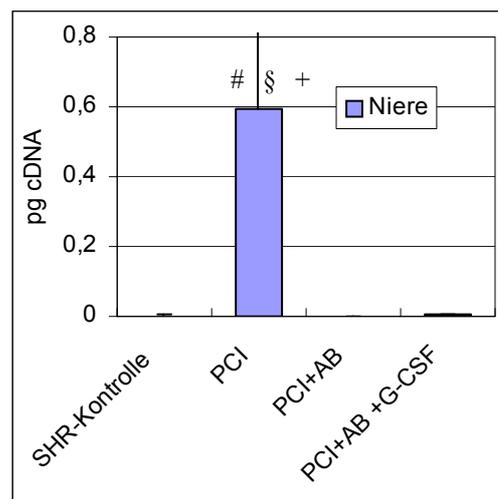
A) Leber



B) Milz



C) Lunge



D) Niere

Abbildung 4.17 IL-6 Expression in der Leber, Milz, Lunge und Niere bei SHR Ratten mit PCI, PCI+AB und PCI+AB+G-CSF

#\$+ $P < 0,01$ vs. SHR Kontrolle, PCI+AB und PCI+AB+G-CSF

TNF- α

Eine gesteigerte Produktion von TNF- α bei den Tieren, die eine Infektion erhalten haben, ist in allen vier Organen zu erkennen. In allen Organen ist eine Abnahme der Konzentrationen unter Antibiotika zu erkennen, wobei eine G-CSF Gabe noch zu einer zusätzlichen, jedoch nicht signifikanten Verringerung von TNF- α führt.

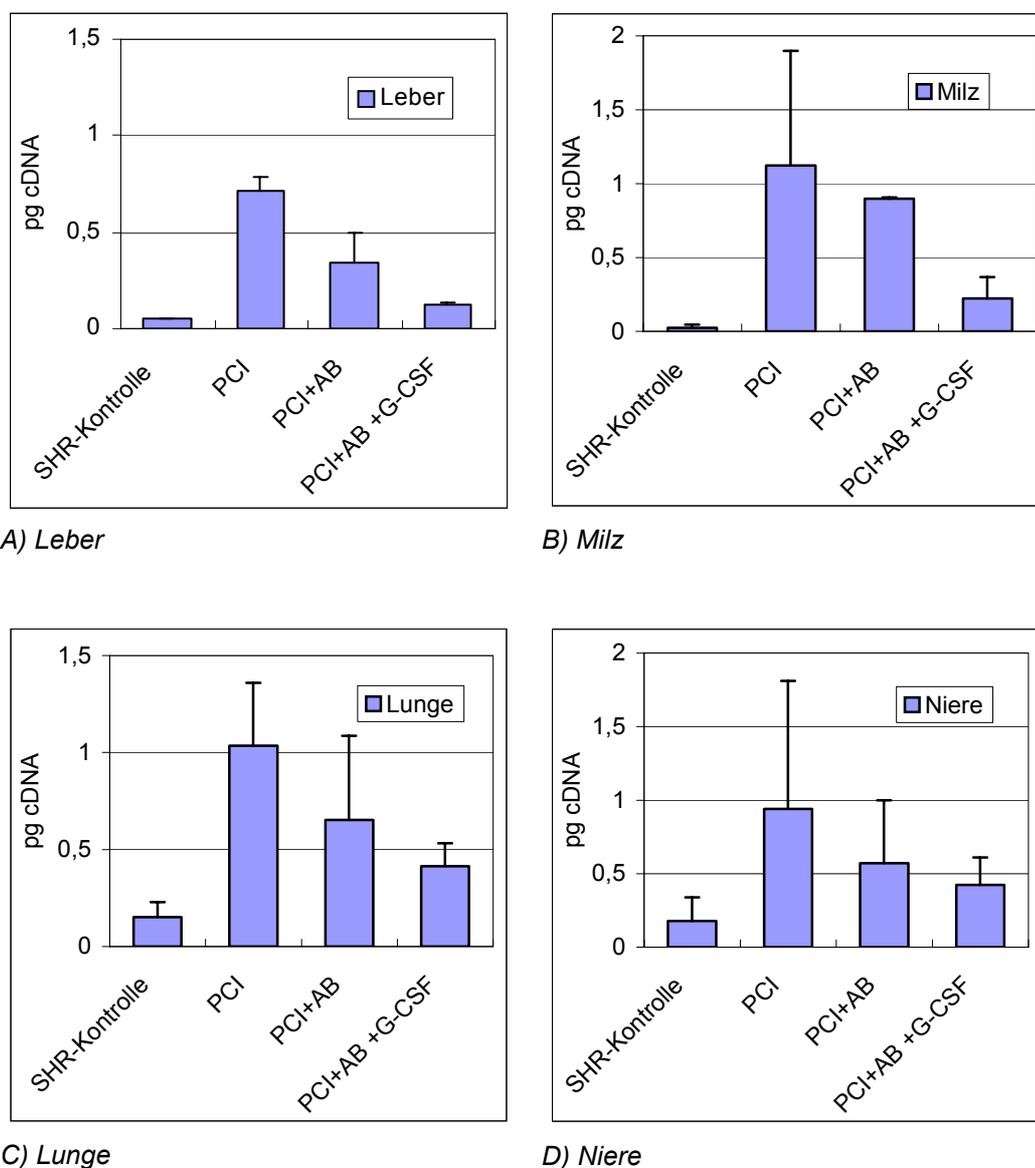
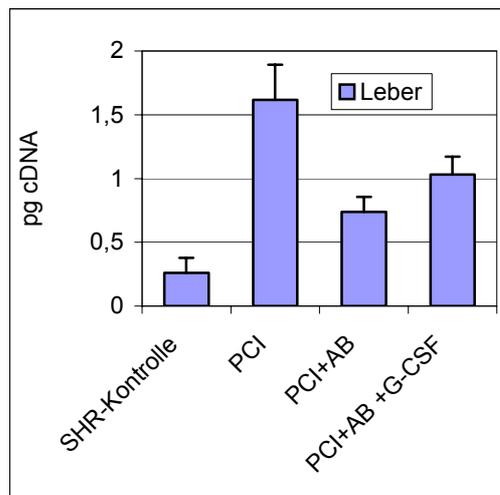


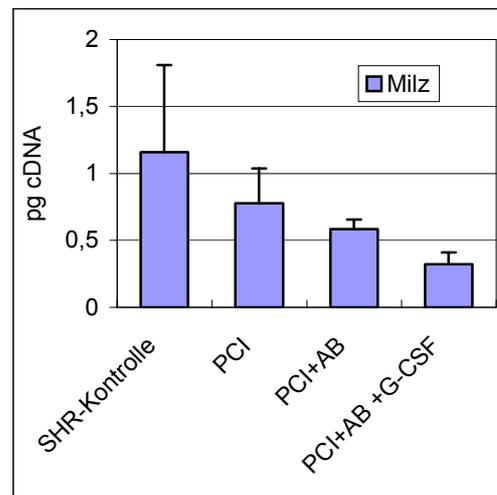
Abbildung 4.18 TNF- α Expression in der Leber, Milz, Lunge und Niere bei SHR Ratten mit PCI, PCI+AB und PCI+AB+G-CSF

IL-1 β

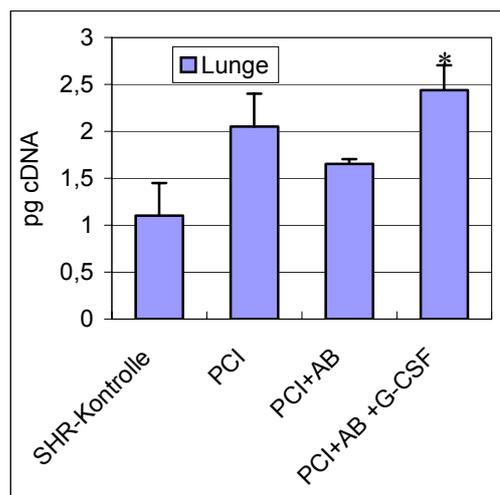
In der Leber, Lunge und Niere ist eine Zunahme von IL-1 β im Vergleich zu dem Kontrolltier in der Zytokin Expression bei den infizierten Tieren zu verzeichnen. Eine G-CSF Applikation zeigt keinen zusätzlichen Effekt in der Reduzierung von IL-1 β . Nur im Gewebe der Milz lässt sich ein Rückgang der Expression bei den mit G-CSF behandelten Tieren beobachten.



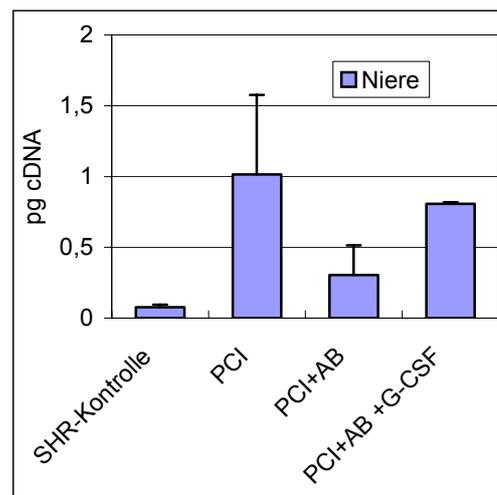
A) Leber



B) Milz



C) Lunge



D) Niere

Abbildung 4.19 IL-1 β Expression in der Leber, Milz, Lunge und Niere bei SHR Ratten mit PCI, PCI+AB und PCI+AB+G-CSF

* $P < 0,05$ vs. SHR Kontrolle

MIP-2

Ähnlich wie bei IL-6 hat die Gabe von Antibiotika und G-CSF einen Einfluss auf eine geringere Expression des Zytokins auf Organebene. Dies spiegelt sich in allen untersuchten Organen wieder. Lediglich bei der Milz lässt sich ein zusätzlicher Effekt des G-CSF erkennen.

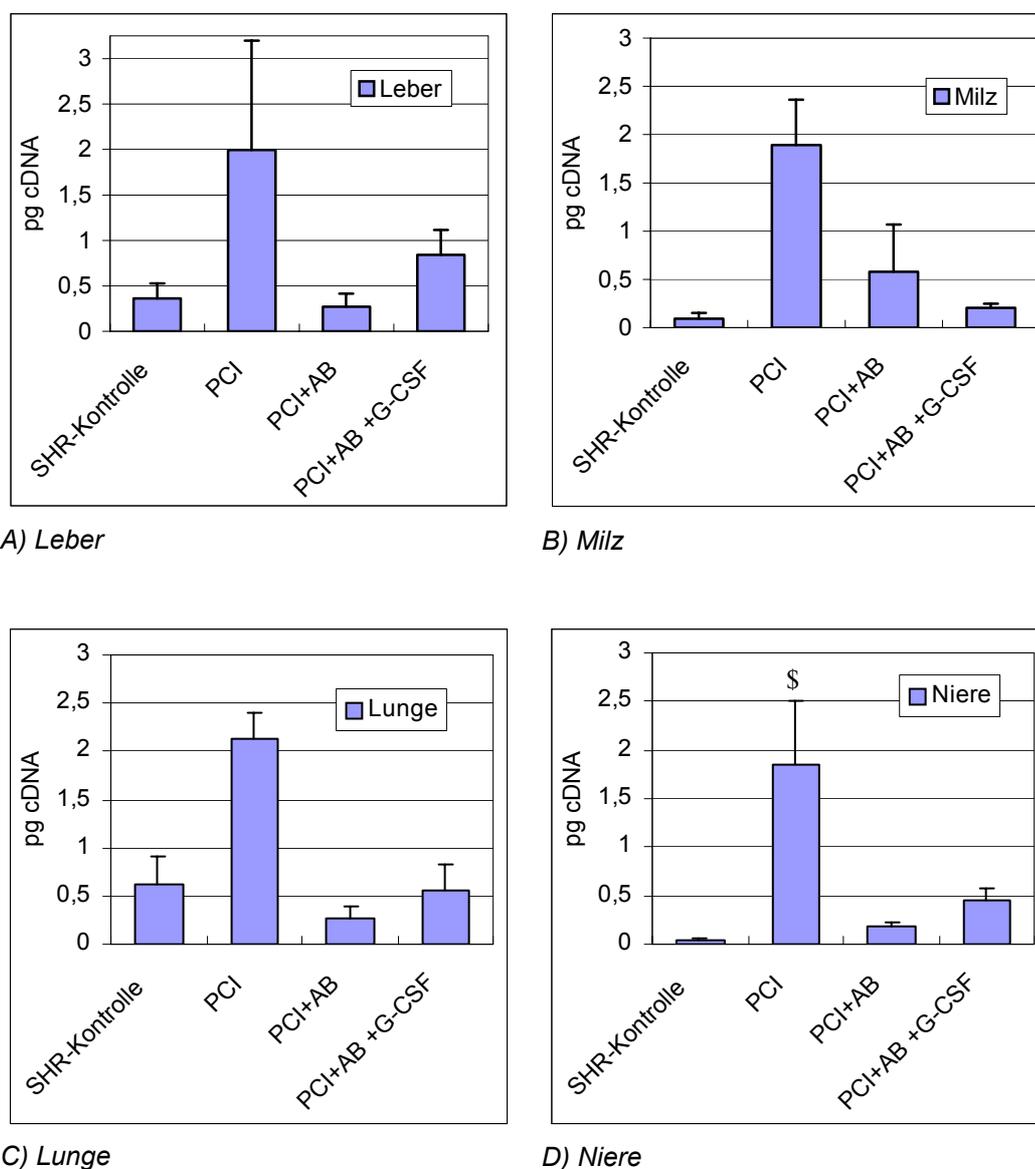
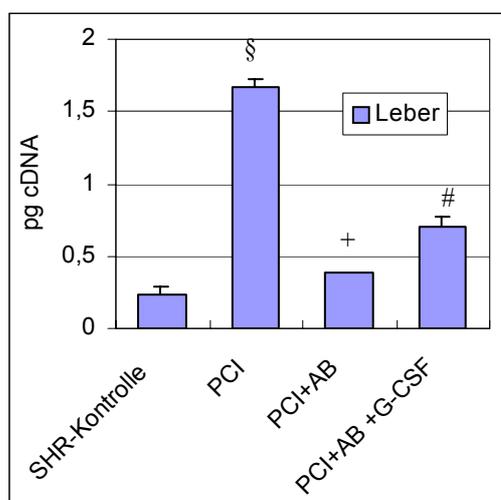


Abbildung 4.20 **MIP-2** Expression in der Leber, Milz, Lunge und Niere bei SHR Ratten mit PCI, PCI+AB und PCI+AB+G-CSF

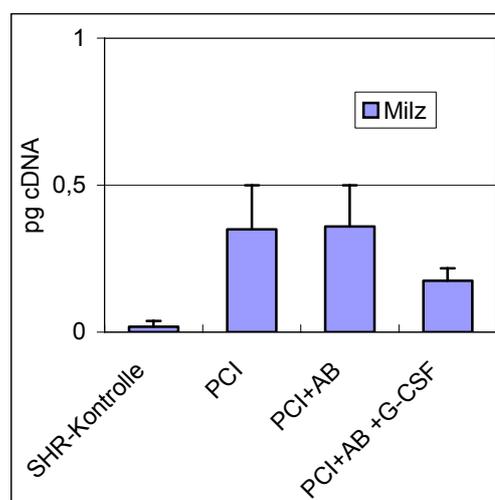
$^{\$}P < 0,05$ vs. SHR Kontrolle

IL-10

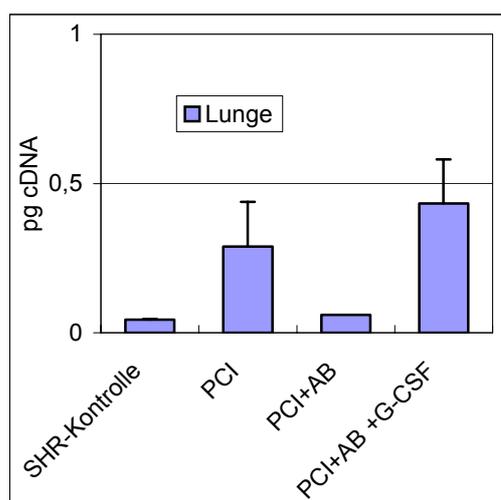
Die Werte von IL-10 sind bei den infizierten Tieren im Vergleich zu der Kontrolle deutlich erhöht. Sowohl unter Antibiotika, als auch unter zusätzlicher G-CSF Gabe ist eine signifikant geringere Expression von IL-10 bei Leber zu beobachten. In den Organen der Milz, Lunge und Niere kommt es bei G-CSF zu einem Anstieg der Zytokinwerte.



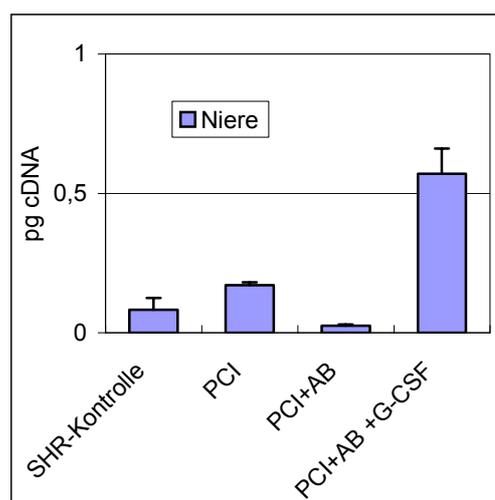
A) Leber



B) Milz



C) Lunge



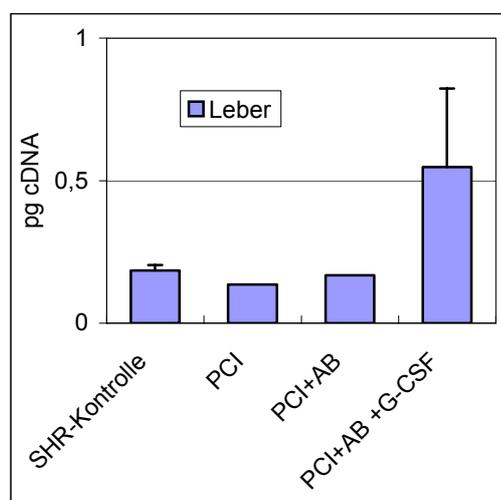
D) Niere

Abbildung 4.21 **IL-10** Expression in der Leber, Milz, Lunge und Niere bei SHR Ratten mit PCI, PCI+AB und PCI+AB+G-CSF

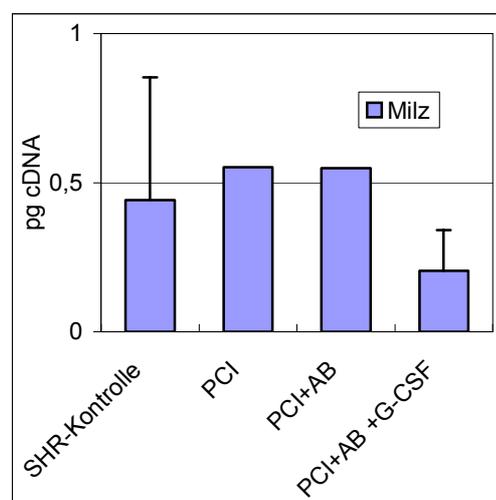
§ $p < 0,001$ vs. Leber Kontrolle, + $p < 0,001$ vs. PCI, # $p < 0,001$ vs. PCI

TGF- β

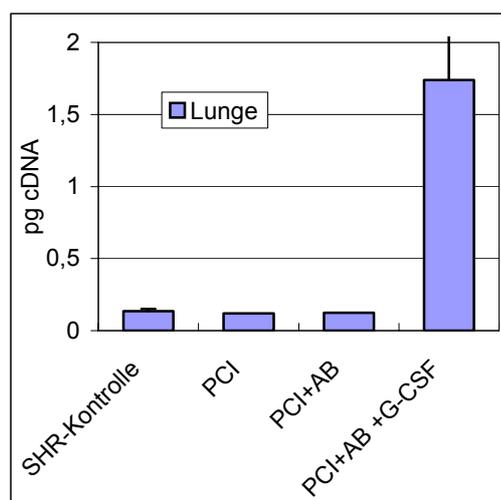
Bei der Leber, der Niere und der Lunge wirkt sich die Gabe von G-CSF zusätzlich zu den Antibiotika in einer deutlichen, jedoch nicht signifikanten Zunahme des antiinflammatorischen Zytokins TGF- β aus. Im Gewebe der Milz verringert sich die Expression des Zytokins unter G-CSF Gabe.



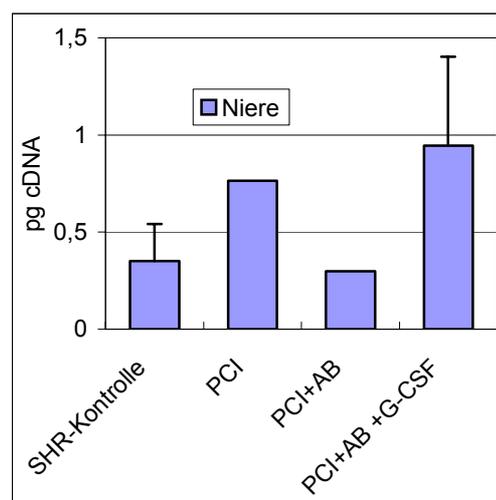
A) Leber



B) Milz



C) Lunge



D) Niere

Abbildung 4.22 TGF- β Expression in der Leber, Milz, Lunge und Niere bei SHR Ratten mit PCI, PCI+AB und PCI+AB+G-CSF

4.2.5 Zytokinexpression von SHR und Wistar Ratten im Vergleich

Im vorherigen Abschnitt wurde die Zytokinexpression bei SHR Ratten im PCI Modell unter Einfluss von verschiedenen Prophylaxen untersucht.

Im direkten Vergleich der Zytokinexpression zwischen den Stämmen der SHR und der Wistar Population im PCI Modell sind in der Hochdruckgruppe deutlich geringere Zytokinexpressionen für IL-1 β , MIP-2, IL-6, IL-10 und TGF- β zu beobachten. Eine Ausnahme ist jedoch für TNF- α erkennbar, das bei den SHR Ratten höhere Konzentrationen in Leber und Lunge erreicht. Die Abbildung 4.23 bis Abbildung 4.28 stellen im Vergleich die Zytokinexpression der Wistar-Ratten denen der SHR Ratten gegenüber, jeweils die der Kontrollgruppe als auch die Gruppe mit Antibiotika und G-CSF Prophylaxe.

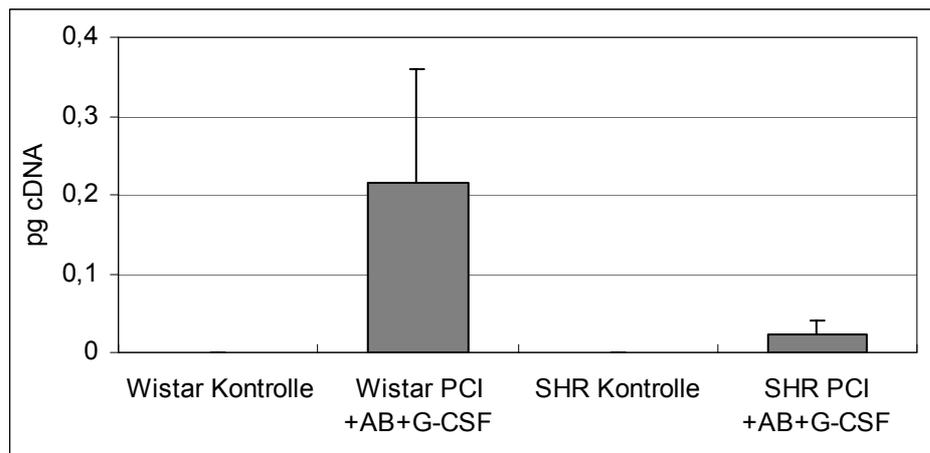
Alle Werte zeigen die Mittelwerte + SEM. Signifikante Ergebnisse konnten mit dem Mann-Whitney Test nicht gefunden werden.

IL-6

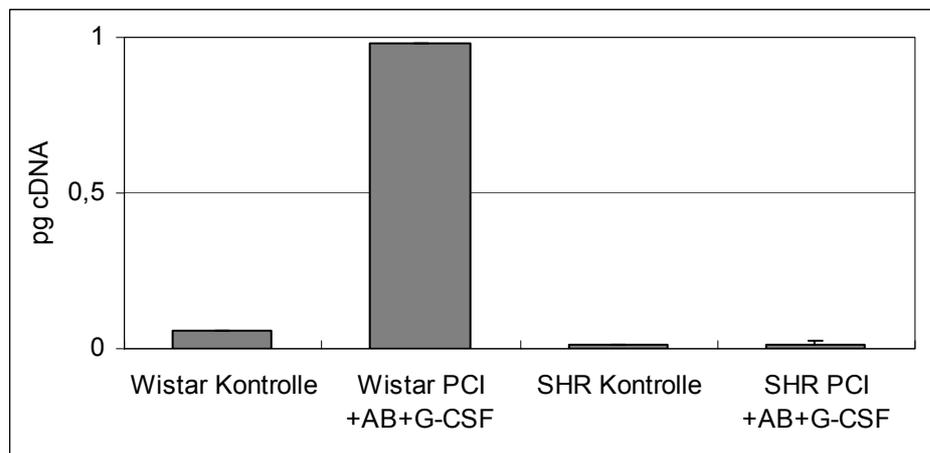
Während bei beiden Kontrollgruppen fast kein IL-6 nachweisbar ist, lässt sich für die infizierten Wistar Ratten ein deutlicher Anstieg an IL-6 DNA in allen drei Geweben erkennen. Bei den infizierten SHR Tieren ist keine gesteigerte IL-6 Expression auf molekularer Ebene nachweisbar. Ein signifikanter Unterschied wird bei den Leberwerten mit $p=0,51$ knapp verfehlt (siehe Abbildung 4.23).

TNF- α

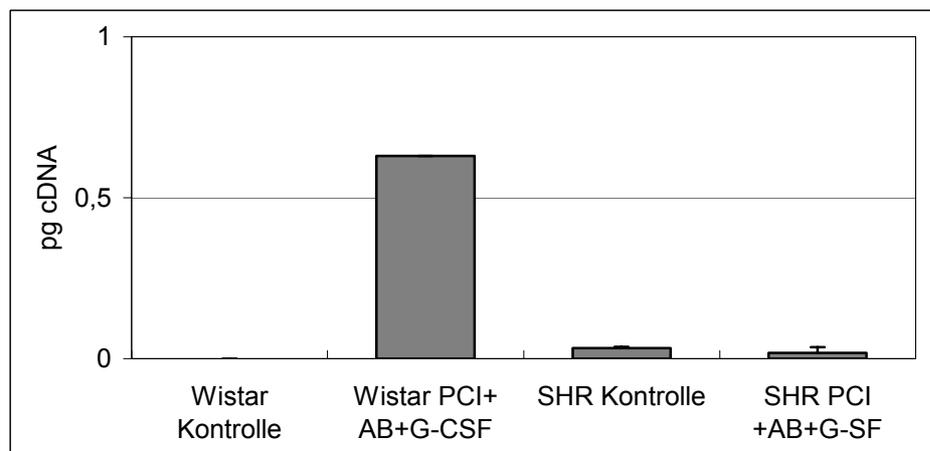
Eine Ausnahmestellung scheint es bei der TNF- α Expression zu geben. Als einziges untersuchtes Zytokin werden bei der SHR Gruppe im Vergleich zu den Wistar Ratten erhöhte Werte besonders bei Leber und Lunge deutlich. Ein erhöhter Ausgangswert zeigt sich allerdings schon in der Kontrollpopulation (siehe Abbildung 4.24). Signifikante Unterschiede ergeben sich nicht.



A) Leber

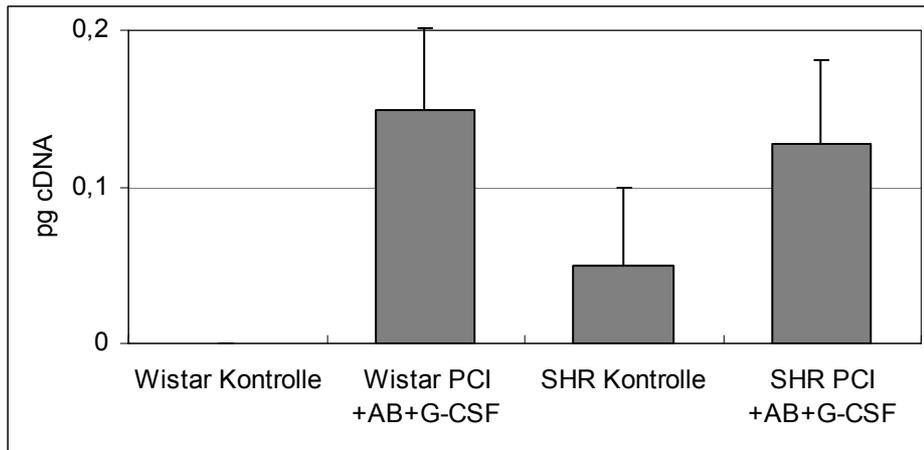


B) Milz

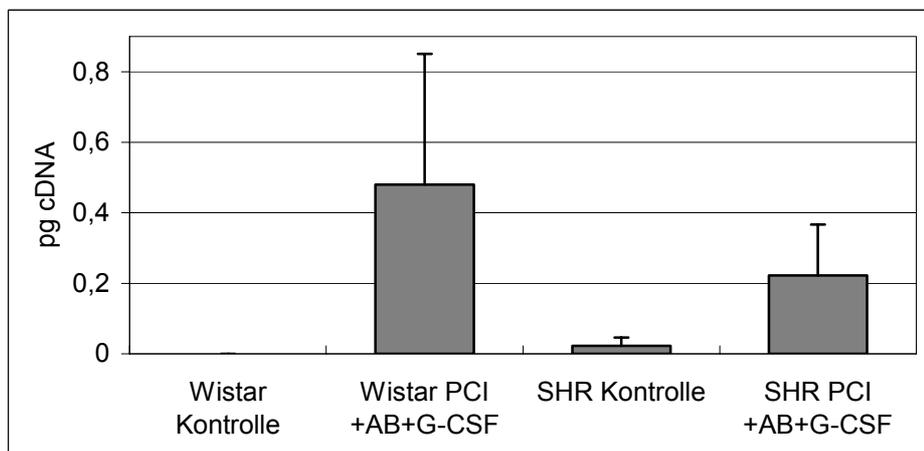


C) Lunge

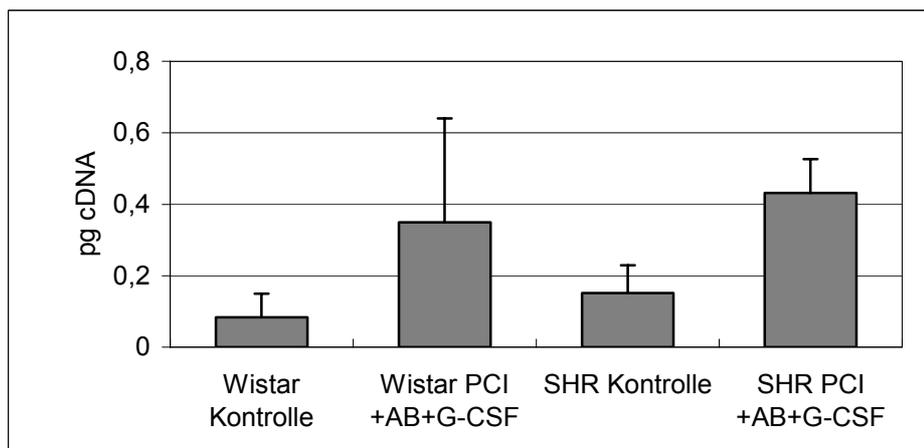
Abbildung 4.23 **IL-6** Zytokinexpression nach 24 h von Leber, Milz und Lunge von Wistar und SHR Ratten mit PCI, Antibiotika (Cefuroxim/Metronidazol 3,5/10ml/kgKG) und dreimaliger G-CSF Gabe (20µg/kgKG) im Vergleich



A) Leber



B) Milz



C) Lunge

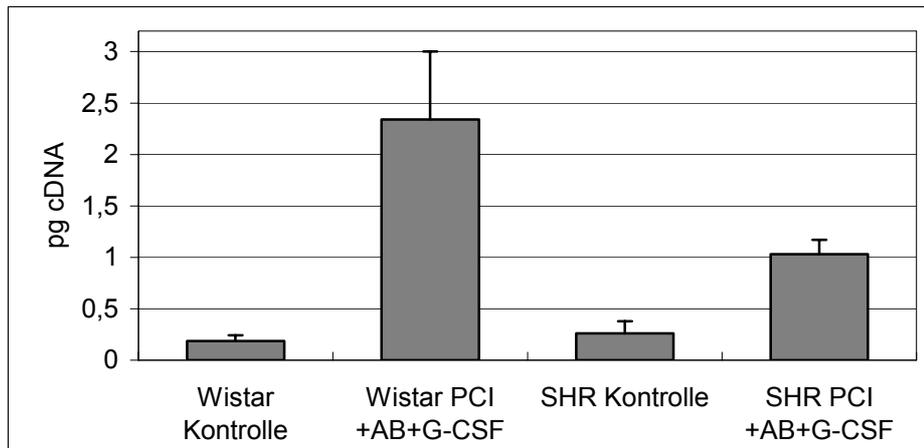
Abbildung 4.24 **TNF- α** Zytokinexpression nach 24 h von Leber, Milz und Lunge von Wistar und SHR Ratten mit PCI, Antibiotika (Cefuroxim/Metronidazol 3,5/10ml/kgKG) und dreimaliger G-CSF Gabe (20 μ g/kgKG) im Vergleich

IL-1 β

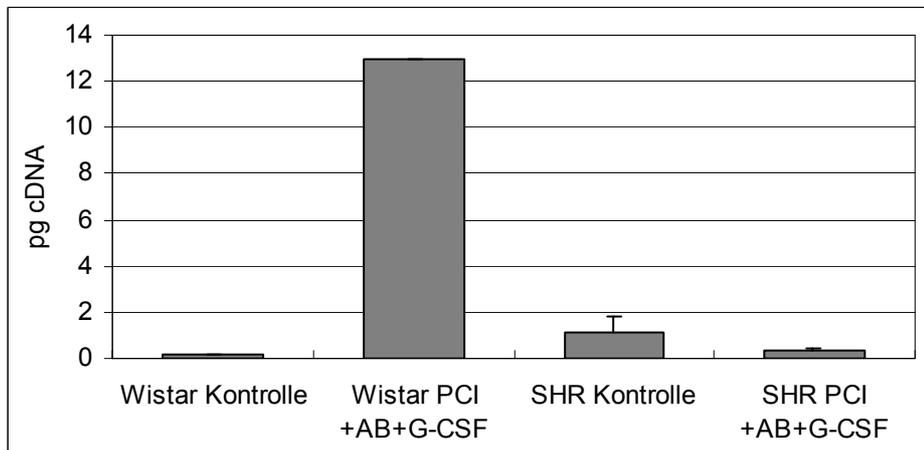
Bei der Betrachtung der IL-1 β Gewebekonzentrationen fällt ein leicht erhöhter Ausgangswert bei der SHR gegenüber der Wistar Kontrollgruppe auf. Deutlich sichtbar aber wird die erhöhte IL-1 β Konzentration in den Organen der Wistar-Ratten nach Infektion. Die Milz weist eine gut 40fach höhere Konzentration an IL-1 β DNA auf, in der Leber und der Lunge ist die Konzentration im Vergleich zu den operierten SHR Ratten immerhin noch 2-3fach erhöht (siehe Abbildung 4.25). Ein signifikanter Unterschied wird bei den Leberwerten mit $p=0,053$ knapp verfehlt.

MIP-2

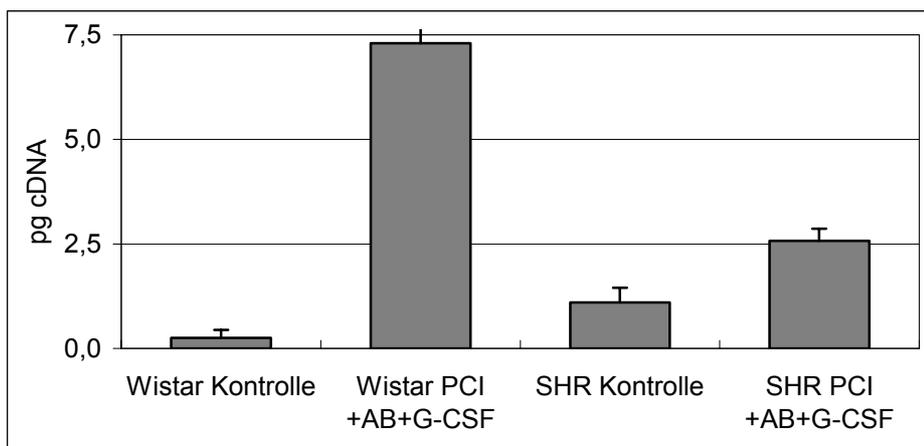
Auch bei der MIP-2 Expression zeigen die infizierten SHR Ratten eine 2-7fach geringere Zytokinexpression in Leber, Milz und Lunge gegenüber der Wistar Vergleichsgruppe (siehe Abbildung 4.26). Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.



A) Leber

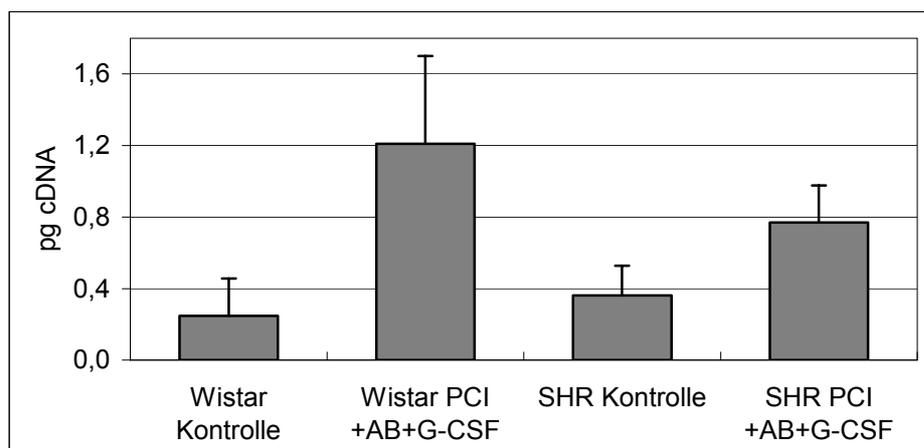


B) Milz

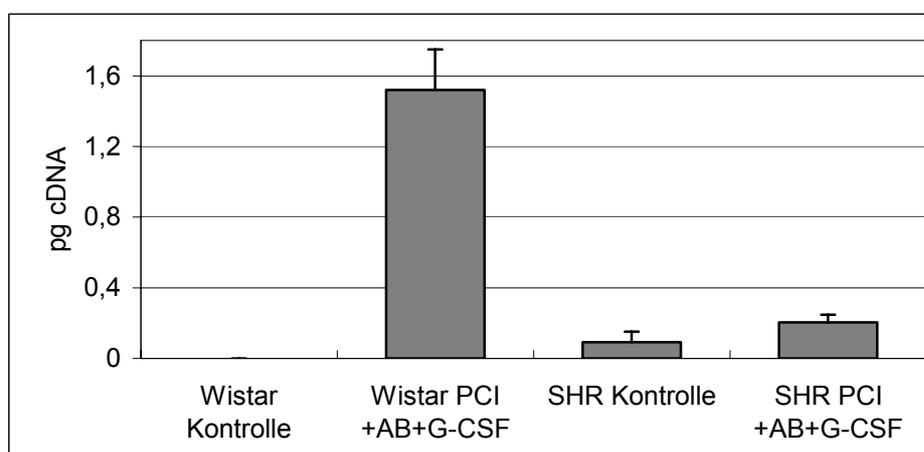


C) Lunge

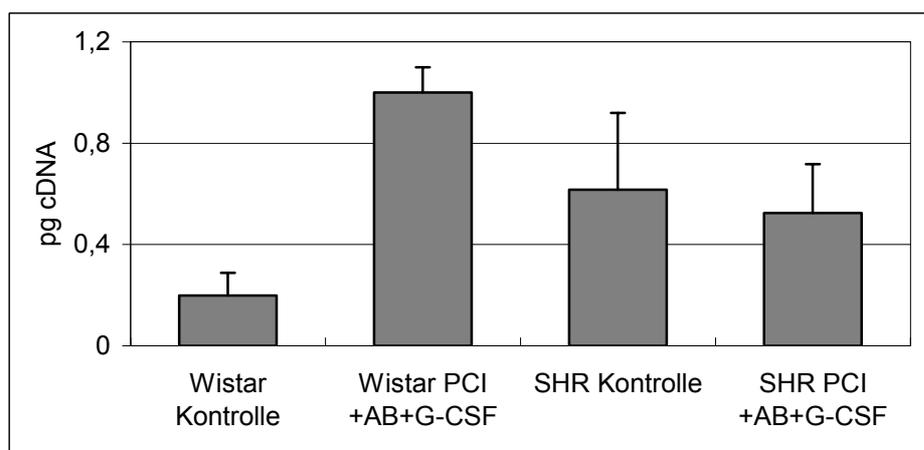
Abbildung 4.25 **IL-1 β** Zytokinexpression nach 24 h von Leber, Milz und Lunge von Wistar und SHR Ratten mit PCI, Antibiotika (Cefuroxim/Metronidazol 3,5/10ml/kgKG) und dreimaliger G-CSF Gabe (20 μ g/kgKG) im Vergleich



A) Leber



B) Milz



C) Lunge

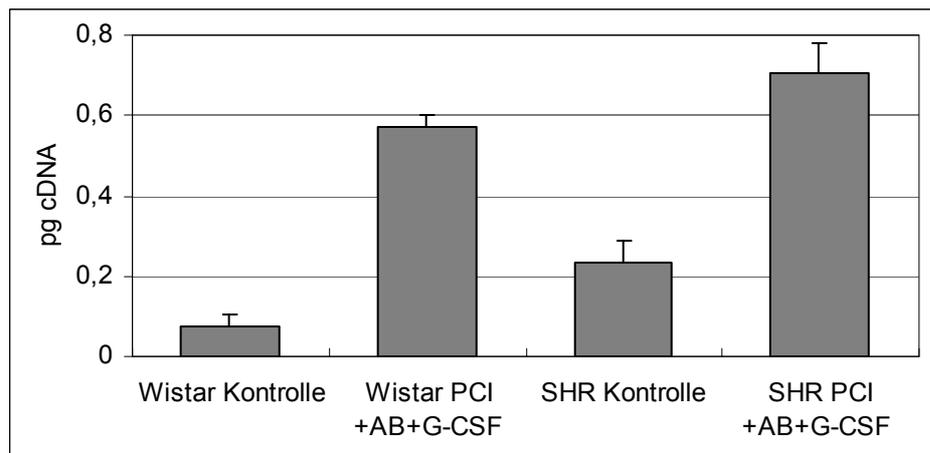
Abbildung 4.26 **MIP-2** Zytokinexpression nach 24 h von Leber, Milz und Lunge von Wistar und SHR Ratten mit PCI, Antibiotika (Cefuroxim/Metronidazol 3,5/10ml/kgKG) und dreimaliger G-CSF Gabe (20µg/kgK) im Vergleich

IL-10

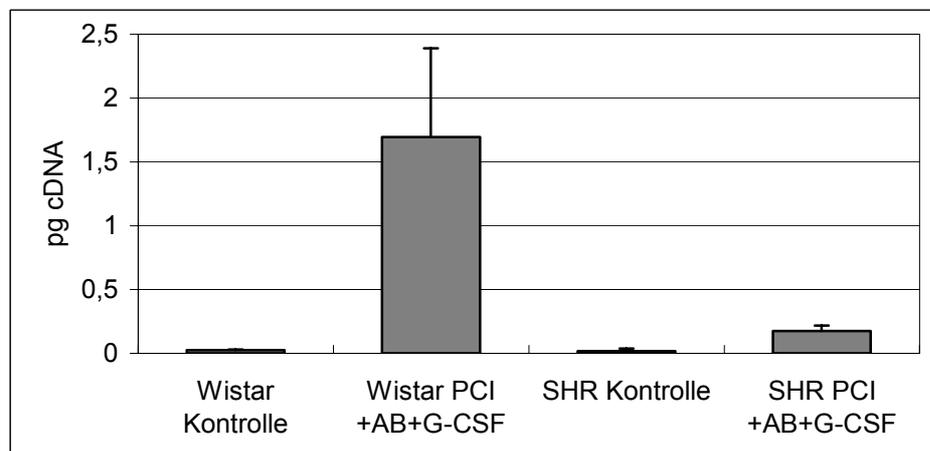
Wie bei den vorigen Zytokinen verhält es sich mit der IL-10 Gewebeexpression ähnlich. Einen 5-9fach erhöhten Anstieg in der Lunge und der Milz der Wistar Population im Vergleich zu den SHR Ratten wird deutlich. In der Leber findet sich auch bei der SHR Gruppe nach Infektion deutlich erhöhte Werte (siehe Abbildung 4.27). Signifikante Unterschiede ergeben sich nicht. Mit jeweils $p=0,53$ wurde ein signifikanter Unterschied bei den Milz- und Lungenwerten knapp verfehlt.

TGF- β

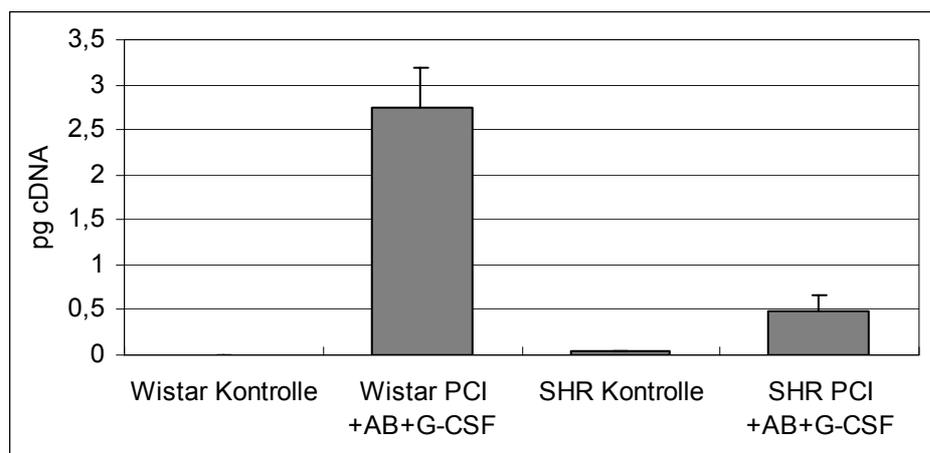
Für die DNA-Konzentration von TGF- β werden die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit Infektion nicht so deutlich. Lediglich in der Milz findet sich in der SHR Population eine wesentlich geringere Konzentration an TGF- β . Jedoch wird auch hier kein signifikanter Unterschied erreicht (siehe Abbildung 4.28).



A) Leber

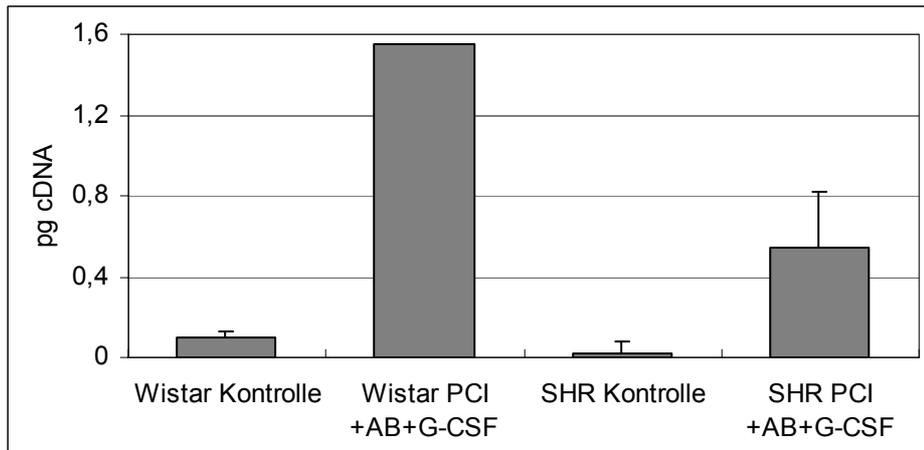


B) Milz

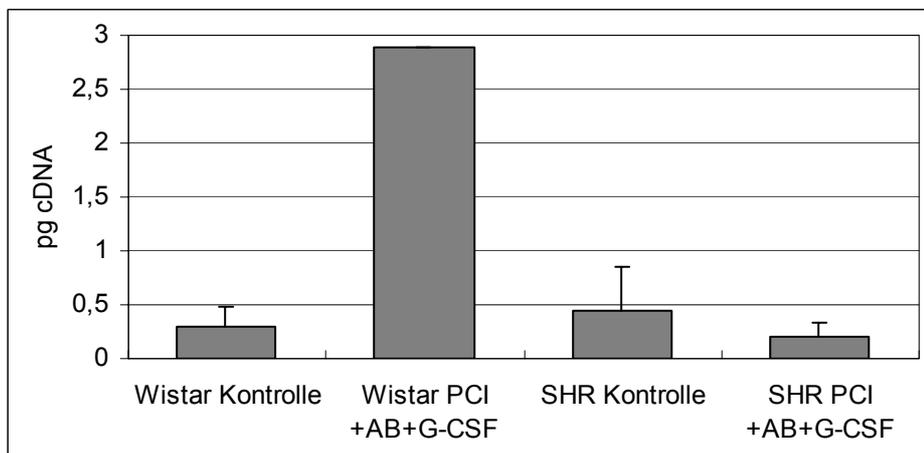


C) Lunge

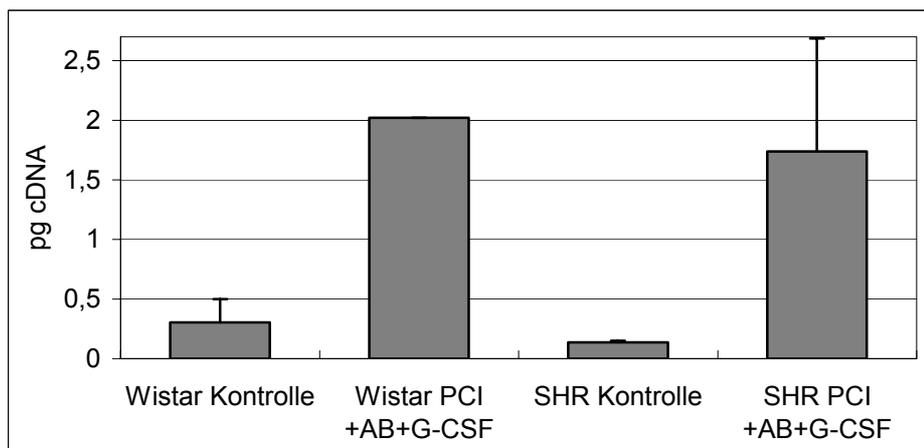
Abbildung 4.27 **IL-10** Zytokinexpression der Leber, Milz und Lunge von Wistar und SHR Ratten mit PCI, Antibiotika (Cefuroxim/Metronidazol 3,5/10ml/kgKG) und dreimaliger G-CSF Gabe (20µg/kgKG) im Vergleich



A) Leber



B) Milz



C) Lunge

Abbildung 4.28 **TGF- β** Zytokinexpression der Leber, Milz und Lunge von Wistar und SHR Ratten mit PCI, Antibiotika (Cefuroxim/Metronidazol 3,5/10ml/kgKG) und dreimaliger G-CSF Gabe (20 μ g/kgKG) im Vergleich

5 Diskussion

Die postoperative Sepsis mit septischem Schock ist trotz chirurgischer Herdsanierung, Prophylaxe und Therapie mit Antibiotika sowie intensivmedizinischer Behandlung eine schwerwiegende Komplikation bei Patienten mit operativen Eingriffen oder Trauma. Die Mortalitätsrate konnte trotz verbesserten Bedingungen in der operativen Behandlung, moderner intensivmedizinischer Betreuung und antibiotischer Therapie nicht wesentlich gesenkt werden. Sie ist mit 20% - 50% immer noch auf einem hohen Niveau (Bone, 1991a; Friedman *et al*, 1998). Ergebnisse unterschiedlicher Studien zeigen, dass die bakterielle Infektion nur ein Bestandteil in der Entwicklung der Peritonitis oder Sepsis ist. In einem komplizierten Netzwerk von systemischen, immunologischen Regulationsmechanismen spielen neben den verschiedenen bakteriellen Komponenten sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine in der Pathogenese der Sepsis eine entscheidende Rolle (Heeg *et al*, 1995; Bone, 1991b; Stadler *et al*, 1995; Wittmann *et al*, 1996; Baxter, 1997; Baue, 1992; Bone, 1995). Dies eröffnet vielfältige Möglichkeiten für neue pharmakologisch-therapeutische Interventionen bei der Vorbeugung oder Behandlung Sepsis gefährdeter Patienten. Neue Strategien zur medikamentösen Beeinflussung der Sepsis und deren Folgen bestehen in der Modulation der Expression, der Verteilung und der Wirkung von verschiedenen Zytokinen wie z.B. IL-1, IL-6, IL-10 und TNF- α (Bone *et al*, 1987; Greenman *et al*, 1991; Ziegler *et al*, 1991; Dinarello *et al*, 1993; Fisher *et al*, 1994; Abraham *et al*, 1998; Marchant *et al*, 1996).

Um neue Therapiestrategien von Tiermodellen erfolgreich in eine klinische Studie übertragen zu können, wird eine möglichst adäquate Simulation der klinischen Situation auf Tierebene gefordert (Bauhofer *et al*, 1995; Eidelman & Sprung, 1995; Bauhofer *et al*, 1999a). Ein Grund für das Scheitern von klinischen Studien, die dieses in den zugrunde liegenden Tiermodellen nicht ausreichend berücksichtigten, war unter anderem, dass

diese Studien die Voraussetzungen eines komplexen, an die klinischen Bedingungen angepassten Tiermodells nicht erfüllten. Mit dem Ziel, die Interaktionen von verschiedenen klinischen Maßnahmen wie in einer randomisierten klinischen Studie in einem Tiermodell umfassend zu berücksichtigen, wurde von *Lorenz et al.* ein Infektionsmodell entwickelt (*Lorenz et al.*, 1994). Dieses Modell wurde unter Berücksichtigung der Kriterien des CONSORT-Statements zum Konzept der klinik-modulierenden, randomisierten Tierstudien (CMRT's) weiterentwickelt (*Bauhofer et al.*, 1998a; *Bauhofer et al.*, 2002a; *Bauhofer et al.*, 2004b). Das Konzept dieser Studien erreicht ein höheres Maß an Komplexität im Gegensatz zu herkömmlichen Studien.

Die Anlehnung an die klinische Komplexität erlaubt eher Rückschlüsse auf die Verwendung neuer Therapieformen im klinischen Alltag (*Junge et al.*, 2002). Dieses Modell wurde bis jetzt schon an mehreren hundert Ratten eingesetzt, welche als Grundlage zur Planung und Durchführung einer klinischen Multizenterstudie diente (*Lorenz et al.*, 2001; *Bauhofer et al.*, 2001a).

In den früheren Studien wurde unter anderem deutlich, dass das komplexe Zusammenspiel von chirurgischem Eingriff mit abdomineller Kontamination mit menschlichen Stuhl Bakterien, Antibiotikaprophylaxe und Behandlung mit G-CSF ganz unterschiedliche Auswirkungen auf das Überleben der Tiere hatte. Der Einsatz verschiedener Antibiotika, die zur Peritonitisprophylaxe in Kliniken oft eingesetzt werden, zeigte in Kombination mit G-CSF starke Unterschiede in der Wirkung bezogen auf die Mortalität (*Bauhofer et al.*, 2004b; *Bauhofer et al.*, 1996a).

Bei der Betrachtung des Wiederherstellungsergebnisses (hier Mortalität) nach einem operativen Eingriff muss aber auch das präoperative Risikoprofil eines jeden Patienten berücksichtigt werden. Üblicherweise wird der Patient dafür vor der Operation durch den Anästhesisten mit dem ASA-Score klassifiziert (ASA = American Society of Anesthesia). Patienten mit

den ASA-Klassen I und II haben deutlich weniger Vorerkrankungen als Patienten, die nach ASA III und IV eingestuft werden (Lorenz *et al*, 1987).

Untersuchungen an Intensiv-Patienten haben gezeigt, dass Patienten, die nach einem großen chirurgischen Eingriff (z.B. kolorektale Operationen) Komplikationen bis hin zu einer Sepsis entwickeln, meist eine Vielzahl von Vorerkrankungen aufweisen. Zu den häufigen Vorerkrankungen zählen kardiopulmonale Störungen, Gefäßerkrankungen, Diabetes mellitus sowie Blutverlust vor oder während der Operation (Chalita-Manzur & Hermosillo-Sandoval, 2001; Pavlidis *et al*, 2001; Martinez *et al*, 2000). Dies muss bei Planungen von klinischen Studien berücksichtigt werden, um die Ergebnisse richtig interpretieren zu können. Für die am Marburger Klinikum und anderen Krankenhäusern durchgeführte Studie wurde dafür in weiteren CMRT-Studien an Ratten der Einfluss von Risikofaktoren auf die Entwicklung einer Sepsis und die Überlebensrate untersucht. Als Risikofaktoren wurden prä- und intraoperativer Blutverlust und Stoffwechselstörungen in diabetischen BB Ratten untersucht (Bauhofer *et al*, 1998b; Bauhofer *et al*, 2001a). Ratten mit diesen Risikofaktoren hatten eine deutlich erhöhte Mortalitätsrate gegenüber einer Wistar Normalpopulation. Auch die arterielle Hypertonie spielt bei der Entstehung von Komplikationen im operativen Alltag eine Rolle (Riou *et al*, 1992; Martinez *et al*, 2000; Gol *et al*, 1998).

In dieser Arbeit wurde die Überlebenszeit von SHR, Dahl Salz-sensitiven und Wistar Ratten in dem etablierten Tiermodell (CMRT's) zur fäkalen, abdominalen Sepsis unter Antibiotika- und G-CSF Prophylaxe untersucht und die resultierende Veränderung der Zytokinkonzentration im Blut gemessen. In einem weiteren Versuch wurden Organproben von Ratten nach peritonealer Infektion entnommen und die Expression von verschiedenen Zytokinen auf molekularer Ebene der einzelnen Gewebe untersucht.

Die Ergebnisse zeigen für den Risikofaktor der Hypertension ein sehr viel gemischteres Bild, als es bei den anderen untersuchten Risikofaktoren deutlich wurde. Genetische Faktoren der verschiedenen Rattenstämme und das Ausmaß der klinischen Interventionen haben einen Einfluss auf die infektionsbedingte Mortalität. Im ersten Versuch mit geringer Komplexität ohne medikamentöse Prophylaxe konnte kein signifikanter Unterschied im Überleben der Ratten der zwei unterschiedlichen Stämme beobachtet werden ($p=0.17$ im χ^2 -Test).

Wurde die Komplexität jedoch erhöht und der klinischen Realität angepasst, so trat ein deutlicher Unterschied beim Überleben der Ratten der verschiedenen Stämme zu Tage. Dies wird in den Ergebnissen des zweiten und dritten Versuchs erkennbar. Im Versuch 2 wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Stämmen gefunden, mit einer erhöhten Überlebensrate der SHR Tiere trotz Bluthochdrucks ($p=0.01$ im χ^2 -Test). Im Versuch 3 mit den Dahl Ratten, die eine geringere Überlebensrate aufweisen, wurde hingegen ein Trend zu einem erhöhten Risiko bei den DS Tieren mit Bluthochdruck ersichtlich. Dies macht deutlich, dass der Bluthochdruck an sich nicht automatisch für ein schlechteres Outcome verantwortlich gemacht werden kann. Andere Faktoren müssen für das unterschiedliche Überlebensverhalten der Rattenstämme einen Einfluss haben.

Eine Möglichkeit besteht in einer unterschiedlichen Immunantwort der Ratten auf die infektionsauslösenden Erreger. Unter der Vielzahl von gewebetoxischen Substanzen, die bei einer polymikrobiellen bakteriellen Infektion freigesetzt werden, spielt das Endotoxin eine bedeutende Rolle. In einer französischen Studie wurde kürzlich gezeigt, dass SHR Ratten bei einer peritonealen Sepsis gegenüber Endotoxin resistent sind (Bernard *et al*, 1998). Dieser Effekt ließ sich nicht auf den erhöhten Bluthochdruck der Ratten zurückführen. Die SHR Ratten, die mit einem Bluthochdruckmedikament, einem arteriellen Vasodilatator (Hydralazin), normotensiv eingestellt wurden, zeigten sich genauso resistent bei einem Endotoxin Schock wie unbehandelte SHR Ratten. Während des Zustandes der Endotoxämie

wird von den durch LPS aktivierten Immunzellen neben inflammatorischen Mediatoren auch Stickstoffmonoxid (NO) produziert (Nemeth *et al*, 1998; Cartmell *et al*, 2000). In vivo gab es in der Plasma Konzentration von NO₂/NO₃ nach LPS Injektion keinen signifikanten Unterschied zwischen den SHR und den Wistar Stämmen, weder vor noch nach einer LPS Stimulation (Bernard *et al*, 1998). Weiterhin gab es zwischen den SHR und den Wistar Tieren keinen wesentlichen Unterschied in der NO Produktion im Vollblut nach LPS Stimulation in vitro.

Auch bei den Untersuchungen auf lokaler mRNA Ebene wird zwischen den Stämmen ein unterschiedliches Zytokin Profil deutlich. Die verschiedene Zytokinexpression könnte einen Einfluss auf das unterschiedliche Überleben der Ratten haben. Bei den Tieren des SHR Stammes waren sowohl die *systemischen (Protein)* als auch die lokalen (mRNA) proinflammatorischen Zytokin Konzentrationen nach PCI niedriger.

Im Gewebe der Leber wurden in unseren Untersuchungen für TNF- α , IL-6, MIP-2 und IL-1 bei den Ratten des SHR Stammes nach PCI eine geringere Zytokinexpressionen gefunden. Auch in den Organen der Milz und Lunge wurde von diesen Mediatoren weniger exprimiert. Bei den Dahl Ratten konnte bei der lokalen Zytokin mRNA Expression in der Leber ebenso niedrigere Werte für die proinflammatorischen TNF- α , IL-1, IL-6 und MIP-2 gefunden werden. Über die Funktionen dieser Zytokine lassen sich pathophysiologisch durchaus veränderte Reaktionen erklären: Als wichtige Mediatoren in der Temperaturregulation spielen besonders IL-1, IL-6 und TNF- α eine Rolle im Organismus (Luheshi & Rothwell, 1996; Leon *et al*, 1998; Cartmell *et al*, 2000; Klir *et al*, 1993).

In SHR Ratten wird im Vergleich zu Brown Norway Ratten ein geringerer Anstieg in der Körpertemperatur nach LPS Injektion beobachtet (Pausova *et al*, 1999). Genetisch wurde ein chromosomales Segment (SHR.1N) identifiziert, das eine verminderte TNF- α Produktion vermuten läßt und daher für die veränderte Temperaturregulation verantwortlich gemacht wird. Nicht nur bei septischen Tieren sondern auch bei Menschen wird

eine veränderte Reaktion im Temperaturverhalten beobachtet. Sehr schwer infizierte Individuen zeigen eine stark ausgeprägtere Dysregulation in der Körpertemperatur als gesündere Probanden (Malone *et al*, 2001).

Während *Bernard et al.* (Bernard *et al*, 1998) sowohl systemisch im Plasma, als auch im LPS stimulierten Blut niedrigere Werte für IL-6 in der SHR Population nachweisen konnten, ließen sich in unseren Untersuchungen keine Unterschiede zwischen den SHR und Wistar Stamm für Plasma IL-6 finden. Eine Korrelation zwischen IL-6 und der Mortalität wurde bereits bei Patienten mit septischen Schock und in Tiermodellen zur Endotoxinämie beschrieben (Antonelli *et al*, 1995; Yoshimoto *et al*, 1992). Auch bei Patienten mit einem septischen Syndrom werden massiv erhöhte IL-6 Werte gefunden (Damas *et al*, 1992; Casey *et al*, 1993). *Kelly* und *Cross* konnten zeigen, dass ein Rückgang von IL-6 nach 10 Stunden bei nicht-letal infizierten Mäusen einer symptomatischen Verbesserung entsprach, während hoch bleibende IL-6 Plasmaspiegel bei letal infizierten Mäusen bis zu deren Tod beobachtet wurden (Kelly & Cross, 1992). Während sich niedrigere Plasma IL-6 Konzentrationen bei den SHR Ratten in den Studien dieser Arbeit nicht nachweisen ließen, so findet sich aber eine Übereinstimmung in einer niedrigeren Expression auf Gewebeebene von IL-6 mit *Nakamura*. Er beschreibt eine geringere Produktion von IL-6 in dem Gewebe der Niere von SHR im Gegensatz zu Wistar Ratten unter dem Einfluss von operativen Stress und sympathischer Stimulation (Nakamura *et al*, 1996).

In dieser Versuchsserie wurde das proinflammatorische Zytokin TNF- α nur auf Organ Expressionsebene untersucht. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zu Plasma Werten von TNF- α bei den verschiedenen Rattenstämmen. *Bernard et al.* fand zwischen den SHR und Wistar Ratten keinen signifikanten Unterschied von TNF- α , während *Sirén* und *Hagenbeck et al.* bei den SHR Ratten erhöhte Spiegel von TNF- α sowohl im Serum, als auch im Liquor nach nicht-letaler LPS Injektion beschreiben

(Siren *et al*, 1992; Hallenbeck *et al*, 1991). In Wistar Ratten konnte von unser Gruppe ein signifikanter Anstieg von TNF- α systemisch und in der Peritonealflüssigkeit im PCI-Modell nachgewiesen werden (Lorenz *et al*, 1994; Bauhofer *et al*, 2002a).

Auch wenn TNF- α als proinflammatorischer Mediator eine entscheidende Rolle bei einer Infektion mit Endotoxin und der Entwicklung einer Sepsis spielt, spiegelt die Höhe des zirkulierende TNF- α im Plasma nicht unbedingt die lokale TNF- α Expression in den Geweben wieder. So konnte Kumins *et al*. nachweisen, dass die Leber einen wichtigen Ort in der lokalen und systemischen TNF- α Produktion darstellt, während die Milz nicht entscheidend zu höheren Plasma TNF- α Werten beiträgt (Kumins *et al*, 1996).

Auch von Hadjiminias *et al*. wird beschrieben, dass Patienten mit Sepsis vergleichsweise niedrige Werte von Serum TNF- α aufweisen können. Er äußerte die Annahme, dass TNF- α bei einer schweren Infektion mehr lokal als parakriner Mediator wirkt und zu lokalen Gewebe Schädigungen führt. In einem CLP Modell an Ratten fand er einen signifikanten Anstieg von TNF- α mRNA Expression in der Leber und der Lunge, nicht jedoch in der Milz (Hadjiminias *et al*, 1994). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass lokal produziertes TNF- α einen entscheidenden Beitrag bei der Schädigung von Organgewebe und der Entstehung eines Multi Organ Versagens im septischen Verlauf darstellt. Die signifikant geringere TNF- α Produktion besonders in der Leber als Hauptbildungsort des proinflammatorischen Zytokins bei SHR Ratten kann daher eine Ursache für die geringere Mortalität gegenüber der Wistar Ratten sein. Diese Befunde stimmen mit unseren Untersuchungen zum TNF- α weitgehend überein.

Die biologische Hauptfunktion von IL-1 β stellt die Stimulation von T-Helferzellen und die Aktivierung von B-Zellen dar. Daneben spielt es eine wichtige Rolle im komplexen Mediatorennetzwerk und wird in seiner Funktion durch verschiedene Mechanismen in engen Grenzen gehalten (Dinarello, 1996; Dinarello, 1988). Als direkter Gegenspieler sind vor allem die IL-1 β

Rezeptor Antagonisten (IL-1ra) und TGF- β von Bedeutung. Bei der Pathogenese der essentiellen Hypertonie wurde ein verändertes Profil von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen beschrieben. Nach einer ex vivo Blut Stimulation mit LPS konnte bei Patienten mit essentieller Hypertonie erhöhte Werte der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 gefunden werden, verglichen mit einer Kontrollgruppe (Peeters *et al*, 2001). Bei dieser Studie wurden Werte von IL-1 β nur auf der Ebene der Organexpression hin untersucht. Hier konnte für die Gruppe der SHR Gruppe mit PCI eine wesentliche geringere Expression bei Leber, Milz und Lunge als im Vergleich zur Wistar Gruppe gefunden werden. Dass ein genetischer Allel Polymorphismus von IL-1 β einen Einfluss auf den Verlauf bei entzündlichen Prozessen hat, konnten Ma *et al*. zeigen. Bestimmte Zusammensetzungen der IL-1 β Allele A2, B2 und RN2 gehen mit einem deutlich schwereren Verlauf einer Sepsis und eine erhöhte Mortalitätsrate einher (Ma *et al*, 2002).

Neben der Erhöhung der Körpertemperatur spielen lokale Abwehrmechanismen bei dem Schutz und der Bekämpfung des Organismus bei einer Infektion eine entscheidende Rolle (Wolpe & Cerami, 1989). Einen starken chemotaktische Reiz auf Granulozyten üben die C-X-C Chemokine, zu denen das MIP-2 zählt, aus (Driscoll, 1994; Mercer-Jones *et al*, 1999). Unter anderem werden diese proinflammatorischen Chemokine durch IL-6 und TNF- α induziert (Kalyanaraman *et al*, 1998). In einem CLP Modell zur septischen Peritonitis konnten stark erhöhte Werte von MIP-2 nicht nur lokal in der Peritonealflüssigkeit, sondern auch im Serum beobachtet werden (Walley *et al*, 1997). Weiterhin wurde in einem CLP Modell bei Mäusen eine erhöhte Expression von MIP-2 mRNA und Protein von Leukozyten des Peritoneums beschrieben (Mercer-Jones *et al*, 1999). Auf der einen Seite ist die lokale Freisetzung von Chemokinen im Gewebe wichtig für die chemotaktische Stimulation der Granulozyten zur Mikrobenbekämpfung, andererseits kann eine erhöhte systemische und unspezifische Freisetzung dieser Proteine zu einem Zustand der Hyperinflammation des

Organismus führen. Dies kann zu einer deutlichen Verschlechterung der Sepsis mit einer erhöhten Mortalität führen (Walley *et al*, 1997).

Maier et al. konnten in einem neuen Modell zur polymikrobiellen Sepsis bei Mäusen eine Beteiligung von Chemokinen bei der Entwicklung eines Organversagens der Niere im septischen Schock nachweisen. Neben MIP-2 führte ein verstärkte Induktion der Gen Expression von Chemokinen der C-X-C und C-C Gruppe zu einer Akkumulation von Granulozyten und Monozyten im Gefäßendothel der Niere (Maier *et al*, 2000). Auch *Walley et al.* führten eine erhöhte Mortalität von Mäusen mit schwerer septischer Peritonitis auf eine verstärkte Mobilisierung von Neutrophilen durch MIP-2 zurück (Walley *et al*, 1997). Zellen, die normalerweise die Bakterien bekämpfen und den Organismus schützen sollen, können ebenso dem Wirt Schaden zufügen. Dafür scheinen Proteine wie MIP-2 verantwortlich zu sein. Mediatoren, die eigentlich eine Schutzfunktion für den Organismus haben sollen, können in unphysiologischen Konzentrationen gefährlich sein und zu zusätzlichen Schäden führen. Rattenstämme wie die SHR mit einer verringerten unspezifischen Freisetzung von MIP-2 haben deshalb einen Vorteil nach einem entzündlichen Reiz. Dies findet Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus unseren Studien. Die SHR Ratten haben im Infektionsmodell eine signifikant höhere Überlebensrate und weisen im Vergleich zum Wistar Stamm in den Organen der Leber, Milz und Lunge eine deutlich geringere MIP-2 Expression auf.

Im Gegensatz zu den bisher betrachteten proinflammatorischen Zytokinen gehört das IL-10 zu den Zytokinen mit mehr antiinflammatorischen Eigenschaften (Standiford *et al*, 1995; Ibelgauff, 1999). IL-10 vermag bei systemischer Endotoxinämie die inflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und MIP-2 herunter zu regulieren und wirkte protektiv in Tiermodellen zum septischen Schock (Kalyanaraman *et al*, 1998; Standiford *et al*, 1995; Rongione *et al*, 1997; Rongione *et al*, 2000; Gerard *et al*, 1993).

In Makrophagen, die durch Endotoxin stimuliert wurden, unterdrückt IL-10 die Synthese von IL-1, IL-6 und TNF- α auf mRNA Ebene (Ibelgauff, 1999;

Remick *et al*, 1998). Auch konnte gezeigt werden, dass IL-10 bei einer Infektion durch Phenyl N-tert-butylnitron (PBN) induziert wird und schützend bei endotoxischer Sepsis wirkt (Kotake *et al*, 2002). Phenyl N-tert-butylnitron (PBN) gehört zu der Familie der Nitronen, denen bei der Eliminierung von freien Radikalen, die bei einer bakteriellen Infektion freigesetzt werden, eine wichtige Aufgabe zukommt. Die pharmakologischen Effekte von PBN in Tiermodellen sind sehr vielfältig, und es konnten protektive Effekte nicht nur bei einem Endotoxin Schock nachgewiesen werden. PBN vermindert nicht nur die Induktion des iNOS, sondern hat daneben vielfältige antiinflammatorische Effekte im septischen Schock über Modulation der Produktion von entscheidenden inflammatorischen Mediatoren. Die Zytokin Gene von TNF- α , IL-1 und IL-6 konnten signifikant herunterreguliert werden (Sang *et al*, 1999). In einem Modell zur LPS induzierten Endotoxinämie konnte durch die Applikation von PBN eine gesteigerte Produktion von endogenem IL-10 erreicht werden, welches einen entscheidenden schützenden Effekt in diesem Modell hatte. Plasma IL-10 zeigt einen 3fachen Anstieg in PBN/LPS- behandelten Ratten verglichen mit Ratten, die nur mit LPS infiziert wurden. Daneben verringerten sich die Spiegel von TNF- α über 90% (Kotake *et al*, 2002).

Rongione *et al*. konnten in einem CLP Modell an Ratten zeigen, dass eine Behandlung mit IL-10 die Expression von TNF- α mRNA in der Leber und in der Lunge signifikant verringern konnte und die Serum Spiegel von systemischen TNF- α senkte. Insgesamt konnte die 24h Mortalität bei den mit IL-10 behandelten Ratten deutlich gesenkt werden (Rongione *et al*, 2000).

In unseren Untersuchungen zur lokalen IL-10 Expression in der Leber zeigte sich ein unterschiedliches Verhalten zwischen den Dahl und den SHR Ratten. In den untersuchten Geweben könnte sich die erhöhte Expression von IL-10 in der Leber nach Infektion bei den Tieren der SHR Population günstig auf das Überleben auswirken. Bei den Ratten der DS Gruppe, die eine wesentlich schlechtere Überlebensrate zeigten, waren die IL-10 Werte erniedrigt, was eine Erklärung für die höhere Mortalität

sein könnte. Während eine Erhöhung von systemischem IL-10 keinen eindeutigen Vorteil im Ausgang einer Peritonitis im CLP Modell der Maus zeigte, scheint die lokale Produktion von IL-10 einen wesentlich protektiveren Einfluss zu haben (Remick *et al*, 1998).

Der Transforming Growth Factor beta (TGF- β) ist ein weiteres wirkungsvolles antiinflammatorisches Zytokin, dass unter anderem auch bei der Wundheilung (Pender *et al*, 1996) und bei der Sepsis eine Rolle spielt (Ahmad *et al*, 1997). Im Immunsystem besitzt TGF- β überwiegend suppressiven Charakter und wirkt antiproliferativ auf Abwehrzellen (T-Lymphozyten, NK-Zellen, Makrophagen). In einem Tiermodell der Peritonitis konnten Ayala *et al*. erhöhte TGF- β Plasmakonzentrationen nachweisen, welches zu einer Dysfunktion von Abwehrzellen beitrug (Ayala *et al*, 1993). Ergebnisse aus einem Modell zur Sepsis konnten zeigen, dass von Makrophagen produziertes TGF- β auf parakrine Art die IL-2 mRNA Expression in T-Zellen supprimiert und die IL-2 Produktion und die Zell Proliferation vermindert (Ahmad *et al*, 1997). In *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zeigten Pender *et al.*, dass eine Behandlung mit TGF- β zu einer Reduktion von LPS stimulierter NO Produktion durch Makrophagen führte und bei Ratten, die einer letaler LPS Dosis ausgesetzt wurden, zu einer erhöhten mittleren Überlebenszeit beitrug (Pender *et al*, 1996).

Bei dem Vergleich auf mRNA Ebene fällt bei den SHR Ratten gegenüber dem Wistar Tieren eine verminderte lokale Produktion von TGF- β auf. Ebenso findet sich sowohl systemisch als auch lokal auf mRNA Ebene eine verminderte Expression von IL-6 bei den SHR Ratten, einem Zytokin, dass zur Freisetzung von TGF- β führt. Dies würde in Einklang mit der Beobachtung von Ayala *et al*. stehen, die nach IL-6 Blockade mit monoklonalen Antikörpern eine Erhöhung von TGF- β verhindern und eine Immunsuppression währende einer Sepsis abschwächen konnten (Ayala *et al*, 1993).

Bei der Betrachtung der pro- und antiinflammatorischen Zytokine wird deutlich, dass es funktionell gravierende Unterschiede zwischen den einzelnen Mediatoren gibt, obwohl sie grob in zwei Gruppen eingeteilt werden. Es kann daher nicht allgemein von einer schädlichen Wirkung der proinflammatorischen Zytokine und dem protektiven Einfluss der antiinflammatorischen Mediatoren gesprochen werden, vielmehr kommt es auf ein Gleichgewicht im physiologischen komplexen Zusammenspiel der Zytokine an.

Bei der Betrachtung der verschiedenen Organe (Leber, Lunge, Milz und Niere) der SHR Ratten fällt ein ähnliches Muster in der Expression der verschiedenen Zytokine auf mRNA Ebene auf. Nach Infektion ist ein deutlicher Anstieg der Zytokine in allen Organen zu beobachten. Durch eine Prophylaxe mit Antibiotika allein oder in Kombination mit G-CSF verringert sich die Expression erheblich. Der positive Einfluss von G-CSF nicht nur auf die Überlebensrate (Lorenz *et al*, 1994; Bauhofer *et al*, 1998a; Bauhofer *et al*, 2004b), sondern auch auf das Krankheitsverhalten von septisch infizierten Ratten konnte erst kürzlich gezeigt werden (Bauhofer *et al*, 2002b). Mögliche Erklärungen für diese Verbesserung der Überlebensrate durch eine G-CSF Prophylaxe lassen sich durch die Stimulation der zellulären Immunabwehrmechanismen und eine Veränderung im Zusammenspiel der Zytokine finden. Durch eine G-CSF Gabe kann die Zellmigration, die Phagozytose und die Produktion von Sauerstoffradikalen bei Tieren mit PCI normalisiert werden (Welte *et al*, 1996; Wang *et al*, 1988). Desweiteren wurde eine erhöhte Induktion der Adhäsionsmoleküle CD11b/c und CD18 von zirkulierenden Granulozyten durch G-CSF beschrieben (Zhang *et al*, 1998; Wiik *et al*, 2001). Die Expression dieser Oberflächen Adhäsionsmoleküle dient als ein Index für Fähigkeit der Zellen zur Adhäsion und für deren Aktivitätsstatus (Rebuck & Finn, 1994). Das Integrin CD11b vermittelt die transendotheliale Migration der zirkulierenden Granulozyten an den Ort des Entzündungsgeschehens. Brom *et al*. konnten bei Patienten, die gefährdet waren, eine Sepsis zu entwickeln,

eine Dysfunktion der PMN auf Ebene der Adhäsionsmolekül Expression beobachten (Brom *et al*, 1995). Dagegen beschrieben *Russwurm et al.* erhöhte Werte von CD11b auf Neutrophilen bei Patienten mit unkomplizierter Sepsis (*Russwurm et al*, 2002).

Zusätzlich könnte eine Reduzierung von proinflammatorischen Zytokinen auf Proteinlevel (IL-6 und TNF- α) sowohl am Entzündungsort (z.B. Peritoneum) als auch systemisch als Erklärungsversuch für die erhöhte Überlebensrate in den Untersuchungsgruppen mit G-CSF Prophylaxe dienen (*Goergen et al*, 1994; *Bauhofer et al*, 2002a). In den Untersuchungen dieser Arbeit verringerte eine G-CSF Prophylaxe zum Teil die mRNA Expression in der Leber der verschiedenen Stämme. Dieser Effekt lässt sich wahrscheinlich auf die antiinflammatorischen Eigenschaften von G-CSF zurückführen, der sich nicht nur auf die Granulozyten und Monozyten beschränkt (*Hartung*, 1999). Eine genetische Prädisposition für eine verminderte Zytokin Expression bei Infektion, wie z.B. bei den Tieren des SHR Stammes, wird durch die antiinflammatorischen Eigenschaften des G-CSF unterstützt.

Genetische Unterschiede bei Patienten sind in der Klinik zunehmend von Bedeutung und werden nicht nur für den Einfluss der Geschlechtshormone beschrieben. Mehrere experimentelle und klinische Studien haben eine geschlechtliche Zweigestaltigkeit des Immunsystems und der Gewebe Reaktion in der Anfälligkeit und in der Morbidität bei Schock, Trauma und Sepsis gezeigt. Die Geschlechtshormone tragen zu der unterschiedlichen Immunantwort bei. Es wurde nicht nur ein erhöhtes Risiko für männliche Patienten, sondern auch ein Einfluss von veränderter Zytokin Expression aufgrund unterschiedlicher Allele, wie z.B. für TNF- β , beschrieben. Männer, die für TNF- β 2 homozygot sind, haben ein erhöhtes Risiko, dass sie bei einer Infektion eine Sepsis entwickeln (*Knoferl et al*, 2002; *Angele et al*, 2000). Auch *Stüber et al.* zeigten, dass der bi-allelisch NcoI Polymorphismus auf dem TNF Locus ein genetischer Marker für Patienten mit einer erhöhten TNF- α Antwort und einer schlechteren Prognose bei schwerer Sepsis ist. Die Menge der TNF Freisetzung in Situationen mit

schwerer Entzündung scheint zum Teil genetisch beeinflusst zu sein. Die Individuen, die homozygot für TNFB2 sind, haben höhere Werte an zirkulierenden TNF- α Plasma Konzentrationen und haben eine höhere Mortalitätsrate bei schwerer Sepsis (Stüber *et al*, 1994). Von Fang *et al*. und Ma *et al*. wird ein Polymorphismus der Allele für IL-1ra beschrieben und die Beobachtung gemacht, dass das Allel IL-1raA2 empfänglich für die Entwicklung einer Sepsis macht (Fang *et al*, 1999; Ma *et al*, 2002).

Neue Möglichkeiten, genetische Prädispositionen zu untersuchen, die einen Einfluss auf den Bluthochdruck, eine unterschiedliche Zytokin Freisetzung und andere individuellen Eigenschaften haben, können in Zukunft hilfreich sein, Patienten mit einem erhöhten perioperativen Risiko und ungünstigen Ausgang besser zu erkennen und gezielter behandeln zu können. Besonders diese Risiko-Patienten könnten von einer Prophylaxe mit einem Zytokin wie G-CSF profitieren.

6 Zusammenfassung

Risikofaktoren wie z.B. Diabetes mellitus, Unterernährung oder Blutverlust führen zu einer veränderten immunologischen Reaktivität gegenüber Mikroorganismen und zu einer erhöhten Mortalität in der abdominalen Sepsis, sowohl im Tiermodell als auch in der Klinik. Ebenso spielt der Risikofaktor Bluthochdruck in der Medizin nicht nur eine Rolle in der Pathogenese des Schlaganfalls und des Herzinfarktes, sondern auch bei Infektionen.

In Klinik modulierenden, randomisierten Studien am Modell der fäkalen, abdominalen Peritonitis konnte beobachtet werden, dass es abhängig vom untersuchten Rattenstamm (Wistar, Spontanen Hypertensiven (SHR) Ratten, Dahl Salz-sensitiven (DS) Ratten) zu verschiedenen Mortalitätsraten unter Antibiotika- und G-CSF Prophylaxe kommt. Obwohl die beiden Rattenstämme, SHR und DS Ratten, beide einen nachweislich erhöhten Blutdruck zeigten, war der Überlebensverlauf unterschiedlich. Die SHR Ratten hatten eine wesentlich geringere Mortalitätsrate, während das Überleben der DS Ratten tendenziell vermindert war. Dabei wurde bei dem SHR Stamm, im Vergleich zu den Wistar Ratten, eine deutlich geringere, lokale Expression der mRNA, der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und MIP-2 in den Organen der Lunge, der Leber und der Milz gefunden. Die erhöhte Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 nach einer Infektion in der Leber kann für die SHR Ratten einen günstigen Einfluss haben, während die geringere Produktion sich bei den DS Ratten eher ungünstig auswirkt. Auf Proteinebene im Plasma konnte dagegen bei der SHR Gruppe im Vergleich zu Wistar Ratten kein Unterschied bei den Zytokinen nach einer Infektion beobachtet werden. Die lokale Zytokinfreisetzung scheint daher von größerer Bedeutung zu sein als die systemische.

Die Hypertension per se ist nicht entscheidend für das Überleben der Tiere und die Zytokinexpression, sondern vielmehr ihr genetischer Hintergrund.

Eine Erklärungsmöglichkeit für die erhöhte Resistenz der SHR Ratten gegenüber Mikroorganismen und ihren Toxinen einhergehend mit einer erhöhten Überlebensrate konnte in der deutlichen Verringerung der lokalen Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen auf mRNA Ebene gefunden werden.

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden in Shock in Bauhofer, Tischer *et al.* (Bauhofer *et al.*, 2003) publiziert und auf der Jahrestagung der Shock Society 2001 (Marco Island, Florida, USA) vorgestellt (Bauhofer *et al.*, 2001c).

7 Abkürzungen

| | |
|------------|--|
| AB | Antibiotikum |
| ACTH | Adrenokortikotropes Hormon |
| Ag | Antigen |
| AK | Antikörper |
| ANP | Artrales Natriuretisches Peptid |
| ASA | American Society of Anesthesiologists |
| AT-Peptide | Anaphylaktische Toxine |
| CD | Cluster of Differentiation |
| CLP | Ceacal Ligation and Puncture |
| CMRT | Clinic Modellized Randomized Trial |
| CRP | C-Reaktives Protein |
| CSF | Colony Stimulating Factor |
| CTL | Cytotoxische T-Lymphozyten |
| DIC | Disseminated Intravasale Coagulation |
| DR | Dahl Salz-resistente Ratten |
| DS | Dahl Salz-sensitive Ratten |
| ELISA | Enzyme Linked Imunosorbent Assay |
| G-CSF | Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor |
| GH | genetisch-hypertensive Ratten |
| GM-CSF | Granulozyten-Makrophagen-Kolonie Stimulierender Faktor |
| HGF | Haematopoetic Growth Faktor |
| IFN | Interferon |

| | |
|--------|---|
| Ig | Immunglobuline |
| IL | Interleukin |
| IL-1ra | Interleukin-1 Rezeptor-Antagonist |
| iNOS | induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase |
| LH | Lyon-hypertensive Ratten |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LT | Leukotrien |
| LVEDP | Linksventrikulärer End-Diastolischer Druck |
| MAb | Monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody) |
| M-CSF | Makrophagen-Kolonie Stimulierender Faktor |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| MHS | Milan-hypertensive Ratten |
| MIP | Makrophage Inflammatory Protein |
| MODS | Multi Organ Distress Syndrom |
| MOV | Multi Organ Versagen |
| NA | Noradrenalin |
| NK | Natürliche Killerzellen |
| nNOS | neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| PAF | Platelet Activating Factor |
| PBMC | Peripheral Blood Mononuclear Cells |
| PBN | phenyl N-tert-butylnitron |
| PCI | Peritoneal Kontamination and Infection |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PDGF | Platelet Derived Growth Factor |
| PF | Platelet Factor |

| | |
|-----------|--|
| PG (D, E) | Prostaglandine (D, E) |
| PMN | polymorph-mononukleare Neutrophile |
| rHu-G-CSF | rekombinanter Humaner Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor |
| RR | Blutdruck nach Riva Rocci |
| RT-PCR | Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction |
| SBH | Sabra-hypertensive Ratten |
| SCF | Stem Cell Factor |
| SHR | Spontaneous Hypertensive Rats |
| SHR-SP | SHR stroke prone Ratten |
| SIRS | Systemic Inflammatory Response Syndrom |
| sTNF-R | soluable TNF Rezeptor |
| TGF | Transforming Growth Factor |
| TH | T-Helfer Zellen |
| TNF | Tumor Nekrose Faktor |
| TPR | Total Peripher Resistance |
| WKY | Wistar Kyoto Ratten |

8 Literaturverzeichnis

1. Abbas,A.K., Lichtmann,A.H., & Pober,J.S. (1996) *Immunologie*, p. -536
S. Huber, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle.
2. Abraham,E., Anzueto,A., Gutierrez,G., Tessler,S., San Pedro,G.,
Wunderink,R., Dal Nogare,A., Nasraway,S., Berman,S., Cooney,R.,
Levy,H., Baughman,R., Rumbak,M., Light,R., Poole,L., Allred,R.,
Constant,J., Pennington,J., Porter,S., & Norasept II Study Group
(1998) Double-blind randomised controlled trial of monoclonal
antibody to human tumor necrosis factor in treatment of septic
shock. *Lancet*, **351**, 929-933.
3. Adams,D.H. & Lloyd,A.R. (1997) Chemokines: leucocyte recruitment
and activation cytokines. *Lancet*, **349**, 490-495.
4. Adrie,Ch. & Pinsky,M.R. (1999) The inflammatory balance in human
sepsis. *Intensivmed.*, **36**, 419-428.
5. Aeberli,D., Oertle,S., Mauron,H., Reichenbach,S., Jordi,B., &
Villiger,P.M. (2002) Inhibition of the TNF-pathway: use of infliximab
and etanercept as remission-inducing agents in cases of therapy-
resistant chronic inflammatory disorders. *Swiss Med.Wkly.*, **132**,
414-422.
6. Ahmad,S., Choudhry,M.A., Shankar,R., & Sayeed,M.M. (1997)
Transforming growth factor-beta negatively modulates T-cell
responses in sepsis. *FEBS Lett.*, **402**, 213-218.
7. Angele,M.K., Schwacha,M.G., Ayala,A., & Chaudry,I.H. (2000) Effect of
gender and sex hormones on immune responses following shock.
Shock, **14**, 81-90.
8. Antonelli,M., Raponi,G.M., Martino,P., Conti,G., Jalouk,J., &
Gasparetto,A. (1995) High IL-6 serum levels are associated with
septic shock and mortality in septic patients with severe leukopenia
due to hematological malignancies. *Scand.J.Infect.Dis.*, **27**, 381-
384.

9. Arslan,E., Yavuz,M., & Dalay,C. (2000) The relationship between tumor necrosis factor (TNF)-alpha and survival following granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) administration in burn sepsis. *Burns*, **26**, 521-524.

10. Ayala,A., Knotts,J.B., Ertel,W., Perrin,M.M., Morrison,M.H., & Chaudry,I.H. (1993) Role of interleukin 6 and transforming growth factor-beta in the induction of depressed splenocyte responses following sepsis. *Arch.Surg.*, **128**, 89-94.

11. Barton,B.E. (1996) The biological effects of interleukin 6. *Medicin.Res.Rev.*, **16**, 87-109.

12. Baue,A.E. (1992) The horror autotoxios and multiple -organ failure. *Arch.Surg.*, **127**, 1451-1462.

13. Baue,A.E., Pilz,G., Kääb,S., Kreuzer,E., Werdan,K., Lorenz,W., Sitter,H., Weitzel,F., Koller,M., Margolis,C.Z., Evans,M., Shatney,C.H., & Peduzzi,P. (1996) Design, methodology and interpretation of clinical trials in shock and sepsis. The immune consequences of trauma, shock and sepsis - mechanisms and therapeutic approaches vol 2 (ed. by E. Faist, A. E. Baue, & F. W. Schildberg), pp. 612-654. Pabst Science Publishers, Lengerich.

14. Bauer,J. & Herrmann,F. (1991) Interleukin-6 in clinical medicine. *Ann.Hematol.*, **62**, 203-210.

15. Bauhofer,A., Celik,I., Greger,B., Trusheim,H., Huttel,M., Reimund,K.-P., & Lorenz,W. (1997a) A positive effect of rhG-CSF in sepsis prophylaxis is dependent on the antibiotic. *Shock*, **7 Suppl.**

16. Bauhofer,A., Celik,I., Reimund,K.-P., Greger,B., Schütz,P., Huttel,M., & Lorenz,W. (1996a) Different antibiotics have heterogeneous effects in postoperative peritonitis prophylaxis in combination with G-CSF. *Naunyn Schmiedebergs Archiv.Pharmacol.*, **353 Suppl.**, R 78 .

17. Bauhofer,A., Celik,I., Reimund,K.-P., Rothmund,M., & Lorenz,W. (1995) G-CSF and antibiotic sepsis prophylaxis in a rat infection model for the development of a consensus assisted study protocol. *Shock*, **3 Suppl.**, 210.

18. Bauhofer,A., Celik,I., Stinner,B., & Lorenz,W. (1999a) Modelling clinical complexity in pharmacological experiments by CMRT's: A new concept for reducing failure in clinical trials - Example G-CSF in sepsis prophylaxis. *Naunyn Schmiedebergs Archiv.Pharmacol.*, **359 Suppl.**, R125.

19. Bauhofer,A., Huttel,M., Reimund,K.-P., Celik,I., Greger,B., & Lorenz,W. (1997b) Effective prophylaxis with rhG-CSF in abdominal sepsis: a new mechanism improving the antimicrobial functions of granulocytes (Wirksame Prophylaxe mit rhG-CSF bei abdomineller Sepsis: Verbesserung der antimikrobiellen Funktion von Granulozyten als neuer Mechanismus in vivo). *Langenbecks Arch.Chir.Forum*, 593-596.

20. Bauhofer,A., Lorenz,W., Celik,I., Stinner,B., Solovera,J., & Lorijn,R. (1998a) Haematopoetic cytokines, G-CSF and abdominal surgery. Cytokines and the abdominal surgeon (ed. by M. Schein & L. Wise), pp. 117-141. Landes Bioscience, Austin, Texas.

21. Bauhofer,A., Lorenz,W., & Stinner,B. (2004a) Improvement of quality of life by G-CSF prophylaxis in high risk patients with colorectal cancer surgery - results of a randomised trial. *Shock*, **21 Suppl.**, 39.

22. Bauhofer,A., Lorenz,W., Stinner,B., Rothmund,M., Koller,M., Sitter,H., Celik,I., Farndon,J.R., Fingerhut,A., Hay,J.-M., Lefering,R., Lorijn,R., Nyström,P.-O., Schäfer,H., Schein,M., Solomkin,J., Troidl,H., Volk,H.-D., Wittmann,D.H., Wyatt,J., & Lucerne Group for Consensus-assisted Development of the Study Protocol on Prevention of Abdominal Sepsis: Example G-CSF. (2001a) Granulocyte-colony stimulating factor in the prevention of postoperative infectious complications and sub-optimum recovery from operation in patients with colorectal cancer and increased preoperative risk (ASA 3 and 4). Protocol of a controlled clinical trial developed by consensus of an international study group. Part two: design of the study. *Inflamm.Res.*, **50**, 187-205.

23. Bauhofer,A., Muttschall,I., Stinner,B., Celik,I., & Lorenz,W. (1999b) G-CSF positively alters the mRNA expression of the chemokine MIP-2 and the cytokines IL-1 β , TNF- α , IL-10 in sepsis . *Europ.J.Cell.Biol.*, **78**, 62.

24. Bauhofer,A., Reimund,K.-P., Schütz,P., Huttel,M., & Celik,I. (1996b) G-CSF increases PMN functions in rats with abdominal infection and sepsis (AIS). *Shock*, **5 Suppl.**, 10.

25. Bauhofer,A., Schütz,P., Huttel,M., Reimund,K.-P., Celik,I., & Lorenz,W. (1996c) Restoration of antimicrobial PMN functions with G-CSF in rats with abdominal contamination and infection (ACI). *Europ.J.Cell.Biol.*, **69 Suppl.**, 377.
26. Bauhofer,A., Stinner,B., Kohlert,F., Celik,I., Geks,J., & Lorenz,W. (1998b) G-CSF reduces the mortality rate after blood loss in clinic modelling randomized trials (CMRT) with abdominal contamination and infection (ACI). *Naunyn Schmiedebergs Archiv.Pharmacol.*, **358 Suppl.**, R471.
27. Bauhofer,A., Stinner,B., Kohlert,F., Celik,I., Plaul,U., Torossian,A., & Lorenz,W. (2001b) CMRT (Clinic Modelling Randomised Trial) an Ratten zur Frage des Nutzens der Abdominallavage bei postoperativer Peritonitis: Entscheidungsfindung für eine G-CSF Prophylaxe in einer randomisierten klinischen Studie. *Chirurgisches Forum*, **30**, 543-545.
28. Bauhofer,A., Stinner,B., Kohlert,F., Reckzeh,B., Lorenz,W., & Celik,I. (2002a) Granulocyte colony-stimulating factor but not peritoneal lavage increases survival rate after experimental abdominal contamination and infection. *British Journal of Surgery*, **89**, 1457-1463.
29. Bauhofer,A., Tischer,B., Middeke,M., Plaul,U., & Lorenz,W. (2001c) The survival rate of septic rats with antibiotic and G-CSF prophylaxis is increased in hypertensive rats - molecular explanations. *Shock*, **15 Suppl.**, 4.
30. Bauhofer,A., Tischer,B., Middeke,M., Plaul,U., Lorenz,W., & Torossian,A. (2003) The genetic background of hypertensive, septic rats determines outcome improvement with antibiotic and G-CSF prophylaxis. *Shock*, **20**, 326-331.
31. Bauhofer,A., Torossian,A., Lorenz,W., Middeke,M., Plaul,U., Schütz,P., Stinner,B., Huttel,M., Celik,I., & Lucerne Study Group (2004b) Dependence of positive effects of granulocyte colony-stimulating factor on the antibiotic regime: evaluation in rats with polymicrobial peritonitis. *World J.Surg.*, **28**, 834-844.
32. Bauhofer,A., Witte,K., Celik,I., Pummer,S., Lemmer,B., & Lorenz,W. (2001d) Sickness behavior, an animal equivalent to quality of life, is improved in septic rats by G-CSF and antibiotic prophylaxis. *Langenbeck's Arch.Surg.*, **386**, 132-140.

33. Bauhofer,A., Witte,K., Lemmer,B., Middeke,M., Lorenz,W., & Celik,I. (2002b) Quality of life in animals as a new outcome for surgical research: G-CSF as a quality of life improving factor. *Eur.Surg.Res.*, **34**, 22-29.
34. Baumforth,K.R., Nelson,P.N., Digby,J.E., O'Neil,J.D., & Murray,P.G. (1999) Demystified ... the polymerase chain reaction. *Mol.Pathol.*, **52**, 1-10.
35. Baxter,F. (1997) Septic shock. *Can.J.Anaesth.*, **44**, 59-72.
36. Bayorh,M.A., Ogbolu,E.C., Williams,E., Thierry-Palmer,M., Sanford,G., Emmett,N., Harris-Hooker,S., Socci,R.R., Chu,T.C., & Chenault,V.M. (1998) Possible mechanisms of salt-induced hypertension in Dahl salt-sensitive rats. *Physiol.Behav.*, **65**, 563-568.
37. Benninghof,A. (1994) *Anatomie*, 15.Auflage edn, Urban&Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
38. Berger,D. & Berger,H.G. (1991) Neue Aspekte zur Pathogenese und Behandlung der Sepsis und des septischen Schocks. *Chirurg*, **62**, 783-788.
39. Bernard,C., Merval,R., Esposito,B., & Tedgui,A. (1998) Resistance to endotoxin shock in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **31**, 1350-1356.
40. Biffl,W.L., Moore,E.E., Moore,F.A., & Peterson,V.M. (1996) Interleukin-6 in the injured Patient: Marker of injury or mediator of inflammation? *Ann.Surg.*, **224**, 647-664.
41. Bishop,M.R., Tarantolo,S.R., Geller,R.B., Lynch,J.C., Bierman,P.J., Pavletic,Z.S., Vose,J.M., Kruse,S., Dix,S.P., Morris,M.E., Armitage,J.O., & Kessinger,A. (2000) A randomized, double-blind trial of filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor) versus placebo following allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood*, **96**, 80-85.
42. Blatteis,C.M. & Sehic,E. (1998) Cytokines and fever. *Ann.New York Acad.Sci.*, **840**, 608-618.

43. Bochud,P.Y. & Calandra,T. (2003) Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ*, **326**, 262-266.
44. Bohnen,J.M. (1996) Postoperative peritonitis. *Eur.J.Surg.*, **162**, 50-52.
45. Bohnen,J.M.A., Solomkin,J.S., Dellinger,E.P., Bjornson,H.S., & Page,C.P. (1992) Guidelines for clinical care: anti-infective agents for intra-abdominal infection. *Arch.Surg.*, **127**, 83-89.
46. Bone,R.C. (1991a) Gram-negative sepsis - Background, clinical features, and intervention. *CHEST*, **100**, 802-808.
47. Bone,R.C. (1991b) The pathogenesis of sepsis. *Annals of Internal Med.*, **115**, 457-469.
48. Bone,R.C. (1994) Gram-positive organisms and sepsis. *Arch.Intern.Med.*, **154**, 26-34.
49. Bone,R.C. (1995) Sepsis, sepsis syndrome, and the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *JAMA*, **273**, 155-156.
50. Bone,R.C. (1996) Why sepsis trials fail. *JAMA*, **276**, 565-566.
51. Bone,R.C., Fisher,C.J., Clemmer,T.P., Slotman,G.J., Metz,C.A., & Balk,R.A. (1987) A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N.Engl.J.Med.*, **317**, 653-658.
52. Boneberg,E.M., Hareng,L., Gantner,F., Wendel,A., & Hartung,T. (2000) Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. *Blood*, **95**, 270-276.
53. Broche,F. & Tellado,J.M. (2001) Defense mechanisms of the peritoneal cavity. *Cur.Opin.in Crit.Care*, **7**, 105-116.
54. Brom,J., Koller,M., Schluter,B., Muller-Lange,P., Ulrich Steinau,H., & Konig,W. (1995) Expression of the adhesion molecule CD11b and polymerization of actin by polymorphonuclear granulocytes of patients endangered by sepsis. *Burns*, **21**, 427-431.

55. Bühl,A. & Zöfel,P. (2000) *SPSS for windows*, ed. 7 edn, pp. 1-734. Addison-Wesley, München.
56. Bunag,R.D., McCubbin,J.W., & Page,I.H. (1971) Lack of correlation between direct and indirect measurements of arterial pressure in unanaesthetized rats. *Cardiovasc.Res.*, **5**, 24-31.
57. Byrom,F.B. & Wilson,C. (1938) A plethysmographic method for measuring systolic blood pressure in the intact rat. *Journal of Lab.Clin.Med.*, **73**, 827-876.
58. Cartmell,T., Luheshi,G.N., Hopkins,S.J., Rothwell,N.J., & Poole,S. (2001) Role of endogenous interleukin-1 receptor antagonist in regulating fever induced by localised inflammation in the rat. *J.Physiol.*, **531**, 171-180.
59. Cartmell,T., Poole,S., Turnbull,A.V., Rothwell,N.J., & Luheshi,G.N. (2000) Circulating interleukin-6 mediates the febrile response to localised inflammation in rats. *J.Physiol.*, **526**, 653-661.
60. Casey,L.C., Balk,R.A., & Bone,R.C. (1993) Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann.Intern.Med.*, **119**, 771-778.
61. Celik,I., Stover,C., Botto,M., Walport,M., Schwaeble,W., & Lorenz,W. (2001) Influence of complement system on postoperative peritonitis and sepsis in a knock-out-mice-model. *Shock*, **15 Suppl.**, 105.
62. Chalita-Manzur,A. & Hermosillo-Sandoval,J.M. (2001) Prognostic index in wound infection and abdominal sepsis. *Rev.Gastroenterol Mex.*, **66**, 6-13.
63. Cheng A.C., Stephens D.P., & Currie B.J. Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) as an adjunct to antibiotics in the treatment of pneumonia in adults. Cochrane Database . 2004.
64. Christou,N.V., Barie,P.S., Dellinger,E.P., Waymack,J.P., & Stone,H.H. (1993) Surgical infection society intra-abdominal infection study. *Arch.Surg.*, **128**, 193-199.
65. Cohen,A.M., Zsebo,K.M., Inoue,H., Hines,D., Boone,T.C., Cazin,V.R., Tsai,L., Ritch,T., & Souza,L.M. (1987) In vivo stimulation of

- granulopoiesis by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **84**, 2484-2488.
66. Damas,P., Ledoux,D., Nys,M., Vrindts,Y., de Groote,D., Franchimont,P., & Lamy,M. (1992) Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann.Surg.*, **215**, 356-362.
67. DeLamarter,J.F. (1988) Hemopoietic colony stimulating factors A physiological and pharmacological role in fighting infection? *Biochem.Parmacol.*, **37**, 3057-3062.
68. Dellinger,R.P., Carlet,J.M., Masur,H., Gerlach,H., Calandra,T., Cohen,J., Gea-Banacloche,J., Keh,D., Marshall,J.C., Parker,M.M., Ramsay,G., Zimmerman,J.L., Vincent,J.L., & Levy,M.M. (2004) Surviving sepsis campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit.care med.*, **32**, 858-873.
69. Di Paolo,N. & Sacchi,G. (1990) Anatomy and physiology of the peritoneal membrane. Evolution and trends in peritoneal dialysis (ed. by L. L. Syarpioni & S. Ballocci), pp. 10-26. Karger, Basel.
70. Dickhout,J.G. & Lee,R.M.K.W. (1998) Blood pressure and heart rate development in young spontaneously hypertensive rats. *AJP-Heart and Circulatory Physiology*, **274**, H794-H800.
71. Dinarello,C.A. (1988) The biology of interleukin-1, comparison to tumor necrosis factor and the effect of the combination of these cytokines. Tumor necrosis factor/catechsin and related cytokines (ed. by Bonavida, Gifford, Kirchner, & Old), pp. 154-159. Karger, Basel.
72. Dinarello,C.A. (1996) Biologic Basis for Interleukin-1 in Disease. *Blood*, **87**, 2095-2147.
73. Dinarello,C.A., Gelfand,J.A., & Wolff,S.M. (1993) Anticytokine strategies in the treatment of the systemic inflammatory response syndrome. *JAMA*, **269**, 1829-1835.
74. Döcke,W.D., Syrbe,U., Meinecke,A., Platzer,C., Makki,A., Asadullah,K., Klug,C., Zuckermann,H., Reinke,P., Brunner,H., van Baehr,R., & Volk,H.D. (1994) Improvement of monocyte function - a new therapeutic approach? Sepsis - Current Perspectives in

- Pathophysiology and Therapy (ed. by K. Reinhart, K. Eyrich, & C. Sprung), pp. 473-500. Springer-Verlag, Berlin.
75. Driscoll, K.E. (1994) Macrophage inflammatory proteins: biology and role in pulmonary inflammation. *Exp.Lung Res.*, **20**, 473-490.
76. Dunn, D.L., Barke, R.A., Ahrenholz, D.H., Humphrey, E.W., & Simmons, R.L. (1984) The adjuvant effect of peritoneal fluid in experimental peritonitis. Mechanism and clinical implications. *Ann.Surg.*, **199**, 37-43.
77. Dzielak, D.J. (1991) Immune mechanisms in experimental and essential hypertension. *Am.J.Physiol.*, **260**, R459-R467.
78. Dzielak, D.J. (1992) The immune system and hypertension. *Hypertension*, **19**, 136-144.
79. Eidelman, L.A. & Sprung, C.L. (1995) Why have new effective therapies for sepsis not developed? *Crit.Care Med.*, **22**, 1330-1334.
80. Elsagr, R., Johnson, D.A., Younes, Z., & Oldfield, E.C.I. (1998) Antimicrobial treatment of intra-abdominal infections. *Dig.Dis.*, **16**, 47-60.
81. Engemann, R. (1993) Einsatzmöglichkeiten von Cephalosporinen der 2. Generation in der perioperativen Antibiotikaphylaxe in der Chirurgie. *Infection*, **21**, 17-20.
82. Erlich, H.A. (1999) Principles and applications of the polymerase chain reaction. *Rev.Immunogenet*, **1**, 127-134.
83. Faist, E., Hartl, W.H., & Baue, A.E. (1994) Immune mechanisms of post-traumatic hyperinflammation and sepsis. *Immun.Infekt.*, **22**, 203-213.
84. Faist, E., Mewes, A., Strasser, T., Walz, A., Alkan, S., Baker, C., Ertel, W., & Heberer, G. (1988) Alteration of monocyte function following major injury. *Arch.Surg.*, **123**, 287-292.
85. Fang, X.M., Schroder, S., Hoeft, A., & Stuber, F. (1999) Comparison of two polymorphisms of the interleukin-1 gene family: interleukin-1

receptor antagonist polymorphism contributes to susceptibility to severe sepsis. *Crit.Care Med.*, **27**, 1330-1334.

86. Fannon,L.D., Braylan,R.C., & Phillips,M.I. (1992) Alterations of lymphocyte populations during development in the spontaneously hypertensive rat. *J.Hypertens.*, **10**, 629-634.
87. Fickenscher,H., Hor,S., Kupers,H., Knappe,A., Wittmann,S., & Sticht,H. (2002) The interleukin-10 family of cytokines. *Trends Immunol.*, **23**, 89-96.
88. Fisher,C.J., Dhainaut,J.A., Opal,S.M., Pribble,J.P., Balk,R.A., Slotman,G.J., Iberti,T.J., Rackow,E.C., Shapiro,M.J., Greeman,R.L., Reines,D.H., Shelly,M.P., Thompson,B.W., LaBrecque,J.F., Catalano,M.A., Knaus,W.A., & Sadoff,J.C. (1994) Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. *JAMA*, **271**, 1836-1843.
89. Fisher,C.J., Opal,S.M., Dhainaut,J.-F., Stephens,S., Zimmerman,J.L., Nightingale,P., Vincent,J.-L., Foulke,G.E., Warren,E.L., Garrard,C., Park,G., Bodmer,M.W., Cohen,J., Van der Linden,C., Cross,A.S., Sadoff,J.C., & The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group (1993) Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. *Crit.Care Med.*, **21**, 318-327.
90. Friedman,G., Silva,E., & Vincent,J.L. (1998) Has the mortality of septic shock changed with time. *Crit.Care Med.*, **26**, 2078-2086.
91. Friedmann,L.M., Furberg,C.D., & DeMets,D.L. (1985) *Fundamentals of clinical trials*, ed. 2nd edn, PSG publishing Company Inc., Littleton, Massachusetts.
92. Ganten,D. (1987) Role of animal models in hypertension research. *Hypertension*, **9**, 1-2-1-42.
93. Garcia-Carbonero,R., Mayordomo,J.I., Tornamira,M.V., Lopez-Brea,M., Rueda,A., Guillem,V., Arcediano,A., Yubero,A., Ribera,F., Gomez,C., Tres,A., Perez-Gracia,J.L., Lumbreras,C., Hornedo,J., Cortes-Funes,H., & Paz-Ares,L. (2001) Granulocyte colony-stimulating factor in the treatment of high-risk febrile neutropenia: a multicenter randomized trial. *J.Natl.Cancer Inst.*, **93**, 31-38.

94. Garrett, M.R., Saad, Y., Dene, H., & Rapp, J.P. (2000) Blood pressure QTL that differentiate Dahl salt-sensitive and spontaneously hypertensive rats. *Physiol. Genomics*, **3**, 33-38.

95. Geborek, P., Crnkic, M., Petersson, I.F., Saxne, T., & South Swedish Arthritis Treatment Group (2002) Etanercept, infliximab, and leflunomide in established rheumatoid arthritis: clinical experience using a structured follow up programme in southern Sweden. *Ann. Rheum. Dis.*, **61**, 793-798.

96. Gemsa, D., Kalden, J.R., & Resch, K. (1991) *Immunologie*, 4. Auflage edn, p. -651 S. Thieme, Stuttgart, New York.

97. Gerard, C., Bruyins, C., Marchant, A., Abramowicz, D., Vandenabeele, P., Delvaux, A., Fiers, W., Goldman, M., & Velu, T. (1993) Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J. Exp. Med.*, **177**, 547-550.

98. Giroir, B.P. (1993) Mediators of septic shock: new approaches for interrupting the endogenous inflammatory cascade. *Crit. Care Med.*, **21**, 780-789.

99. Glauser, M.P., Zanetti, G., Baumgartner, J.D., & Cohen, J. (1991) Septic shock: pathogenesis. *Lancet*, **338**, 732-736.

100. Goergen, I., Hartung, T., Leist, M., Niehoerster, M., Tiegs, G., Uhlig, S., Weitzel, F., & Wendel, A. (1994) Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor alpha. *J. Immunol.*, **149**, 918-924.

101. Gol, M.K., Karahan, M., Ulus, A.T., Erdil, N., Iscan, Z., Karabiber, N., Tasdemir, O., & Bayazit, K. (1998) Bloodstream, respiratory, and deep surgical wound infections after open heart surgery. *J. Card. Surg.*, **13**, 252-259.

102. Gough, A., Clapperton, M., Rolando, N., Foster, A.V.M., Philpott-Howard, J., & Edmonds, M.E. (1997) Randomised placebo controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor in diabetic foot infection. *Lancet*, **350**, 855-859.

103. Goya, T., Torisu, M., Doi, F., & Yoshida, T. (1993) Effects of granulocyte colony stimulating factor and monobactam antibiotics (Aztreonam)

- on neutrophil functions in sepsis. *Clin.Immunol.Immunopathol.*, **69**, 278-284.
104. Greenman,R.L., Schein,R.M.H., Martin,M.A., Wenzel,R.P., MacIntyre,N.R., Emmanuel,G., Chmel,H., Kohler,R.B., McCarthy,M., Plouffe,J., Russell,J.A., & XOMA Sepsis Study Group (1991) A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of Gram-negative sepsis. *JAMA*, **266**, 1097-1102.
105. Gregory,S.H., Magee,D.M., & Wing,E.J. (1991) The role of colony-stimulating factors in host defenses. *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.*, **197**, 349-360.
106. Greiling,H. & Gressner,A.M. (1995) *Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie*, Schattauer, Stuttgart, NewYork.
107. Gross-Weege,W., Dumon,K., Harms,B., Segendorf,C., Schneider,E.M., Raffel,A., Sandmann,W., & Röher,H.D. (1999) Vermindert die prophylaktische Gabe von Filgrastim (r-metHuG-CSF) Infektionskomplikationen bei chirurgischen Intensivpatienten? *Langenbecks Arch.Chir.I, Forumband 1999*, 499-502.
108. Grutkoski,P.S., D'Amico,R., Ayala,A., & Simms,H.H. (1999) IL-1 β stimulation induces paracrine regulation of PMN function and apoptosis. *Shock*, **12**, 373-381.
109. Guha,M. & Mackmann,N. (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*, **13**, 85-94.
110. Hadjiminias,D.J., McMasters,K.M., Peyton,J.C., & Cheadle,W.G. (1994) Tissue tumor necrosis factor mRNA expression following cecal ligation and puncture or intraperitoneal injection of endotoxin. *J.Surg.Res.*, **56**, 549-555.
111. Hallenbeck,J.M., Dutka,A.J., Vogel,S.N., Heldman,E., Doron,D.A., & Feuerstein,G. (1991) Lipopolysaccharide-induced production of tumor necrosis factor activity in rats with and without risk factors for stroke. *Brain Res.*, **541**, 115-120.
112. Hartung,T. (1998) Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor. *Curr.Opin.Hematol.*, **5**, 221-225.

113. Hartung, T. (1999) Immunmodulation by colony stimulating factors. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **136**, 1-164.
114. Hartung, T., Gaviria, J.M., Garrido, S.M., & Root, R.K. (2001) G-CSF and GM-CSF. Cytokine therapeutics in infectious diseases (ed. by S. M. Holland), pp. 185-219. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
115. Hartung, T., Volk, H.D., & Wendel, A. (1995) G-CSF an anti-inflammatory cytokine. *J. Endotoxin. Res.*, **2**, 195-201.
116. Hartung, T., von Aulock, S., & Wendel, A. (1998) Role of granulocyte colony-stimulating factor in infection and inflammation. *Med. Microbiol. Immunol.*, **502**, 1-9.
117. Haupt, W., Riese, J., Mehler, C., Weber, K., Zowe, M., & Hohenberger, W. (1998) Monocyte function before and after surgical trauma. *Dig. Surg.*, **15**, 102-104.
118. Heeg, K., Miethke, T., & Wagner, H. (1995) Neue Perspektiven zur Pathophysiologie der grampositiven Sepsis. *Deutsches Ärzteblatt*, **92**, B-880-B-883.
119. Hershman, M.J., Cheadle, W.G., Wellhausen, S.R., Davidson, P.F., & Polk, H.C. (1990) Monocyte HLA-DR antigen expression characterizes clinical outcome in the trauma patient. *Br. J. Surg.*, **77**, 204-207.
120. Hooper, L., Bartlett, C., Davey, S.G., & Ebrahim, S. (2002) Systematic review of long term effects of advice to reduce dietary salt in adults. *BMJ*, **325**, 628.
121. Horie, R., Kihara, M., Lovenberg, W., Ben-Ishay, D., Bianchi, G., Iwai, J., Nagaoka, A., Rapp, J.P., Sassard, J., Simpson, F.O., & et al. (1986) Comparison of various genetic hypertensive rat strains. *J. Hypertens.*, **4 Suppl.**, 11-14.
122. Ibelgauff, H. (1999) Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia. *Internet*.
123. Ikeda, K., Nara, Y., & Yamori, Y. (1991) Indirect systolic and mean blood pressure determination by a new tail cuff method in spontaneously hypertensive rats. *Lab. Anim.*, **25**, 26-29.

124. Imai,K., Takeshita,A., & Hanazawa,S. (2000) Transforming growth factor-beta inhibits lipopolysaccharide-stimulated expression of inflammatory cytokines in mouse macrophages through downregulation of activation protein 1 and CD14 receptor expression. *Infect.Immun.*, **68**, 2418-2423.
125. Ishikura,H., Uedono,Y., Yamagami,K., Arai,T., Takeyama,N., & Tanaka,T. (1996) Activation of neutrophil function by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor improves the survival of rats with peritonitis. *Surg.Today*, **26**, 694-699.
126. Ishimitsu,T., Uehara,Y., Numabe,A., Tsukada,H., Ogawa,Y., & Yagi,S. (1994) Antihypertensive effect of interleukin-2 in salt-sensitive Dahl rats. *Hypertension*, **23**, 68-73.
127. Junge,A., Seitz,S., Krueger,A., Brueck,E., Gotzen,L., Lorenz,W., & Celik,I. (2002) Influence of antibiotic prophylaxis on mortality and perioperative histamine release in trauma: experiments with clinic modelling randomized trials in animals. *Inflamm.Res.*, **51 Suppl.**, 27-28.
128. Kalden,J.R. (2002) Emerging role of anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatic diseases. *Arthritis Res.*, **4 Suppl.**, 34-40.
129. Kalyanaraman,M., Heidemann,S.M., & Sarnaik,A.P. (1998) Macrophage inflammatory protein-2 predicts acute lung injury in endotoxemia. *J.Investig.Med.*, **46**, 275-278.
130. Kelly,N.M. & Cross,A.S. (1992) Interleukin-6 is a better marker of lethality than tumor necrosis factor in endotoxin treated mice. *FEMS Microbiol.Immunol.*, **4**, 317-322.
131. Khraibi,A.A. (1991) Association between disturbances in the immune system and hypertension. *Am.J.Hypertens.*, **4**, 635-641.
132. Kirschner,M. (1926) Die Behandlung der akuten eitrigen freien Bauchfellentzündung. *Arch.Klin.Chir*, **142**, 253-311.
133. Klir,J.J., Roth,J., Szelenyi,Z., McClellan,J.L., & Kluger,M.J. (1993) Role of hypothalamic interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in LPS fever in rat. *Am.J.Physiol.*, **265**, R512-R517.

134. Kluger, M.J. (1991) Fever: Role of pyrogens and cryogens. *Physiol.Rev.*, **71**, 93-127.
135. Knoferl, M.W., Angele, M.K., Diodato, M.D., Schwacha, M.G., Ayala, A., Cioffi, W.G., Bland, K.I., & Chaudry, I.H. (2002) Female sex hormones regulate macrophage function after trauma-hemorrhage and prevent increased death rate from subsequent sepsis. *Ann.Surg.*, **235**, 105-112.
136. Kotake, Y., Sang, H., Tabatabaie, T., Wallis, G.L., Moore, D.R., & Stewart, C.A. (2002) Interleukin-10 overexpression mediates phenyl-N-tert-butyl nitron protection from endotoxemia. *Shock*, **17**, 210-216.
137. Kullberg, B.J. & van der Meer, J.W.M. (1996) *Infectious diseases: the role of haematopoietic growth factors*, pp. 1-52.
138. Kumins, N.H., Hunt, J., Gamelli, R.L., & Filkins, J.P. (1996) Partial hepatectomy reduces the endotoxin-induced peak circulating level of tumor necrosis factor in rats. *Shock*, **5**, 385-388.
139. Leon, L., White, A.A., & Kluger, M.J. (1998) Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. *Am.J.Physiol.*, **275**, R269-R277.
140. Link, H. (1995) G-CSF und GM-CSF. Wachstumsfaktoren der Hämatopoese. *Arzneimitteltherapie*, **13**, 198-206.
141. Link, H., Herrmann, F., Welte, K., Aulitzky, W.E., Ganser, A., Kern, W., Meyer, P., Schrappe, M., Schmoll, H.J., Werdan, K., & Kern, P. (1994) Rationale Therapie mit G-CSF und GM-CSF. *Chemotherapie Journal*, **3**, 116-130.
142. Lorenz, W., Dick, W., Junginger, T., Ohmann, C., Doenicke, A., & Rothmund, M. (1987) Biomedical and clinimetric approaches in the cause assessment of perioperative risk: establishment of a German ASA-classification. *Langenbecks Arch.Chir.*, **372**, 199-209.
143. Lorenz, W., Reimund, K.-P., Weitzel, F., Celik, I., Kurnatowski, M., Schneider, C., Mannheim, W., Heiske, A., Neumann, K., Sitter, H., & Rothmund, M. (1994) Granulocyte colony-stimulating factor prophylaxis before operation protects against lethal consequences of postoperative peritonitis. *Surgery*, **116**, 925-934.

144. Lorenz,W., Stinner,B., Bauhofer,A., Rothmund,M., Celik,I., Fingerhut,A., Koller,M., Lorijn,R.H.W., Nyström,P.-O., Sitter,H., Schäfer,H., Schein,M., Solomkin,J.S., Troidl,H., Wyatt,J., Wittmann,D.H., & Lucerne Group for Consensus-assisted Development of the Study Protocol on Prevention of Abdominal Sepsis: Example G-CSF (2001) Granulocyte-colony stimulating factor in the prevention of postoperative infectious complications and sub-optimum recovery from operation in patients with colorectal cancer and increased preoperative risk (ASA 3 and 4). Protocol of a controlled clinical trial developed by consensus of an international study group. Part one: Rationale and hypothesis. *Inflamm.Res.*, **50**, 115-122.
145. Luheshi,G. & Rothwell,N. (1996) Cytokines and fever. *Int.Arch.Allergy Immunol.*, **109**, 301-307.
146. Lundblad,R., Nesland,J.M., & Giercksky,K.-E. (1996) Granulocyte colony-stimulating factor improves survival rate and reduces concentration of bacteria, endotoxin, tumor necrosis factor, and endothelin-1 in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. *Crit.Care Med.*, **24**, 820-826.
147. Lundblad,R., Wang,Y.M., Kvalheim,G., Lingaas,E., & Giercksky,K.-E. (1995) Granulocyte colony-stimulating factor improves myelopoiesis and host defence in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. *Shock*, **4**, 68-73.
148. Ma,P., Chen,D., Pan,J., & Du,B. (2002) Genomic polymorphism within interleukin-1 family cytokines influences the outcome of septic patients. *Crit.Care Med.*, **30**, 1046-1050.
149. Maier,S., Emmanuilidis,K., Entleutner,M., Zantl,N., Werner,M., Pfeffer,K., & Heidecke,C.D. (2000) Massive chemokine transcription in acute renal failure due to polymicrobial sepsis. *Shock*, **14**, 187-192.
150. Malone,D.L., Kuhls,D., Napolitano,L.M., McCarter,R., & Scalea,T. (2001) Back to basics: validation of the admission systemic inflammatory response syndrome score in predicting outcome in trauma. *The Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care*, **51**, 458-463.
151. Manning,R.D., Jr., Hu,L., Tan,D.Y., & Meng,S. (2001) Role of abnormal nitric oxide systems in salt-sensitive hypertension. *Am.J.Hypertens.*, **14**, S68-S73.

152. Marchant,A., Vincent,J.-L., & Goldman,M. (1996) Interleukin-10 as a protective cytokine produced during sepsis. Novel therapeutic strategies in the treatment of sepsis (ed. by D. C. Morrison & J. L. Ryan), pp. 301-311. Dekker,M., New York, Basel, Hong Kong.

153. Martinez,B., Gomez,J., Guerra,B., Gomez,V.B., Gomez,J.R., Siamarro,E., Canteras,M., & Valdes,M. (2000) Risk factors and prognostics of nosocomial infection of surgical wounds in a general hospital. *Rev.Esp.Quimioter.*, **13**, 281-285.

154. Mathiak,G., Szewczyk,D., Abdullah,F., Ovadia,P., Feuerstein,G., & Rabinovici,R. (2000) An improved clinically relevant sepsis model in the conscious rat. *Crit.Care Med.*, **28**, 1947-1952.

155. Matsushita,M., Thiel,S., Jensenius,J., Terai,I., & Fujita,T. (2000) Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J.Immunol.*, **165**, 2637-2642.

156. McCurdy,D.K., Lehman,T.J., Bernstein,B., Hanson,V., King,K.K., Nadorra,R., & Landing,B.H. (1992) Lupus nephritis: prognostic factors in children. *Pediatrics*, **89**, 240-246.

157. McPeck,B., Gasko,M., & Mosteller,F. (1986) Measuring outcome from anesthesia and operation. *Theor.Surg.*, **1**, 2-9.

158. Mercer-Jones,M.A., Shrotri,M.S., Heinzelmann,M., Peyton,J.C., & Cheadle,W.G. (1999) Regulation of early peritoneal neutrophil migration by macrophage inflammatory protein-2 and mast cells in experimental peritonitis. *J.Leukoc.Biol.*, **65**, 249-255.

159. Metcalf,D. (1991) The colony-stimulating factors: discovery to clinical use. *Phil.Trans.R.Soc.Lond.*, **333**, 147-173.

160. Miura,E., Procianoy,R.S., Bittar,C., Miura,C.S., Miura,M.S., Mello,C., & Christensen,R.D. (2001) A randomized, double-masked, placebo-controlled trial of recombinant granulocyte colony-stimulating factor administration to preterm infants with the clinical diagnosis of early-onset sepsis. *Pediatrics*, **107**, 30-35.

161. Miura,N., Suzuki,S., Hamada,Y., Kamimura,R., Fujiki,M., Misumi,K., & Sakamoto,H. (1999) Salt water promotes hypertension in Dahl-S rats. *Exp.Anim.*, **48**, 289-292.

162. Nagata,S. (1994) Granulocyte Colony Stimulating Factor and its receptors. The cytokine handbook, 2nd ed (ed. by Osaka bioscience institute), pp. 371-385. Osaka bioscience institute, Osaka.
163. Nakamura,A., Kohsaka,T., & Johns,E.J. (1996) Neuro-regulation of interleukin-6 gene expression in the spontaneously hypertensive rat kidney. *J.Hypertens.*, **14**, 839-845.
164. Nelson,S. (1994) Role of granulocyte colony-stimulating factor in the immune response to acute bacterial infection in the nonneutropenic host: an overview. *Clin.Infect.Dis.*, **18**, 197-204.
165. Nelson,S., Belknap,S.M., Carlson,R.W., Dale,D., DeBoisblanc,B., Farkas,S., Fotheringham,N., Ho,H., Marrie,T., Movahhed,H., Root,R., & Wilson,J. (1998) A randomized controlled trial of filgrastim as an adjunct to antibiotics for treatment of hospitalized patients with community-acquired pneumonia. CAP Study Group. *J.Infect.Dis.*, **178**, 1075-1080.
166. Nemeth,Z.H., Hasko,G., & Vizi,E.S. (1998) Pyrrolidine dithiocarbamate augments IL-10, inhibits TNF-alpha, MIP-1alpha, IL-12, and nitric oxide production and protects from the lethal effect of endotoxin. *Shock*, **10**, 49-53.
167. Neugebauer,E., Lorenz,W., Maroske,D., & Barthlen,W. (1987) Mediatorenviefalt beim septischen Schock. Sepsis - Experimentelle Befunde, klinische Erfahrungen, pp. 8-25. J. Schulte am Esch, Zuckschwerdt Verlag München,Bern,Wien,San Francisco.
168. Neugebauer,E., Schäfer,U., Rixen,D., & Bouillon,B. (1996) Modulation of the humoral mediator network in the treatment of shock and sepsis. *Shock*, 275-288.
169. Nussler,A.K., Wittel,U.A., Nussler,N.C., & Beger,H.G. (1999) Leukocytes, the Janus cells in inflammatory disease. *Langenbeck's Arch.Surg.*, **384**, 222-232.
170. Nyström,P.-O. (1998) The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J.Antimicrobial.Chemother.*, **41**, 1-7.

171. Nyström,P.-O., Bax,R., Dellinger,E.P., Dominioni,L., Knaus,W.A., Meakins,J.L., Ohmann,C., Solomkin,J.S., Wacha,H., & Wittmann,D.H. (1990) Proposed definitions for diagnosis, severity scoring, stratification, and outcome for trials in intra-abdominal infection. *World J.Surg.*, **14**, 148-158.
172. O'Reilly,M., Silver,G.M., Greenhalgh,D.G., Gamelli,R.L., Davis,J.H., & Herbert,J.C. (1994) Treatment of intra-abdominal infection with granulocyte colony-stimulating factor. *The Journal of Trauma: Injury, Infection and Critical Care*, **33**, 679-682.
173. Okamoto,K. & Aoki,K. (1963) Development of a Strain of Spontaneously Hypertensive Rats. *Jap.Circ.J.*, **27**.
174. Pajkrt,D., Manten,A., van der Poll,T., Tiel van Buul,M.M., Jansen,J., Wouter ten Cate,J., & Van Deventer,S.J. (1997) Modulation of cytokine release and neutrophil function by granulocyte colony-stimulating factor during endotoxemia in humans. *Blood*, **90**, 1415-1424.
175. Parker,S.J. & Watkins,P.E. (2001) Experimental models of Gram-negative sepsis. *British Journal of Surgery*, **88**, 22-30.
176. Parrillo,J.E. (1993) Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N.Eng.J.Med.*, **329**, 1471-1477.
177. Parry,S.L., Sebbag,M., Feldmann,M., & Brennan,F.M. (1997) Contact with T cells modulates monocyte IL-10 production: role of T cell membrane TNF-alpha. *J.Immunol.*, **158**, 3673-3681.
178. Patel,R.T., Deen,K.I., Youngs,D., Warwick,J., & Keighley,M.R.B. (1994) Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis. *British Journal of Surgery*, **81**, 1306-1308.
179. Pausova,Z., Kunes,J., Kren,V., Krenova,D., Tremblay,J., & Hamet,P. (1999) Endotoxin response in spontaneously hypertensive rats: a role of the TNFalpha-gene region. *Folia Biol.*, **45**, 3-6.
180. Pavlidis,T.E. (2003) Cellular changes in association with defense mechanisms in intra-abdominal sepsis. *Minerva Chir.*, **58**, 777-781.
181. Pavlidis,T.E., Galatianos,I.N., Papaziogas,B.T., Lazaridis,C.N., Atmatzidis,K.S., Makris,J.G., & Papaziogas,T.B. (2001) Complete

- dehiscence of the abdominal wound and incriminating factors. *Eur.J.Surg.*, **167**, 351-354.
182. Peeters,A.C., Netea,M.G., Janssen,M.C., Kullberg,B.J., Van der Meer,J.W., & Thien,T. (2001) Pro-inflammatory cytokines in patients with essential hypertension. *Eur.J.Clin.Invest.*, **31**, 31-36.
183. Pender,B.S., Chen,H., Ashton,S., Wise,W.C., Zingarelli,B., Cusumano,V., & Cook,J.A. (1996) Transforming growth factor beta 1 alters rat peritoneal macrophage mediator production and improves survival during endotoxic shock. *Eur.Cytokine Netw.*, **7**, 137-142.
184. Peter,H.H. & Pichler,W.J. (1991) *Klinische Immunologie*, p. 1-933 S. Urban&Fischer, München.
185. Pinsky,M.R. (2001) Sepsis: a pro- and anti-inflammatory disequilibrium syndrome. *Contrib.Nephrol.*, **132**, 354-366.
186. Platell,C., Papadimitriou,J.M., & Hall,J.C. (2000) The influence of lavage on peritonitis. *J.Am.Coll.Surg.*, **191**, 672-680.
187. Preheim,L.C., Snitily,M.U., & Gentry,M.J. (1996) Effects of granulocyte colony-stimulating factor in cirrhotic rats with pneumococcal pneumonia. *J.Infect.Dis.*, **174**, 225-228.
188. Rangel-Frausto,M.S., Pittet,D., Costigan,M., Hwang,T., Davis,C.S., & Wenzel,R.P. (1995) The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. *JAMA*, **273**, 117-123.
189. Rapp,J.P. (2000) Genetic analysis of inherited hypertension in the rat. *Physiol.Rev.*, **80**, 135-172.
190. Rapp,J.P. & Dene,H. (1985) Development and characteristics of inbred strains of Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *Hypertension*, **7**, 340-349.
191. Rebeck,N. & Finn,A. (1994) Polymorphonuclear granulocyte expression of CD11a/CD18, CD11b/CD18 and L-selectin in normal individuals. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, **8**, 189-195.

192. Remick,D.G., Garg,S.J., Newcomb,D.E., Wollenberg,G., Huie,T.K., & Bolgos,G.L. (1998) Exogenous interleukin-10 fails to decrease the mortality or morbidity of sepsis. *Crit.Care Med.*, **26**, 895-904.

193. Remick,D.G., Newcomb,D.E., Bolgos,G.L., & Call,D.R. (2000) Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: Lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*, **13**, 110-116.

194. Riou,J.P., Cohen,J.R., & Johnson,H.Jr. (1992) Factors influencing wound dehiscence. *Am.J.Surg.*, **163**, 324-330.

195. Rongione,A.J., Kusske,A.M., Ashley,S.W., Reber,H.A., & McFadden,D.W. (1997) Interleukin-10 prevents early cytokine release in severe intraabdominal infection and sepsis. *J.Surg.Res.*, **70**, 107-112.

196. Rongione,A.J., Kusske,A.M., Kwan,K., Ashley,S.W., Reber,H.A., & McFadden,D.W. (2000) Interleukin-10 protects against lethality of intra-abdominal infection and sepsis. *J.Gastrointest.Surg.*, **4**, 70-76.

197. Russwurm,S., Vickers,J., Meier-Hellmann,A., Spangenberg,P., Bredle,D., Reinhart,K., & Losche,W. (2002) Platelet and leukocyte activation correlate with the severity of septic organ dysfunction. *Shock*, **17**, 263-268.

198. Saiki,R.K., Scharf,S., Faloona,F., Mullis,K.B., Horn,G.T., Erlich,H.A., & Arnheim,A. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350-1354.

199. Sakamaki,T., Tajima,Y., Ichikawa,S., & Murata,K. (1987) Measurement of mean arterial pressure in rats by a tail-cuff method with sensitive photoelectric sensors. *Jikken Dobutsu*, **36**, 409-414.

200. Sandborn,W.J. & Hanauer,S.B. (2002) Infliximab in the treatment of Crohn's disease: a user's guide for clinicians. *Am.J.Gastroenterol.*, **97**, 2962-2972.

201. Sang,H., Wallis,G.L., Stewart,C.A., & Kotake,Y. (1999) Expression of cytokines and activation of transcription factors in lipopolysaccharide-administered rats and their inhibition by phenyl N-tert-butylNitron (PBN). *Arch.Biochem.Biophys.*, **363**, 341-348.

202. Schein, M., Wittmann, D.H., & Lorenz, W. (1996) Duration of antibiotic treatment in surgical infections of the abdomen. *Eur.J.Surg.*, **576 Suppl.**, 1-75.
203. Schutzbank, T.E. & Stern, H.J. (1993) Principles and applications of the polymerase chain reaction. *J.Int.Fed.Clin.Chem.*, **5**, 96-105.
204. Shemes, B.D., Zallen, G.S., McIntyre, R.C.Jr., Bensard, D.D., Pulido, E.J., Miller, S.A., Pomerantz, B.J., Selzman, C.H., Meng, X., & Harken, A.H. (2000) Chemokines as mediators of diseases related to surgical condition. *Shock*, **14**, 1-7.
205. Shin, D.I., Banning, U., Kim, Y.M., Verheyen, J., Hannen, M., Boning, H., & Korholz, D. (1999) Interleukin 10 inhibits TNF-alpha production in human monocytes independently of interleukin 12 and interleukin 1 beta. *Immunol.Invest.*, **28**, 165-175.
206. Siegling, A., Lehmann, M., Platzer, C., Emmrich, F., & Volk, H.-D. (1994) A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. *J.Immunol.Meth.*, **177**, 23-28.
207. Siewert, J.R. (1998) *Chirurgie*, 6 edn, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
208. Silver, G.M., Gamelli, R.L., & O'Reilly, M. (1989) The beneficial effect of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in combination with gentamicin on survival after pseudomonas burn wound infection. *Surgery*, **106**, 452-456.
209. Simchon, S., Manger, W.M., Shi, G.S., & Brensilver, J. (1992) Impaired renal vascular reactivity in prehypertensive Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension*, **20**, 524-532.
210. Siren, A.L., Heldman, E., Doron, D., Lysko, P.G., Yue, T.L., Liu, Y., Feuerstein, G., & Hallenbeck, J.M. (1992) Release of proinflammatory and prothrombotic mediators in the brain and peripheral circulation in spontaneously hypertensive and normotensive Wistar-Kyoto rats. *Stroke*, **23**, 1643-1650.
211. Sitsen, J.M. & de Jong, W. (1983) Hypoalgesia in genetically hypertensive rats (SHR) is absent in rats with experimental hypertension. *Hypertension*, **5**, 185-190.

212. Skau, T., Nyström, P.O., Öhmann, L., & Stendahl, O. (1986) The kinetics of peritoneal clearance of *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis* and participating defense mechanisms. *Arch.Surg.*, **121**, 1033-1039.
213. Snajdar, R.M., Dene, H., & Rapp, J.P. (1986) Atrial natriuretic factor in inbred Dahl salt-sensitive and salt-resistant rats. *J.Hypertens.*, **4 Suppl.**, 343-347.
214. Spencer-Green, G. (2000) Etanercept (Enbrel): update on therapeutic use. *Ann.Rheum.Dis.*, **59 Suppl.**, 46-49.
215. Spittler, A., Razenberger, M., Kupper, H., Kaul, M., Hackl, W., Boltz-Nitulescu, G., Fugger, R., & Roth, E. (2000) Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties and cytokine production. *Clin.Infect.Dis.*, **31**, 1338-1342.
216. Sriskandan, S. & Cohen, J. (1999) Gram-positive sepsis. Mechanisms and differences from gram-negative sepsis. *Infect.Dis.Clin.North Am.*, **13**, 397-412.
217. Stadler, J., Heidecke, C.D., Bartels, H., Holzmann, B., Wagner, H., & Siewert, J.R. (1995) Immunsuppression und Sepsis. *Chirurg*, **66**, 11-17.
218. Standiford, T.J., Strieter, R.M., Lukacs, N.W., & Kunkel, S.L. (1995) Neutralization of IL-10 increases lethality in endotoxemia. Cooperative effects of macrophage inflammatory protein-2 and tumor necrosis factor. *J.Immunol.*, **155**, 2222-2229.
219. Stephens D.P., Fisher D.A., & Currie B.J. (2002) An audit of the use of granulocyte colony-stimulating factor in septic shock. *Intern.Med.J.*, **32**, 143-148.
220. Stinner, B., Bauhofer, A., Lorenz, W., Rothmund, M., Plaul, U., Torossian, A., Celik, I., Sitter, H., Koller, M., Black, A., Encke, A., Greger, B., van Goor, H., Hanisch, E., Hesterberg, R., Klose, K.J., Lacaine, F., Lorijn, R.H.W., Solovera, J., Margolis, C., Neugebauer, E., Nyström, P.-O., Reemst, P.H.M., Schein, M., Solovera, J., & Lucerne Group for Consensus-assisted Development of the Study Protocol on Prevention of Abdominal Sepsis: Example G-CSF (2001) Granulocyte-colony stimulating factor in the prevention of postoperative infectious complications and sub-optimum recovery

- from operation in patients with colorectal cancer and increased preoperative risk (ASA 3 and 4). Protocol of a controlled clinical trial developed by consensus of an international study group. Part three: individual patient, complication algorithm and quality management. *Inflamm.Res.*, **50**, 233-248.
221. Stüber,F., Petersen,M., Bockelmann,F., & Schade,U. (1994) A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor- α concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit.Care Med.*, **24**, 381-348.
222. Swensson,O., Schubert,C., Cristophers,E., & Schroeder,J.-M. (1991) Inflammatory properties of neutrophil-activating protein-1/interleukin 8 (NAP-1/IL-8) in human skin: A light- and electronmicroscopic study. *J.Invest.Dermatol.*, **96**, 682-689.
223. Takeichi,N., Suzuki,K., Okayasu,T., & Kobayashi,H. (1980) Immunological depression in spontaneously hypertensive rats. *Clin.Exp.Immunol.*, **40**, 120-126.
224. Tan,D.Y., Meng,S., & Manning,R.D.J. (1999) Role of neuronal nitric oxide synthase in Dahl salt-sensitive hypertension. *Hypertension*, **33**, 456-461.
225. Tanaka,H. & Kaneko,T. (1991) Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in the rat. *Drug Metabolism and Disposition*, **19**, 200-204.
226. Taylor,B.K., Roderick,R.E., St Lezin,E., & Basbaum,A.I. (2001) Hypoalgesia and hyperalgesia with inherited hypertension in the rat. *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol*, **280**, R345-R354.
227. Tsujikawa,A., Kiryu,J., Yamashiro,K., Nonaka,A., Nishijima,K., Honda,Y., & Ogura,Y. (2000) Interactions between blood cells and retinal endothelium in endotoxic sepsis. *Hypertension*, **36**, 250-258.
228. Tsujimoto,H., Ono,S., Mochizuki,H., Aosasa,S., Majima,T., Ueno,C., & Matsumoto,A. (2002) Role of macrophage inflammatory protein 2 in acute lung injury in murine peritonitis. *J.Surg.Res.*, **103**, 61-67.
229. Udenfreid,S. (1976) Spontaneously Hypertensive Rats (SHR): Guidelines for breeding, care and use. *ILAR News*, **19**.

230. Villa,P., Shaklee,C.L., Meazza,C., Agnello,D., Ghezzi,P., & Senaldi,G. (1998) Granulocyte colony-stimulating factor and antibiotics in the prophylaxis of a murine model of polymicrobial peritonitis and sepsis. *J.Infect.Dis.*, **178**, 471-477.
231. Volk,H.D., Reinke,P., & Docke,W.D. (2000) Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis'. *Chem.Immunol.*, **74**, 162-177.
232. Vorup-Jensen,T., Petersen,S.V., Hansen,G., Poulsen,K., Schwaeble,W., Sim,R.B., Reid,K.B., Davis,S.J., Thiel,S., & Jensenius,J.C. (2000) Distinct pathways of mannan-binding lectin (MBL)- and C1 complex autoactivation revealed by reconstitution of MBL with recombinant MBL-associated serine protease-2. *J.Immunol.*, **165**, 2093-2100.
233. Walley,K.R., Lukacs,N.W., Standiford,T.J., Strieter,R.M., & Kunkel,S.L. (1997) Elevated levels of macrophage inflammatory protein 2 in severe murine peritonitis increase neutrophil recruitment and mortality. *Infect.Immun.*, **65**, 3847-3851.
234. Wang,J.E., Dahle,M.K., McDonald,M., Foster,S.J., Aasen,A.O., & Thiemermann,C. (2003) Peptidoglycan and lipoteichoic acid in gram-positive bacterial sepsis: receptors, signal transduction, biological effects, and synergism. *Shock*, **20**, 402-414.
235. Wang,J.M., Chen,Z.G., Collea,S., Bonilla,M.A., Welte,K., Bordignon,C., & Mantovani,A. (1988) Chemotactic activity of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*, **72**, 1456-1460.
236. Ward,R. (1995) Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management* (ed. by J.M.Laragh & B.M.Brenner), pp. 67-88. Raven, New York.
237. Weinstein,W.M., Onderdonk,A.B., Bartlett,J.G., Louie,T.J., & Gorbach,S.L. (1975) Antimicrobial therapy of experimental intraabdominal sepsis. *J.Infect.Dis.*, **132**, 282-286.
238. Weiss,M., Gross-Weege,W., Schneider,M., Neidhardt,H., Liebert,S., Mirow,N., & Wernet,P. (1995) Enhancement of neutrophil function by in vivo filgrastim treatment for prophylaxis of sepsis in surgical intensive care patients. *J.Crit.Care*, **10**, 21-26.

239. Welte, K., Grabrilove, J., Bronchud, M.H., Platzer, E., & Morstyn, G. (1996) Filgrastim (r-metHuG-CSF): the first 10 years. *Blood*, **88**, 1907-1929.
240. Wenzel, R.P. (2002) Treating sepsis. *New England Journal of Medicine*, **347**, 966-967.
241. Wichterman, K.A., Baue, A.E., & Caudry, I.H. (1980) Sepsis and septic shock - A review of laboratory models and a proposal. *J.Surg.Res.*, **29**, 189-201.
242. Wiik, H., Syrjala, H., Karttunen, R., Bloigu, A., & Haukipuro, K. (2001) Neutrophil adhesion molecules in colorectal surgery: effect of filgrastim given perioperatively. *Eur.J.Surg.*, **167**, 700-704.
243. Wiik, H.T., Syrjala, H.P., Silvennoinen-Kassinen, S.H., Laurila, J.J., & Haukipuro, K.A. (1999) Use of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor in colorectal surgery. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.*, **18**, 819-822.
244. Wittmann, D.H., Schein, M., & Condon, R.E. (1996) Management of secondary peritonitis. *Ann.Surg.*, **224**, 10-18.
245. Wolpe, S.D. & Cerami, A. (1989) Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: members of a novel superfamily of cytokines. *FASEB J.*, **3**, 2565-2573.
246. Woltmann, A., Hamann, L., Ulmer, A.J., Gerdes, J., Bruch, H.-P., & Rietschel, E.T. (1998) Molecular mechanisms of sepsis. *Langenbeck's Arch.Surg.*, **383**, 2-10.
247. Yoshimoto, T., Nakanishi, K., Hirose, S., Hiroishi, K., Okamura, H., Takemoto, Y., Kanamaru, A., Hada, T., Tamura, T., Kakishita, E., & et al. (1992) High serum IL-6 level reflects susceptible status of the host to endotoxin and IL-1/tumor necrosis factor. *J.Immunol.*, **148**, 3596-3603.
248. Zhang, P., Bagby, G.J., Stoltz, D.A., Summer, W.R., & Nelson, S. (1998) Enhancement of peritoneal leukocyte function by granulocyte colony-stimulating factor in rats with abdominal sepsis. *Crit.Care Med.*, **26**, 315-321.

-
249. Ziegler, E.J., Fisher, C.J., Sprung, C.L., Straube, R.C., Sadoff, J.C., Foulke, G.E., Wortel, C.H., Fink, M.P., Dellinger, R.P., Teng, N.N.H., Allen, I.E., Berger, H.J., Knatterud, G.L., LoBuglio, A.F., Smith, C.R., & HA-1A Sepsis Study Group (1991) Treatment of Gram-negative bacteriemia and septic shock with HA- 1A human monoclonal antibody against endotoxin. *N.Engl.J.Med.*, **324**, 429-436.
250. Zimmerman, J.E., Knaus, W.A., Sun, X., & Wagner, D.P. (1996) Severity stratification and outcome prediction for multisystem organ failure and dysfunction. *World J.Surg.*, **20**, 401-405.

9 Anhang

9.1 Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: **Björn Tischer**
Geboren am: 18. August 1972
Geburtsort: Alzenau i.Ufr , Bayern
Nationalität: Deutsch
Familienstand: ledig
Religion: evangelisch
Wohnort: Rembrandtstr. 11, 54634 Bitburg
Telefon: 0049-(0)6561-949120
e-mail: bj.tischer@web.de

Schulbildung:

1979 – 1983 Grundschule Steinkulle, Haan, Nordrhein-Westfalen
1983 – 1992 Gymnasium Haan, Nordrhein-Westfalen
1989/90 Austauschschüler für ein Jahr, Lebanon Union High School, **Oregon, USA**
19. Juni 1992 Abitur

Zivildienst:

Juni 1992 – Sept. 1993 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Haan

Berufsausbildung:

Okt. 1993 – Feb. 1996 Technische Universität Karlsruhe, Studium der Verfahrenstechnik, Vordiplom
März 1996 Beginn des Studiums der **Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg**, Hessen
April 1998 Ärztliche Vorprüfung (Physikum)
April 1999 1. Staatsexamen (Note „gut“)
März 2001 2. Staatsexamen (Note „gut“)
16. Oktober 2002 3. Staatsexamen in Kassel (Note „gut“)

Praktisches Jahr:

1. Terial Chirurgie
Rotes Kreuz Krankenhaus Kassel
Prof. Dr. med. Hesterberg

2. Terial Wahlfach Orthopädie
Orthopädische Klinik Kassel
Prof. Dr. med. Siebert

3. Terial Innere Medizin
Kreisspital **Brig/Schweiz**
Prof. Dr. med. J. Fischer

Berufliche Tätigkeiten:

Arzt im Praktikum ab 13.01.2003 in der Chirurgie im Clemens-
August Krankenhaus in Bitburg

Assistenzarzt ab 13.07.04 in der Chirurgie im Clemens-
August Krankenhaus in Bitburg

9.2 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Bauhofer, Baum, Beato, Bien, Braun (Kassel), Brilla, Celik, Cetin, Czubayko, Daut, Doss, Drastig (Kassel), Effendy, Evequoz (Brig/Schweiz), Feuser, Fischer (Schweiz), Fruhstorfer, Gemsa, Geus, Görg, Gotzen, Griss, Gropp, Habermehl, Happle, Hasilik, Heeg, Hellinger, Hesse, Hesterberg (Kassel), Himmelmann, Hoffmann, Joseph, Kaiser (Kassel), Katschinski, Kern, Klenk, Klose, Köhler, Koolmann, Köppler, Kretschmer, Kroll, Kuhlmann, Lammel, Lang, Lennartz, Leppek, Löffler, Lorenz, Mai (Kassel), Maisch, McGregor, Moll, Moosdorf, Mueller, Mutters, Neubauer, Nies, Niessing, Oertel, Petermann, Pfab, Pfeiffer, Pitzer (Gladenbach), Renschmidt, Renz, Richter, Rohde (Kassel), Röhm, Rosenow, Rothmund, Schachtschnabel, Schäfer, Schmitgen (England), Seitz, Seyberth, Siebert (Kassel), Slencka, Sommer, Stiletto, Stinner, Voigt, von Wichert, Wagner, Weide, Weihe, Werner, Westermann. Wilke

9.3 Danksagung

Besonders möchte ich an dieser Stelle dem emeritierten Herrn Prof. Dr. W. Lorenz, Direktor des Instituts für Theoretische Chirurgie der Philipps-Universität Marburg, für sein Vertrauen und für die Überlassung des interessanten Themas danken.

Ganz besonders herzlich danke ich meinem Betreuer PD Dr. rer. nat. Artur Bauhofer dafür, dass er mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit begleitet hat, mir jederzeit mit wertvollen Ratschlägen zur Seite stand und mich mit zahlreichen Anregungen bei der schriftlichen Niederlegung der Dissertation beratend unterstützt hat.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Theoretische Chirurgie, vor allem Herrn PD Dr. med. Ilhan Celik, Herrn Dieter Künkel und Herrn Sebastian Seitz.

Frau Ingeborg Vonnemann für ihre tatkräftige Unterstützung bei den Tierversuchen sowie im Labor und Herrn Armin Demant für seine wertvolle Hilfe bei der Durchführung der Tierversuche, sowie in allen Fragen zu den Tieren gebührt mein besonderer Dank.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für die uneingeschränkte langjährige Unterstützung danken. Ohne sie wären diese Arbeit und meine Studienzeit nicht möglich gewesen.

9.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

Hypertensive Ratten mit Antibiotika- und G-CSF Prophylaxe
überleben eine abdominale Sepsis besser als Dahl-Salz-sensitive
und normotensive Wistar Ratten in klinik-modellierenden
randomisierten Studien (CMRTs)

in dem Institut für Theoretische Chirurgie an der Philipps-Universität Marburg unter der geschäftsführenden Leitung von Herrn Prof. Dr. W. Lorenz (Emeritus) ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch habe ich die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 25.04.2005