Aus der Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie (Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Claus-Dieter Heidecke) der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Evaluierung der Wirksamkeit von FX06 in der Therapie der postoperativen polymikrobiellen Sepsis im Tierversuch

Inaugural - Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.) der Universitätsmedizin der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald 2014

> vorgelegt von: Sven Flemming geb. am: 07.11.1984 in: Rostock

Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reiner Biffar
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. C. D. Heidecke (Betreuer)
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. C. Bruns (Magdeburg)
Ort, Raum:	Universitätsmedizin Greifswald
	Klinik und Poliklinik für Chirurgie
	Abteilung für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie
	Ferdinand-Sauerbruch-Straße,17475 Greifswald
	Seminarraum der Thoraxchirurgie
Tag der Disputation:	23. Februar 2015

Inhaltsverzeichnis

Abbildungs- und Abkürzungsverzeichnis	iii
1. Einleitung	1
2. Grundlagen	3
2.1. Definition und Einteilung der Sepsis	3
2.2. Immunsystem	7
2.2.1. Grundlagen des Immunsystems	7
2.2.2. Homöostase des Immunsystems	8
2.3. Pathophysiologie der Sepsis	9
2.4. Besonderheiten der abdominellen Sepsis	
2.4.1. Pathophysiologie der abdominellen Sepsis	
2.4.2. Klassifizierung der abdominellen Sepsis	
2.5. Sepsismodelle	
2.5.1. Inokulation von Bakterien	15
2.5.2. Endotoxin-Modell	
2.5.3. Induktion eines lokalen Infektfokus	
2.5.3.1. Cecal Ligation and Puncture	
2.5.3.2. Colon ascendens Stent Peritonitis	
2.6. Leukozyten-Endothel-Interaktion	
2.6.1. Leukozyten-Transmigration	
2.7. Fibrinogen und das Fibrin-Fragment Bβ15-42	
2.7.1. Klinische Anwendung von Bβ15-42	20
2.8. Fragestellung	20
3. Material und Methoden	
3.1. Material	
3.1.1. Laborgeräte	22
3.1.2. Chirurgisches Besteck	22
3.1.3. Chirurgisches Nahtmaterial	23

3.1.4. Verbrauchsmaterialien	23
3.1.5. Reagenzien und Chemikalien	24
3.1.6. Kits	24
3.1.7. Puffer und Lösungen	25
3.1.8. Tiere	25
3.2. Tierversuche	25
3.2.1. Genehmigung der Tierversuche	25
3.2.1. Tiere und Tierhaltung	26
3.2.2. Tiermodell: Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)	26
3.2.2.1. Anästhesie	26
3.2.2.2. Operation	27
3.2.4. Organentnahmen zur Herstellung von Organüberständen	
3.2.5. Gewinnung von Peritoneallavage	
3.2.6. Gewinnung von Serum	
3.2.7. Gewinnung von Vollblut	
3.2.8. Gewinnung von Organüberständen	
3.3. Zytokin- und Chemokinanalyse	
3.3.1. Cytometric Bead Array (CBA)	33
3.3.1.1. Versuchsprotokoll	34
3.3.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	35
3.3.2.1. Versuchsprotokoll	35
3.4. Bakteriologische Untersuchung	
3.5. Bestimmung der Kapillarpermeabilität	
3.5.1. Versuchsprotokoll	
3.6. Tierversuchsanzahl der Einzelversuche	
3.7. Statistische Auswertung	
4. Ergebnisse	
4.1. Signifikanter Überlebensvorteil durch die Applikation von FX06	
4.2. Keine signifikanten Unterschiede in Zytokin- und Chemokinkonze	ntrationen
zwischen den Versuchsgruppen	
4.2.1. Zytokinspiegel in der Leber	
4.2.2. Zytokinspiegel in der Lunge	

4.2.3. Zytokinspiegel in der Milz	.46
4.2.4. Zytokinspiegel in der Niere	.48
4.2.5. Zytokinspiegel im Serum	. 50
4.2.6. Nachweis von Zytokinen in Organen und Serum mittels ELISA	. 52
4.3. Bakterienbesiedlung in den Versuchsgruppen ohne Unterschiede	. 54
4.4. Bestimmung von Leber- und Nierenwerten	56
4.5. Signifikant erhöhte pulmonale Gefäßpermeabilität in der Kontrollgruppe	. 58
5. Diskussion	. 60
5.1. Allgemein	. 60
5.2. Auswahl der Methodik	61
5.3. Das Fibrinspaltprodukt Peptid Bβ15-42	62
5.4. Messung der Gefäßpermeabilität	64
5.5. Bakteriologie	. 66
5.6. Beeinflussung des Zytokinprofils in der Sepsis durch FX06	.66
5.7. Organtoxizität von FX06	. 68
5.8. Klinische Bedeutung	. 69
5.9. Kritik und Einschränkungen	.71
6. Zusammenfassung	.72
7. Literaturverzeichnis	.74

Eidesstaatliche Erklärung

Danksagung

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1.:	Biphasischer Verlauf der Sepsis
Abb. 1.2.:	Struktur Fibrinogen
Abb. 2.1.:	Versuchsablauf Überlebenskinetik
Abb. 2.2.:	Versuchsablauf Organ- und Blutentnahme
Abb. 3:	Überleben nach CASP 18G
Abb. 4:	TNF- α -Konzentration in der Leber 20h nach CASP 18G
Abb. 5:	INF- γ -Konzentration in der Leber 20h nach CASP 18G
Abb. 6:	MCP-1-Konzentration in der Leber 20h nach CASP 18G
Abb. 7:	IL-10-Konzentration in der Leber 20h nach CASP 18G
Abb. 8:	IL-6-Konzentration in der Leber 20h nach CASP 18G
Abb. 9:	IL-12-Konzentration in der Leber 20h nach CASP 18G
Abb. 10:	TNF- α -Konzentration in der Lunge 20h nach CASP 18G
Abb. 11:	INF- ₇ -Konzentration in der Lunge 20h nach CASP 18G
Abb. 12:	MCP-1-Konzentration in der Lunge 20h nach CASP 18G
Abb. 13:	IL-10-Konzentration in der Lunge 20h nach CASP 18G
Abb. 14:	IL-6-Konzentration in der Lunge 20h nach CASP 18G
Abb. 15:	TNF- α -Konzentration in der Milz 20h nach CASP 18G
Abb. 16:	INF- ₇ -Konzentration in der Milz 20h nach CASP 18G
Abb. 17:	MCP-1-Konzentration in der Milz 20h nach CASP 18G
Abb. 18:	IL-10-Konzentration in der Milz 20h nach CASP 18G
Abb. 19:	IL-6-Konzentration in der Milz 20h nach CASP 18G
Abb. 20:	IL-12-Konzentration in der Milz 20h nach CASP 18G
Abb. 21:	TNF- α -Konzentration in der Niere 20h nach CASP 18G
Abb. 22:	INF- ₇ -Konzentration in der Niere 20h nach CASP 18G
Abb. 23:	MCP-1-Konzentration in der Niere 20h nach CASP 18G
Abb. 24:	IL-10-Konzentration in der Niere 20h nach CASP 18G
Abb. 25:	IL-6-Konzentration in der Niere 20h nach CASP 18G

Abb. 26:	IL-12-Konzentration in der Niere 20h nach CASP 18G
Abb. 27:	TNF- α -Konzentration im Serum 20h nach CASP 18G
Abb. 28:	INF-y-Konzentration im Serum 20h nach CASP 18G
Abb. 29:	MCP-1-Konzentration im Serum 20h nach CASP 18G
Abb. 30:	IL-10-Konzentration im Serum 20h nach CASP 18G
Abb. 31:	IL-6-Konzentration im Serum 20h nach CASP 18G
Abb. 32:	IL-12-Konzentration im Serum 20h nach CASP 18G
Abb. 33:	IL-1 β -Konzentration in der Leber 20h nach CASP
Abb. 34:	IL-1 β -Konzentration in der Lunge 20h nach CASP
Abb. 35:	IL-1 β -Konzentration in der Milz 20h nach CASP
Abb. 36:	IL-1 β -Konzentration in der Niere 20h nach CASP
Abb. 37:	IL-1 β -Konzentration im Serum 20h nach CASP
Abb. 38:	Bakteriologie in der Niere 20h nach CASP
Abb. 39:	Bakteriologie in der Milz 20h nach CASP
Abb. 40:	Bakteriologie in der Lunge 20h nach CASP
Abb. 41:	Bakteriologie im Vollblut 20h nach CASP
Abb. 42:	Bakteriologie in der Leber 20h nach CASP
Abb. 43:	Bakteriologie Peritoneallavage 20h nach CASP
Abb. 44:	ASAT-Konzentration im Serum
Abb. 45:	ALAT-Konzentration im Serum
Abb. 46:	Kreatinin-Konzentration im Serum
Abb. 47:	S-100-Konzentration
Abb. 48:	Evans Blue pro Lungengewicht

- Abb. 49: Evans Blue pro Lebergewicht
- Abb. 50: Evans Blue pro Milzgewicht

Tabellenverzeichnis

 Tab. 1:
 Sepsisdefinition entsprechend der Konsensuskonferenz 2001

Tab. 2:Sepsisdefinition und Schweregrad entsprechend der S-2-Leitlinie der
Deutschen Sepsis-Gesellschaft und der Deutschen Interdisziplinären
Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin 2005

Abkürzungsverzeichnis:

ARDS	Acute respiratory distress syndrome			
ALAT	Alaninaminotransferase			
ASAT	Aspartataminotransferase			
BZ	Blutzuckerwert			
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate			
CARS	Compensatory anti-inflammatory response syndrome			
CASP	Colon ascendens Stent Peritonitis			
CBA	Cytometric Bead Array			
CLP	Cecal Ligation and Puncture			
DAMP	Danger associated molecular patterns			
DIC	Disseminated intravascular coagulation, Disseminierte intravasale Koagulopathie			
EDTA	Ethylendiamintetraacetat			
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay			
FACS	Fluorescence-activated cell sorting			
F_iO_2	Sauerstofffraktion			
FpA, FpB	Fibrinopeptid A, Fibrinopeptid B			
GALT	Gut-associated lymphoid tissue			
GTP	Guanosintriphosphat			
HLA	Human leukocyte antigen			

ICAM	Intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
INR	International Normalized Ratio
LPS	Lipopolysaccharid
MARS	Mixed antagonists response syndrome
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MHC	Major histocompatibility complex
MLCK	Myosin light-chain kinase, Myosin-Leichtketten-Kinase
MODS	Multi organ dysfunction syndrome
MOV	Multiorganversagen
NO	Stickstoffmonoxid
NSDKII	N-terminal disulfide knot II
p_aCO_2	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
p_aO_2	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PRR	Pattern recognition receptor
PTT	Partial Thromboplastin Time
rpm	Revolutions per minute
SEM	standard error of the mean
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Tumor necrosis factor- α , Tumornekrosefaktor- α
VCAM	Vascular cell adhesion protein

VE vascular endothelial

1. Einleitung

Die Sepsis ist eine gefürchtete Komplikation im Rahmen allgemeinviszeralchirurgischer Operationen und ist trotz des ständigen medizinischen Fortschrittes in Diagnostik und Therapie immer noch mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden. Neben dem akuten Myokardinfarkt und der koronaren Herzerkrankung ist die Sepsis die dritthäufigste Todesursache in Deutschland und die häufigste auf nicht kardiologischen Stationen [1-3]. Durch die Zunahme von Antibiotikaresistenzen und immunsuppressiver Verfahren, die Indikationsausweitung invasiver Methoden als auch die epidemiologische Entwicklung mit einer immer älter werdenden Bevölkerung ist die Sepsis mit einer steigenden Inzidenz assoziiert [4, 5].

Zweithäufigste Ursache für eine schwere Sepsis sind nach den Atemwegsinfektionen intraabdominelle Foki. Weiterhin können katheter- oder fremdköperassoziierte Infektionen, chirurgische Infektionen, die invasive Candidose bei Immunsupprimierten und die bakterielle Meningitis ursächlich sein.

In Deutschland liegt die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen für die Sepsis bei bis zu 79.000 (85-116/100.000 Einwohner) bzw. 75.000 (76-110/100.000 Einwohner) für die schwere Sepsis [2, 6]. Das Kompetenznetzwerk Sepsis (SepNet) ermittelte eine Prävalenz von 12,4% für die Sepsis sowie 11% für die schwere Sepsis und den septischen Schock auf deutschen Intensivstationen repräsentativ ausgewählter Krankenhäuser. Die Mortalität schwankt dabei je nach Studie und Schweregrad der Sepsis zwischen 20 bis 60% [4, 5, 7, 8]. In einer weltweit durchgeführten Studie konnte für Deutschland eine Mortalitätsrate von 39,2% auf Intensivstationen und von 49,6% für die Gesamtkrankenhausmortalität errechnet werden. Dies ist ungefähr deckungsgleich mit den Zahlen von Engel et al., der eine Krankenhausmortalität von 55% für die schwere Sepsis anführt. Neben der hohen Mortalität im akuten Erkrankungsfall ist die Einjahresprognose ebenfalls ernüchternd. So leben zum einen 12 Monate nach Erkrankungsbeginn weniger als die Hälfte der Patienten [9] und zum anderen haben die Patienten eine signifikant herabgesetzte Lebensqualität im Vergleich zur Normalbevölkerung [10, 11].

Die Kosten, die für die Behandlung des Krankheitsbildes Sepsis aufgewendet werden, sind enorm und verschlingen einen Großteil des Budgets für die gesamte Intensivmedizin. Insgesamt geht das Budget für die Gesamttherapie der Sepsis, angefangen vom intensivmedizinischen Aufenthalt bis hin zur Anschlussheilbehandlung in den Milliarden Euro-Bereich, je nach Gesundheitssystem und Berechnung der Prävalenz [2].

Die Grundpfeiler der Sepsistherapie basieren auf der Fokussanierung und der antimikrobiellen Therapie. Die antimikrobielle Therapie stößt jedoch immer mehr an ihre Grenzen durch die Zunahme von Antibiotikaresistenzen. Alle weiteren Therapieansätze können nicht mehr als kausal, sondern vielmehr als supportiv oder adjunktiv angesehen werden [12]. Als wichtigste supportive Maßnahmen zählen der Einsatz von kreislaufunterstützenden Medikamenten (Katecholaminen) und die Volumensubstitution mit dem Ziel einen ausreichend hohen mittleren arteriellen Druck aufrecht zu halten, damit das gefürchtete Multiorganversagen (MOV) verhindert werden kann. Ursächlich für das Entstehen der Organdysfunktion ist die Beeinträchtigung der Mikrozirkulation durch einen Zusammenbruch der Endothelbarriere. Die genauen pathophysiologischen Mechanismen sind bis heute noch weitgehend ungeklärt. Ein möglicher Mechanismus könnte jedoch die Endothel-Leukozyten-Interaktion darstellen.

Auf Grundlage dieser klinischen Problematik und der bisherigen wissenschaftlichen Beobachtungen untersucht die nachfolgende Arbeit, die Endothel-Leukozyten-Interaktion mittels FX06 zu modifizieren und somit ein mögliches neues Target in der Behandlung der Sepsis aufzuzeigen.

2. Grundlagen

2.1. Definition und Einteilung der Sepsis

Der Begriff der Sepsis fand schon im Zeitalter von Hippokrates Erwähnung, wurde jedoch erst durch den Arzt Hugo Schottmüller im Jahre 1914 näher definiert: "Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden." [13]

Heutzutage wird die mikrobielle Sepsis unter Berücksichtigung des aktuellen Wissenstandes wie folgt definiert: "Die Sepsis wird ausgelöst durch pathogene Mikroorganismen und deren Produkte und führt zu einer endogenen Bildung und Ausschüttung von humoralen und zellulären Mediatoren. In Abgrenzung zu einer Infektion ist sie dadurch gekennzeichnet, dass es dem Wirt nicht gelingt, die inflammatorische Reaktion lokal zu begrenzen." [2]

Im Laufe der Zeit erkannte man, dass auch nicht infektiöse Stimuli wie etwa Verbrennungen, die nicht infektiöse Pankreatitis, Traumata, Ischämien, Intoxikationen und Vaskulitiden ein septisches Krankheitsbild auslösen können. Aus diesem Grund erfolgte im Jahre 1991 im Rahmen des Consensus Conference des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine folgende Einteilung und Definition der Sepsis [14, 15]:

Eine systemische inflammatorische Reaktion (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) ist gekennzeichnet durch das Vorliegen von mindestens zwei der nachfolgenden Kriterien:

- Körpertemperatur: >38°C oder <36°C
- Herzfrequenz: >90/min
- Atemfrequenz: >20/min oder p_aCO_2 <32mmHg (<4,3kPa)

• Leukozyten:

>12.000 Zellen/µl oder <4.000 Zellen/µl oder ≥10%

unreife Neutrophile

Als Sepsis ist eine systemische inflammatorische Reaktion definiert, die durch einen infektiösen Fokus verursacht wird.

Die schwere Sepsis geht einher mit Hypoperfusion, Hypotonie oder Organdysfunktion, was sich als Laktatazidose, Oligurie oder akute Änderung der Bewusstseinslage äußern kann. Als sepsisinduzierte Hypotonie wird ein systolischer Blutdruck von <90mmHg oder ein Abfall des systolischen Blutdruckes von ≥40mmHg vom Ausgangswert bezeichnet. Besteht die Hypotension mit Hypoperfusion und Organdysfunktion trotz adäquater Volumensubstitution weiter, so spricht man vom septischen Schock.

Ein weiterer oft benutzter Begriff ist das "Multiorganversagen", was das gleichzeitige oder in rascher zeitlicher Abfolge auftretende Versagen von mindestens zwei Organsystemen beinhaltet. Vorbestehend ist in diesem Falle zumeist schon ein Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS).

Tab. 1: Sepsisdefinition entsprechend der Konsensuskonferenz 2001*

I. Nachweis einer Infektion oder Verdacht auf eine Infektion + einige der folgenden Kriterien:

Allgemeine Parameter

- Fieber (>38,3°C) oder Hypothermie (<36°C)
- Tachykardie (90/min oder >2-fache der Standardabweichung vom Normalwert
- Tachypnoe (>30/min)
- Eingeschränkter neurologischer Status
- Ödeme oder positive Flüssigkeitsbilanz (>20ml/kg/24h)
- Hyperglykämie (BZ >120mg/dl oder 7,7mM/l)

Inflammatorische Parameter

- Leukozytose (>12.000/µl) oder Leukopenie (<4000/µl) oder Normwert mit
 >10% unreifen Formen
- C-reaktives Protein (>2fache Standardabweichung über Normwert)
- Prokalzitonin (>2fache Standardabweichnung über Normwert)

Hämodynamische Parameter

- Hypotonie (systol. Blutdruck <90mmHg, mittlerer arterieller Blutdruck
 <40mmHg oder Abfall <2fach Standardabweichung unter Normwert)
- Gemischtvenöse Sättigung <70%
- Herzindex <3,5l/min/m²

Organdysfunktion

- Arterielle Hypoxämie (p_aO₂/F_iO₂ <300)
- Akute Oligurie (<0,5ml/kg/h oder 45mmol/l für ≥2h)
- Gerinnungsstörung (INR >1,5 oder PTT >60s)
- Hyperbilirubinämie (Bilirubin >4mg/dl oder >70mmol/l)
- Ileus (Fehlen von Darmgeräuschen)
- Kreatininanstieg um ≥0,5mg/dl
- Thrombozytopenie (<100.000/µl)

Gestörte Gewebeperfusion

- Erhöhtes Laktat (1mmol/l)
- Reduzierte kapilläre Füllung oder Marmorierung

* [1, 2]

Tab. 2: Sepsisdefinition und Schweregrad entsprechend der S-2-Leitlinie der Deutschen Sepsis-Gesellschaft und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin 2005*

I. Nachweis einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien

- II. Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS, mindestens 2 Kriterien)
 - Fieber (>38,3°C) oder Hypothermie (<36°C)
 - Tachykardie ≥90/min
 - Tachypnoe (≥30/min) oder Hyperventilation (paCO2≤4,3kPa bzw.
 ≤33mmHg)
 - Leukozytose (≥12.000/mm3) oder Leukopenie (≤4000/mm3) oder ≥10%
 unreife Neutrophile im Differenzialblutbild
- III. Akute Organdysfunktion (mindestens 1 Kriterium)
 - Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium
 - Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten >30%
 innerhalb von 24h oder Thrombozytenzahl ≤100.000mm³
 - Arterielle Hypoxämie: p_aO₂ ≤10kPa (≤75mmHg) unter Raumluft oder p_aO₂(F_iO₂-Verhältnis ≤33kPa (≤250mmHg) unter Sauerstoffapplikation
 - Renale Dysfunktion: Diurese ≤0,5ml/kg/h f
 ür wenigstens 2h trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder Serumkreatininanstieg >2fach oberhalb des üblichen Referenzbereichs
 - Metabolische Azidose: Base Excess ≤-5mmol/l oder Laktatkonzentration
 >1,5-fach oberhalb des üblichen Referenzbereichs

Einteilung der Schweregrade:

Sepsis: Vorliegen der Kriterien I und II

Schwere Sepsis: Vorleigen der Kriterien I, II und III

Septischer Schock: Vorliegen der Kriterien I und II sowie für wenigstens 1h ein systolischer arterieller Blutdruck ≤90mmHg bzw. ein arterieller Mitteldruck ≤65mmHg oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck ≥90mmHg oder den arteriellen Mitteldruck ≥65mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.

* [2, 12]

2.2. Immunsystem

2.2.1. Grundlagen des Immunsystems

Myriaden von potentiellen Krankheitserregern stehen dem menschlichen Organismus jederzeit gegenüber und versuchen die verschiedenen Abwehrbarrieren und – systeme zu überwinden.

Grob orientierend verfügt der menschliche Organismus über zwei unterschiedliche Systeme zur Abwehr dieser Krankheitserreger: das angeborene und das erworbene Immunsystem. Beide Systeme sind eng miteinander vernetzt und beeinflussen sich gegenseitig. In den allermeisten Fällen, ca. zu 99%, werden mögliche Infektionen durch das angeborene Immunsystem beherrscht [16]. In vorderster Front stehen dabei die natürlichen Barrieren wie Haut als auch Schleimhäute. Diese Barrieren bilden zum einen über Zell-Zell-Kontakte (z.B. Tight junctions) eine mechanische Grenze und zum anderen schaffen sie ein antimikrobielles Milieu durch die Sekretion von Mukus, verschiedensten Enzymen und Peptiden [17, 18]. Überwinden pathogene Strukturen die natürlichen Barrieren stehen dem angeborenen Immunsystem nun humorale, als auch zelluläre Abwehrmechanismen zur Verfügung.

Zu den humoralen Faktoren gehören neben unspezifischen antibakteriellen und antiviralen Stoffen, wie zum Beispiel das hepatisch generierte C-reaktive Protein oder das Enzym Lysozym, vor allem das Komplementsystem, das über verschiedene Wege kaskadenartig aktiviert werden kann. Es führt zur Zelllyse bzw. zur Verbesserung der Phagozytose durch Opsonierung [19-26].

Zu den zellulären Komponenten gehören Makrophagen/Monozyten, dendritische Zellen und polymorphkernige Leukozyten (Granulozyten). Diese Zellen werden auch als professionelle "Fresszellen", Phagozyten, bezeichnet. Darüber hinaus spielen Endothel- und Kupferzellen als nicht professionelle Phagozyten eine wichtige Rolle. Die Zellen des angeborenen Immunsystems werden durch "Danger associated molecular patterns" (DAMPs) aktiviert. Unter DAMPs werden spezifische Strukturproteine von bakteriellen Pathogenen ("pathogen associated molecular patterns", PAMPs) und Alarmine, die aus affektiertem oder aus geschädigtem Gewebe freigesetzt werden, subsumiert [27-30]. Die Erkennung von DAMPs und die

damit verbundene Auslösung einer inflammatorischen Reaktion durch Phagozytose der pathogenen Strukturen sowie Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen werden durch "Pattern recognition receptors" (PRR) gewährleistet [19]. Einer der bekanntesten Vertreter in der Gruppe der PRRs ist der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4), der nach Bindung von Lipopolysaccharid, ein PAMP von gramnegativen Bakterien, eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert mit dem Ergebnis einer gesteigerten Transkription von proinflammatorischen und regulatorischen Genen [19, 27, 31-34].

Ziel der Phagozytose der pathogenen Antigene mit nachfolgender Zelllyse und Prozessierung [31, 35, 36] sowie der Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen ist die Rekrutierung weiterer Abwehrzellen und die Unterbindung einer weiteren Erregerausbreitung.

Die professionellen Phagozyten als antigenpräsentierende Zellen verstehen sich als das Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem (erworbenem) Immunsystem [37]. Proteinfragmente (Epitope) der prozessierten pathogenen Antigene werden über spezielle Moleküle (HLA-Komplex) den naiven T-Zellen des erworbenen Immunsystems präsentiert. Neben dem MHC/Epitop-Komplex werden noch weitere kostimulatorische Moleküle auf der Zelloberfläche vermehrt exprimiert, um eine adäquate Zell-Zellinteraktion zu gewährleisten [18, 38, 39].

In Abhängigkeit der Präsentation des Epitops über die HLA-Moleküle und der begleitenden Zytokinausschüttung entwickeln sich verschiedene T-Helfer-Subpopulationen [40, 41]. Neben den T-Zellen gehören auch noch die B-Zellen zum adaptiven Immunsystem. Durch die Interaktion von T- und B-Zellen kommt es zur Ausbildung einer "immunologischen Synapse" [42] mit dem Ergebnis der Antikörpersynthese und B-Zellproliferation [18, 43-45]. Die Fähigkeiten dieser Antikörper sind vielfältig und können von neutralisierend, opsonierend als auch agglutinierend bis hin zur Verbesserung der Phagozytose und Zytotoxizität reichen [18].

2.2.2. Homöostase des Immunsystems

Das Immunsystem in seiner ganzen Komplexität ist für das Überleben des menschlichen Organismus unabdingbar. Ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Prozessen führt zur Entstehung krankhafter Prozesse. Eine

überschießende Immunreaktion im Sinne einer Hyperinflammation ohne Gegenregulation findet sich zum Beispiel bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und bei Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises aber auch beim Diabetes mellitus Typ I. Eine Immunsuppression kann wiederum zu malignen Prozessen und zu einer gesteigerten Infektionsanfälligkeit führen. Es lässt sich also leicht ableiten, dass die Feinregulation immunologischer Prozesse für die Homöostase des menschlichen Mechanismus von ganz entscheidender Bedeutung ist. Beim SIRS bzw. bei der Sepsis kommt es zu einer Dissoziation der physiologischen Antwort auf einen pathogenen Stimulus mit der Folge der Entkoppelung der Abwehrreaktion von der eigentlichen Krankheitsursache. Die immunologische Antwort steht in keiner Relation mehr zum ursprünglichen Stimulus und kann schlussendlich einen letalen Ausgang nehmen.

2.3. Pathophysiologie der Sepsis

Lange Zeit wurde die Sepsis mit ihren Folgeerscheinungen fast ausschließlich als eine überschießende proinflammatorische Aktivierung des Immunsystems mit kaskadenartiger Amplifikation als Antwort auf einen infektiösen Stimulus oder eine schwerwiegende Gewebeschädigung angesehen [28]. Die körpereigene Reaktion wurde somit als eine unkontrollierte Hyperinflammation bezeichnet [46]. Die Antiinflammation als physiologischer Gegenspieler wurde lange Zeit gar nicht oder nur tangentiell beachtet.

Gegenwärtig ist man von diesem Konzept durch neuere Erkenntnisse abgerückt und geht von einem biphasischen Verlauf der Immunreaktion in der Sepsis aus. Der initialen proinflammatorischen Reaktion (SIRS) folgt eine antiinflammatorische Phase als Kompensation ("Compensatory anti-inflammatory response syndrome", CARS) [36, 47, 48]. Dabei können jedoch auch beide Phasen deckungsgleich verlaufen, so dass ein "Mixed antagonists response syndrome" (MARS) vorliegt [49, 50] (siehe Abb.1.1.).

Ein lokal begrenzter Insult unterschiedlichster Genese führt zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems mit Brückenschlag zum erworbenen Immunsystem. Ab einem bestimmten Schweregrad bleibt die physiologische Inflammation zur Abwehr pathogener Strukturen nicht mehr lokalisiert, sondern es kommt zu einer Aggravierung der Geschehnisse mit konsekutiver systemischer Ausbreitung von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- α , IL-1, IL-6) und Chemokinen (z.B. MCP-1) [17, 51].



Abb. 1.1.: Biphasischer Verlauf der Sepsis, modifiziert nach [93]; SIRS: Systemic inflammatory response syndrome; CARS: Compensatory anti-inflammatory response syndrome; MARS: Mixed antagonists response syndrome

Dadurch kommt es zur weiteren Rekrutierung immunkompetenter Zellen, zur Aktivierung von Endothelzellen mit Hochregulierung von endothelialen und zellulären Adhäsionsmolekülen um die Diapedese und die schon aktivierten Entzündungszellen noch besser zum Ort des Geschehens zu rekrutieren [32, 35, 51-54]. Darüber hinaus wird die Gerinnungskaskade aktiviert und die Produktion von Proteasen und Sauerstoffradikalen gesteigert. Parallel dazu werden Akute-Phase-Proteine, Cortisol und Katecholamine, als auch antiinflammatorische Zytokine (z.B. IL-10, IL-12) freigesetzt [27, 49, 50, 52, 53, 55-61].

Die Apoptose von Lymphozyten und dendritischen Zellen führt zu einer immunologischen Anergie und somit zu einer erhöhten Suszeptibilität für nosokomiale Infektionen [28, 62-68]. Die unverminderte oder gar herabgesetzte Apoptoserate von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten bei gleichzeitig überschießender Produktion von Proteasen und Sauerstoffradikalen resultiert in einer Aggravierung der Organschäden.

Die freigesetzten proinflammatorischen Zytokine führen darüber hinaus zu einer Endotheldysfunktion mit erhöhter Expression von Adhäsionsmolekülen und Stickstoffmonoxid (NO), sowie im weiteren Verlauf zu einer Apoptoseinduktion. Des weiteren kommt es zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems mit Störung der Homöostase zu Gunsten der prokoagulatorischen Faktoren durch die vermehrte Expression von Tissue Factor und die Herunterregulation von antithrombotischen Faktoren [69-71]. Das Ergebnis ist eine endotheliale Permeabilitätssteigerung mit Austritt von intravasaler Flüssigkeit in den Extrazellularraum und konsekutiv eine systemische Hypotension mit unzureichender Organperfusion. Die Aktivierung des Gerinnungssystems führt im schlimmsten Fall zur disseminierten intravasalen Gerinnungsstörung (DIC), bei der Thrombusbildung und Blutung durch den Verbrauch von Gerinnungsfaktoren gleichzeitig vorliegen [52, 55, 69].

Auf der Endstrecke der Sepsis kommt es zu einem Multiorganversagen (MODS). Bedingt ist dieses klinische Bild zum einen durch die verminderte Sauerstoffversorgung der Organe durch Mikrothromben und hypotensionsbedingte Minderperfusion und zum anderen durch eine mitochondriale Dysfunktion, die durch die in der Sepsis vermehrt gebildeten Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxidmoleküle verursacht wird [72, 73].

Das kardiovaskuläre System wird kompromittiert durch die Stickstoffmonoxid (NO) vermittelte Hypotension mit Störung von Vor- und Nachlast sowie allgemeiner myocardialer Dysfunktion [55]. Der renale Funktionsverlust reicht bis zum akuten anurischen Nierenversagen und ist begründet durch Hypoperfusion, Zellapoptose und zytotoxische Effekte [52, 55]. Das pulmonale Versagen äußert sich in einer Globalinsuffizienz mit Hypoxämie und Hyperkapnie bis hin zum ARDS durch die gesteigerte Gefäßpermeabilität mit konsekutiver Ödembildung [74].

2.4. Besonderheiten der abdominellen Sepsis

Das Intestinum fand lange Zeit in der Pathogenese der Sepsis und des Multiorganversagens keine wirkliche Berücksichtigung. Heute weiß man, dass der

Darm nicht ein "stiller Teilhaber", sondern vielmehr einen "Motor" in der Entstehung der Sepsis darstellen kann [75, 76].

Erstmals berichteten Wolochow et al. im Jahre 1966 von der "bakteriellen Translokation" [77]. Dieser Begriff charakterisierte den Übertritt von eigentlich intraluminal lokalisierten Bakterien über die intestinale Barriere in die Peritonealhöhle. In den Folgejahren wurde durch verschiedene Arbeiten gezeigt. dass es bei kritisch kranken Patienten zu einer Schrankenstörung der epithelialen Barriere kommt und somit eine Translokation von Bakterien und Endotoxinen möglich ist. Im Ergebnis kommt es zu einer systemischen Inflammation und zum Multiorganversagen [78-81].

2.4.1. Pathophysiologie der abdominellen Sepsis

Die Pathogenese und die einzelnen funktionellen Mechanismen die zur epithelialen Schrankenstörung führen, liegen bis heute noch weitgehend im Verborgenen. Bekannt ist, dass es durch Zytokine, wie z.B. TNF- α , zu einer Desintegration von Junktionsproteinen zwischen den einzelnen Enterozyten kommt [20]. Darüber hinaus spielen neben der rein mechanischen Betrachtung der Darmbarriere wohl aber auch noch weitere Faktoren eine entscheidende Rolle bei der bakteriellen Translokation. Die Anwendungen von Breitspektrum-Antibiotika verursachen eine Alteration der physiologischen Darmflora, was ein Ungleichgewicht und somit einen Verlust der mikrobiellen Resistenz bedingt [82]. Ein weiterer Schutzmechanismus ist die lokale wirtseigene Abwehrfunktion des Darmepithels durch die Sekretion von Mukus und Immunglobulin A. Auch hier führen Alterationen zu einem Ungleichgewicht der bakteriellen Besiedlung mit Übergewicht gram-negativer Bakterien [83]. Die "finale Verteidigungslinie" ist die "Darm-Leber-Achse". Es wird vermutet, dass es auch unter physiologischen Zuständen zu einem geringen Übertritt von Endotoxinen in das portalvenöse Blut kommt. Diese PAMPs sind im physiologischen Maße wichtig für die Stimulation des retikuloendothelialen Systems der Leber. Allen voran die leberständigen Makrophagen (Kupfer-Sternzellen) sind ein Hauptfaktor in der Elimination von PAMPs aus dem Pfortaderkreislauf [76, 84, 85].

Der Stellenwert der bakteriellen Translokation ist nicht eindeutig geklärt. Der wichtigste pathophysiologische Effekt scheint eine im Rahmen der Sepsis

durch erhöhten Sauerstoffbedarf entstehende relative Hypoperfusion mit konsekutivem Schleimhautödem und Epithelnekrosen zu sein. Dadurch kommt es im Folgenden zu einer massiven Zytokinproduktion und zur Aktivierung von im Darm assoziiertem lymphatischen Gewebe (GALT) beheimateten neutrophilen Granulozyten [86-89]. Die freigesetzten Zytokine erreichen die systemische Makrozirkulation über den Ductus thoracicus in enger Nachbarschaft zur pulmonalen Mikrozirkulation. So konnten verschiedene Arbeiten zeigen, dass es durch im Darm generierte und über den lymphatischen Weg transportierte Zytokine zum Lungenversagen kommt [90-92].

Neben den hier geschilderten zellbiologischen Besonderheiten des Organsystems Darm gibt es noch weitere anatomische und pathophysiologische Punkte zu bedenken. Die Bauchhöhle wird durch das parietale und viszerale Peritoneum (Bauchfell) ausgekleidet und unterteilt die Bauchhöhle in mehr oder weniger kommunizierende Räume durch die Anheftungsstellen am Mesenterium und durch die Verwachsungen mit den sekundär retroperitoneal gelegenen Organen. Zusätzlich findet das angeborene Immunsystem seine intraabdominelle Erweiterung im Omentum majus, das bis zu einem bestimmten Grad intraabdominelle Entzündungsfoci abgrenzen und somit eine weitere systemische Ausbreitung verhindern kann [93].

2.4.2. Klassifizierung der abdominellen Sepsis

Die abdominelle Sepsis kann definiert werden als eine intraabdominelle Infektion mit extraperitonealer Begleitreaktion. Die intraabdominelle Infektion spiegelt sich dabei als Peritonitis wieder [93]. In Abhängigkeit von der Pathogenese unterscheidet man zwischen einer primären (nach hämato- oder lymphogener Streuung, z.B. spontan bakterielle Peritonitis), sekundären (bei Hohlorganperforation oder Abszessen, z.B. perforierte Sigmadivertikulitis) und tertiären Peritonitis (Persistenz der Infektion trotz Fokussanierung). Eine weitere Differenzierung der Peritonitis kann anhand der Qualität des intraabdominell vorherrschenden Sekrets erfolgen. Hier unterscheidet man gallige, fibrinöse, putride und kotige Peritonitiden. Das Behandlungsregime der abdominellen Sepsis beinhaltet die breite antibiotische Therapie, die Stabilisierung dysregulierter Organfunktionen und die Fokussanierung [94-96]. Das Repertoire der chirurgischen Fokussanierung kann dabei von der Übernähung, Débridement und Lavage bis zur Resektion reichen. Ein interventionelles Vorgehen ist jedoch je nach Befund auch denkbar (z.B. perkutane Drainageneinlage).

Pathophysiologisch bzw. infektionsimmunologisch ergeben sich bei bestimmten Formen der abdominellen Sepsis Besonderheiten. Der biphasische Verlauf der Sepsis bedingt im zweiten Teil ein Übergewicht antiinflammatorischer Zytokine, eine Reduktion monozytärer HLA-DR-Expression und eine Immunparalyse durch Apoptose peripherer immunkompetenter Zellen [97-101].

Durch elektive chirurgische Eingriffe kommt es in ähnlicher Art und Weise zu einer Immunparalyse [102-107]. Entwickeln Patienten in dieser Phase der Immunparalyse eine Peritonitis, ist dies automatisch mit einer erhöhten Letalität verbunden durch die Unfähigkeit eine adäquate Immunantwort zu generieren.

Das postoperative Auftreten abdomineller Peritonitiden mit konsekutiven septischen Komplikationen muss auf Grundlage der hier beschriebenen infektionsimmunologischen Besonderheit getrennt von anderen abdominellen Sepsisformen betrachtet werden. Maier et al. klassifizieren daher die abdominelle Sepsis bei sekundärer Peritonitis in eine Typ A- ("spontaneously acquired abdominal sepsis, SAAS") und Typ B-Sepsis ("postoperatively acquired abdominal sepsis, PAAS"). Der Typ B-Sepsis ist ein chirurgischer Eingriff vorausgegangen, so dass eine supprimierte Immunantwort vorliegt trotz eines "zweiten" infektiologischen Stimulus [93].

2.5. Sepsismodelle

Für das Erlangen bzw. die Erweiterung des grundlagenwissenschaftlichen Verständnisses über das Krankheitsbild der SIRS und Sepsis mit konsekutiver Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ist die Verwendung tierexperimenteller Modelle unabdingbar. Bei der Verwendung von Tiermodellen muss man berücksichtigen, dass die Sepsis ein komplexes und multifaktorielles Krankheitsbild darstellt und somit nicht immer in Gänze in einem Modell abgebildet werden kann. Zum anderen versucht man bei den Tiermodellen möglichst gleiche Bedingungen für die Versuchsreihen zu schaffen und bedient sich aus diesem Grunde bei gesunden

(Inzucht-)Tieren gleichen Alters und Geschlechts. Diese Bedingungen sind in der täglichen Praxis nur bedingt vorzufinden [108]. Des Weiteren ist der zeitliche Verlauf des Krankheitsverlaufes im Tiermodell begrenzt auf eine Zeitspanne von Stunden bis ein paar Tage. Im menschlichen Organismus kann der Zeitraum mehrere Tage bis Wochen bei maximaler intensivmedizinischer Therapie betragen.

Prinzipiell lassen sich 3 Grundmodelle in der Sepsisforschung unterscheiden:

- 1. Die Inokulation / Infusion lebender Bakterien,
- 2. Die intravenöse Infusion von Toxinen ("Endotoxin-Modell") oder
- 3. Die Induktion eines Infektfokus.

2.5.1. Inokulation von Bakterien

Die Inokulation von Bakterien in die Versuchstiere führt zu einer raschen und sehr ausgeprägten Instabilität der hämodynamischen Funktion mit Abnahme des kardialen Auswurfs. Das Modell spiegelt somit nur einen kleinen Teil der Pathogenese wieder und die Tiere versterben nach einer sehr kurzen Zeit. Darüber hinaus sind große unphysiologische Mengen des zu inokulierenden Bakteriums notwendig um die angeborene Immunantwort zu durchbrechen. Charakteristisch sind bei diesem Modell die sehr hohen proinflammatorischen Zytokinspiegel. Insgesamt hat dieses tierexperimentelle Sepsismodell große Limitationen, da der klinische Sepsisverlauf mit der komplexen wirtseigenen Immunantwort nicht wiedergegeben werden kann [108-110].

2.5.2. Endotoxin-Modell

Bei diesem Modell werden mikrobielle Toxine oder andere TLR-Agonisten intravenös injiziert. Am häufigsten wird hierbei LPS verwendet. Der große Vorteil dieses Modells ist die einfache Handhabung und Reproduzierbarkeit. Nachteilig ist, dass das Toxin nur über einen bestimmten Zeitraum appliziert wird und somit das Kriterium der kontinuierlichen Erregerfreisetzung aus einem Fokus nicht erfüllt werden kann. Zum anderen sind auch bei diesem Modell die Zytokinspiegel weitaus höher als in der klinischen Praxis. Das Endotoxin-Modell ist sicherlich eine gute Weiterentwicklung gegenüber dem erstgenannten Modell der Bakterieninokulation, spiegelt jedoch auch nicht die Komplexität des septischen Krankheitsverlaufes wider [108-110].

2.5.3. Induktion eines lokalen Infektfokus

Der augenscheinlichste Nachteil der oben genannten Modelle ist das Fehlen eines Infektfokus mit der permanenten Freisetzung von pathogenen Strukturen. Daraus resultierend ist die Imitation des klinischen Sepsisverlaufes bestehend aus hyperund hypodynamer Phase schwer zu realisieren. Aus diesem Grund wurden Modelle mit Induktion eines septischen Fokus entwickelt. Führend sind dabei die Induktion einer Pneumonie oder einer Peritonitis [110]. Nachfolgend soll das Hauptaugenmerk auf die Peritonitismodelle gelegt werden.

2.5.3.1. Cecal Ligation and Puncture

Bei dem Modell "Cecal Ligation and Puncture" (CLP) wird das Zökum aboral der Ileozökalklappe ligiert und mit einer definierten Kanüle punktiert. Dadurch kann sich stuhliges und somit bakterienbelastetes Sekret in die Bauchhöhle entleeren und schlussendlich eine Infektion induzieren. Vorteil dieses Modells ist die relativ einfache Handhabung und das gemischte bakterielle Erregerspektrum. Nachteilig ist eine interindividuelle Variabilität im Krankheitsverlauf und eine eingeschränkte Reproduzierbarkeit durch eine interindividuell unterschiedlich hohe Bakterienlast. Zum anderen wird die CLP immer mehr als ein abdominelles Abszeß- und nicht als Peritonitismodell betrachtet [111, 112].

2.5.3.2. Colon ascendens Stent Peritonitis

Das Modell der "Colon ascendens Stent Peritonitis" (CASP) führt durch die Implantation eines definierten Stents in das Colon ascendens zu einem Übertritt von Faeces in die Bauchhöhle. Das gemischte bakterielle Erregerspektrum führt über eine stuhlige Peritonitis zu einer systemischen Reaktion. Die CASP kommt somit dem Verlauf einer Sepsis auf Grundlage eines abdominellen Fokus am nächsten. Die CASP führt zu einer Bakteriämie mit konsekutiven Multiorganversagen. Der Sepsisschweregrad kann durch die Wahl des Stentdurchmessers modifiziert werden. Wie bei der CLP bestehen aber auch hier die Nachteile einer interindividuellen Variabilität und eingeschränkten Reproduzierbarkeit [112].

2.6. Leukozyten-Endothel-Interaktion

Die Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten in das Gewebe ist ein zentraler Schritt in der Pathophysiologie septischer Prozesse. Durch die Ausschüttung von Chemokinen und proinflammatorischen Zytokinen werden Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten angelockt und entlang eines Konzentrationsgefälles zum Inflammationsherd dirigiert. Dabei kommt es durch die konsekutive Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen sowie durch die Chemokine zu einer Aktivierung der Leukozyten. Insgesamt resultiert Zunahme Leukozyten-Endothel-Interaktion. Der eine der Prozess der Leukozytendiapedese in das geschädigte Gewebe ist ein feinregulierter Prozess. insuffiziente Diapedese kann eine Immunschwäche bedingen. Eine Eine überschießende Leukozytenrekrutierung kann dagegen in einer autodestruktiven Schädigung münden und somit einen Circulus vitiosus in Gang setzen durch die Entstehung neuer DAMPs.

2.6.1. Leukozyten-Transmigration

Der Vorgang der Leukoztenrekrutierung bzw. -diapedese spielt sich hauptsächlich an den postkapillären Venulen ab und wird im klassischen Sinne in verschiedene Schritte unterteilt: "Tethering" ("Anbindung"), "Rolling" ("Rollen"), "Adhesion" ("Adhäsion"), "Crawling" ("Schleichen") und schlussendlich "Transmigration" [113, 114]. Dabei kommt es hauptsächlich zu einer parazellulären Transmigration im Gegensatz zur ebenfalls bestehenden Möglichkeit der transzellulären Transmigration.

Voraussetzung für eine optimale Endothel-Leukozyten-Interaktion ist die Leukozytenmargination. Hierbei kommt es in den postkapillären Venulen zu einer Wanderung der Leukozyten aus der Strommitte in Richtung Endothel.

Bei Vorhandensein eines inflammatorischen Milieus mit den dazugehörigen Zytokinund Chemokinspiegeln kommt es nach der Leukozytenmargination zum "Tethering" und "Rolling". Verantwortlich hierfür sind Selektine (L-, P-, E-Selektine), die entweder schon auf zirkulierenden Monozyten, Granulozyten oder Lymphozyten exprimiert sind (L-Selektin), aus Weibel-Palade-Körperchen oder aus Thrombozyten freigesetzt werden (P [platelet]- Selektin) bzw. de novo im Endothel synthetisiert werden (E [endothelial]-Selektin) [115].

Durch das "Tethering" und "Rolling" können die Leukozyten nun durch die im Bereich des Endothels befindlichen Chemokine aktiviert werden. Hierdurch kommt es zu einer Konformationsänderung der auf der Zelloberfläche exprimierten Integrine (z.B. "Lymphocyte function-associated antigen (LFA-1, CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$) auf Lymphozyten, MAC-1 (CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$) und $\alpha_x\beta_2$ (CD11c/CD18) auf Granulozyten und Monozyten) mit dem Ergebnis einer Affinitätssteigerung mit anschließender Adhäsion der Leukozyten am Endothel ("Adhesion").

Durch die Interaktion von Integrinen und endothelialen Adhäsionsmolekülen (z.B. ICAM-1 und ICAM-2 (Intercellular adhesion molecule-1/2), VCAM-1 (Vascular cell adhesion protein 1) kommt es zu einer intrazellulären Signaltransduktion via GTPasen, was Veränderungen am Aktin-Zytoskelett bewirkt. Dies ist essentiell für die weitere Migration [115, 116].

Nach der Adhäsion schließt sich der eigentliche Migrationsvorgang in Richtung der größten Konzentration chemotaktischer Stoffe an. Die einzelnen Schritte der Diapedese sind bis heute in ihrer Komplexität noch nicht vollständig dargelegt. Bekannt dass ist. neben den Integrinen und den oben genannten Zelladhäsionsmolekülen noch ein großes Repertoire anderer Membranproteine von Nöten ist. Darüber hinaus kommt es bei der parazellulären Migration zu Veränderungen **Junktionsproteines VE-Cadherin** des mit konsekutiven Veränderungen des Zytoskeletts durch Aktivierung intrazellulärer GTPasen [117, 118]. Hierbei kommt es zu einer Schwächung der endothelialen Barriere durch die Phosphorylierung von VE-Cadherin und zu einer Kontraktion der endothelialen Zellen durch Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) [115, 116].

2.7. Fibrinogen und das Fibrin-Fragment Bβ15-42

Fibrinogen ist ein Protein der plasmatischen Gerinnungskaskade, das nach deren Aktivierung durch Thrombin in Fibrin gespalten wird. Primäre Aufgabe ist die

Ausbildung von Fibrinclots (Thrombus) im Falle einer vaskulär-endothelialen Schädigung um den Blutverlust möglichst gering zu halten. Darüber hinaus ist Fibrin(ogen) jedoch noch in vielen weiteren physiologischen als auch pathologischen Prozessen partizipiert. Hierzu gehören zum Beispiel die Angiogenese, inflammatorische Prozesse. Tumorwachstum oder die Wundheilung. Die Interaktionen verlaufen dabei über mehrere, zum Teil noch unbekannte Zellrezeptoren. Mögliche Interaktionspartner scheinen der leukozytäre Rezeptor MAC-1 und das endotheliale Adhäsionsmolekül ICAM-1 zu sein. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Fibrin mit VE-Cadherin interagiert und die Ausbildung von endothelialen Zellmembrankanälen unterstützt. [119, 120].

Fibrinogen ist ein Multiproteinkomplex, der aus zwei Sets von je drei Polypeptidketten besteht. Die Polypeptidketten A α , B β und γ sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden und bilden mit ihrem N-terminalen Ende (NH₂) die zentrale E-Domäne. Die C-terminalen Enden von B β und γ bilden die außen liegenden D-Domänen und sind über ein sogenanntes "coiled-coil" Segment mit der zentralen E-Domäne verbunden (siehe Abb. 1.2.).

Im Rahmen der aktivierten Gerinnungskaskade spaltet das aus Prothrombin entstandene Thrombin jeweils an den N-terminalen Enden der Aa- und Bβ-Polypeptidketten eine definierte Polypeptidsequenz ab. Durch die Abspaltung der hierbei entstandenen Fragmente, Fibrinopeptid A (FpA, Aa1-16) und Fibrinopeptid B (FpB, B\u00e31-15), ist nun durch die Exposition verschiedenster Bindungsstellen die Polymerisation von Fibrin möglich. Bei diesem Prozess wird u.a. auch die Bindungsstelle für VE-Cadherin im Bereich der Bß-Kette zwischen der 15. und 42. Aminosäure (BB15-42) "freigelegt" [119, 121, 122]. Durch die Exposition von BB15-42 ist eine Bindung an VE-Cadherin möglich. Dadurch kann eine Leukozytentransmigration stattfinden [123, 124].

Bei der Fibrinolyse spaltet Plasmin an verschiedensten Stellen Fragmente unterschiedlichster Länge ab. Es entstehen dabei u.a. X- und Y-Fragmente, D-Dimere, D- und E-Fragmente (FnE) sowie das Peptid Bβ15-42 (siehe Abb. 1.2.).

19



Abb. 1.2.: Struktur Fibrinogen, modifiziert nach [121]: Darstellung von Fibrinogen und Abspaltprozesse durch Thrombin und Plasmin; Erklärung siehe Text; FpA: Fibrinopeptid A; FpB: Fibrinopeptid B

2.7.1. Klinische Anwendung von Bβ15-42

Die Arbeitsgruppe um Petzelbauer et al. konnte im Jahre 2005 in einem myokardialen Ischämie-Reperfusion-Modell zeigen, dass ein synthetisch hergestelltes Bβ15-42 (FX06) die NSDKII vermittelte leukozytäre Transmigration durch eine kompetitive Bindung reduziert und somit den Reperfusionsschaden vermindert [125]. Der protektive Charakter von FX06 konnte zudem noch in zwei verschiedenen Schockmodellen bestätigt werden. Hierbei zeigten die mit FX06 behandelten Tiere sowohl im LPS-induzierten als auch im hämorrhagischen Schock ein verbessertes Outcome [126, 127].

2.8. Fragestellung

Die heutigen Grundpfeiler der Sepsistherapie sind die Fokussanierung und die antibiotische Therapie. Alle weiteren medikamentösen oder interventionellen Therapieansätze werden schon nicht mehr der kausalen, sondern der supportiven bzw. adjunktiven Therapie zugerechnet. Hierbei zeigte sich jedoch in der Vergangenheit, dass trotz des medizinischen Fortschrittes die Morbidität und Mortalität der Sepsis unverändert hoch sind.

Darüber hinaus stellten sich in vitro und im Tierexperiment vielversprechende immunmodulatorische Therapieansätze in der klinischen Anwendung als nicht geeignet dar. Mit dem "Medikament" FX06 konnte dagegen sowohl tierexperimentell als auch in einer Phase-II-Studie eine therapeutische Wirkung aufgezeigt werden.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung von FX06 in einem Modell der polymikrobiellen Sepsis zu evaluieren.

Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

- 1. Führt die Applikation von FX06 in der murinen polymikrobiellen Sepsis zu einem besseren Outcome?
- 2. Kommt es unter der Applikation von FX06 zu einer Stabilisierung der pulmonalen endothelialen Barriere?
- 3. Hat FX06 einen Einfluss auf die Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in der Sepsis?

Um diese Fragestellungen beantworten zu können, werden im Folgendem das CASP-Modell zur Induktion einer murinen polymikrobiellen Sepsis und die Evans-Blue Methodik zur Darstellung der endothelialen Schrankenstörung verwendet. Dabei gilt es die Hypothese einer möglichen verminderten Gefäßpermeabilität in der polymikrobiellen Sepsis mit konsekutiv verbessertem Outcome zu bestätigen bzw. zu widerlegen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborgeräte

Analysenwaage	Sartorius AG, Göttingen
Begasungsbrutschrank B 5060 EK/CO	Heraeus, Hanau
Digitalwaage BL 150 S	Sartorius AG, Göttingen
Durchflusszytometer FACScan	Becton Dickinson, San Jose, USA
Homogenisator Ultraturrax T25	Janke & Kunkel, Staufen im Breisgau
Kriechröhre	Eigenbau
pH - Meter inoLab	WtW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Spektrophotometer Ultrospec II	Biochrom AG, Berlin
Reagenzglasschüttler Vortex	Merck Eurolab N.V., Leuven, Belgien
Sterilwerkbank Microflow	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Sterilwerkbank Herasaf	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Medingen, Dresden
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
3.1.2. Chiruraisches Besteck	
Pinzette	Asanus, Neuhausen ob Eck
Nadelhalter, Mikronadelhalter	Asanus, Neuhausen ob Eck

Schere, Mikroschere

Asanus, Neuhausen ob Eck

3.1.3. Chirurgisches Nahtmaterial

	Frankreich	
Einmalskalpelle	Ansell Medical, Cergy Pontoise,	
Einmalkanülen Neoject [®] 20G, 26G, 30G	Dispomed, Gelnhausen	
Polyester weiß 4/0 USP	Catgut GmbH, Markneukirchen	
Mariderm schwarz 7/0 USP	Catgut GmbH, Markneukirchen	

3.1.4. Verbrauchsmaterialien EDTA-Röhrchen Becton Dickinson (BD), Heidelberg Einmalspritzen 1ml Dispomed, Gelnhausen Einmalspritzen Omnican[®] F 1ml Braun, Melsungen Einmalspritzen 5ml und 10ml Injekt Braun, Melsungen Halbmikroküvetten Brand, Wertheim Brand, Wertheim Hämatokritkapillaren Leukoplast BSN Medical GmbH, Hamburg Objektträger Superfrost[®] Plus Menzel Gläser, Braunschweig Petrischalen Greiner, Frickenhausen Pipettenspitzen Eppendorf, Hamburg Venenverweilkanüle 18G, 20G BD Venflon, Helsingborg, Schweden Wattestäbchen care&serve Reaktionsgefäße Eppendorf, Hamburg Röhrchen für FACS-Analyse Becton Dickinson, Heidelberg Zentrifugenröhrchen Spitzboden 50 ml BD, Franklin lake, USA Zentrifugenröhrchen Spitzboden 15 ml Sarstedt, Nümrecht

Zentrifugenröhrchen Rundboden 10 ml

Greiner Bio-One, Frickenhausen

3.1.5. Reagenzien und Chemikalien	
Aceton	Merck, Darmstadt
Avertin (2,2,2-Tribromethanol)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
CHAPS	VWR,Darmstadt
Complete	Roche Mannheim
EDTA	Merck, Darmstadt
Ethanol unvergällt	Carl Roth, Karlsruhe
Evans blue	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
FACS-Puffer	Becton Dickinson, Heidelberg
Formamide Isotonische Natriumchlorid-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen Delta Select, Pfullingen
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
PBS, steril	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Pefabloc	Roche, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
2-Methyl-2-butanol	Merck, Darmstadt

3.1.6. Kits

Die hier aufgeführten und verwendeten Kits waren gebrauchsfertig inklusive aller nötigen Reagenzien und Chemikalien.

Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kits		Firma BD Bioscie	ences
Mouse IL-1β ELISA		Firma MedSystems	Bender
3.1.7. Puffer und Lösungen Avertin-Stammlösung 1g:	1g 2,2,2 Tribromethanol + bei 50°C im Wasserbad lö	1 ml 2-Methyl-2-E osen	3utanol
Avertin-Gebrauchslösung 2,5%:	1ml der Stammlösung + 3	9 ml vorgewärmte	s PBS
Organ-Lysepuffer:	0,125 mg CHAPS 2 Tabletten Complete 14,61 mg EDTA 11,97 mg Pefabloc 8,71 mg PMSF 50 ml PBS		
3.1.8. Tiere			

C57BL/6-Mäuse Charles River Deutschland, Sulzfeld

3.2. Tierversuche

3.2.1. Genehmigung der Tierversuche

Die Tierversuche wurden vor deren Durchführung gemäß dem Tierschutzgesetz vom Landesveterinär- und Lebensmitteluntersuchungsamt Mecklenburg-Vorpommern unter dem Aktenzeichen 7221.3-1.1-026/08 genehmigt.

3.2.1. Tiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden ingezüchtete weibliche 20 bis 25 g schwere C57BI/6-Mäuse im Alter von 8-10 Wochen verwendet. Die Tiere wurden von der Firma Charles River Deutschland, Sulzfeld, bezogen. Die Tierhaltung erfolgte in Polycarbonatkäfigen Typ III auf Einstreu bei Pressfutter und Wasser ad libitum im Tierstall der Klinik und Poliklinik für Chirurgie, Abteilung für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie.

Zur Sicherstellung konstanter Versuchsbedingungen wurden die entsprechenden Versuchsgruppen mindestens eine Woche vor Beginn des Experiments unter gleichen Lebensbedingungen in einem Stall gehalten. Alle Versuche wurden unter Einhaltung der deutschen Tierschutzordnung durchgeführt.

3.2.2. Tiermodell: Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)

Die CASP ist ein geeignetes chirurgisches Modell zur Induktion einer murinen polymikrobiellen Peritonitis, die in ihrem weiteren Verlauf zu einer systemischen Inflammation führt. Mit dem CASP-Modell lässt sich die klinische Situation von Patienten mit Anastomoseninsuffizienz nach gastrointestinalen Eingriffen simulieren.

Durch die Implantation eines Stents in das Colon ascendens wird eine kontinuierliche Verbindung zwischen Darmlumen und Peritonealhöhle geschaffen, wodurch ein Austritt von Faeces und Darmbakterien ermöglicht wird. Die Wahl der Stentgröße beeinflusst dabei die Zahl der in die Peritonealhöhle übertretenden Bakterien und somit schließlich die Schwere der Infektion und die Letalität. In der vorliegenden Arbeit wurden alle Operationen mit einem Stent der Größe 18G durchgeführt.

3.2.2.1. Anästhesie

Die Tiere werden mit 0,25 ml einer intraperitoneal applizierten 2,5%igen Avertin-Lösung narkotisiert. Nach spätestens 5 Minuten sind die Tiere vollständig anästhesiert. Zur Überprüfung der ausreichenden Narkosetiefe wird ein Schmerzreiz an den Hinterläufen und am Schwanzende gesetzt. Bei nicht ausreichender Narkosetiefe werden gegebenenfalls 0,1 bis 0,2 ml Avertin-Lösung nachgespritzt. Anzumerken ist, dass zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung (Februar – Oktober
2008) Avertin für die Anästhesie von Kleintieren noch nicht verboten war. Es fand zu diesem Zweck häufig Anwendung.

3.2.2.2. Operation

3.2.2.2.1. Instrumentarium und Verbrauchsmaterialien

Es werden folgende Instrumente und Verbrauchsmaterialien verwendet:

- 1. Mikrochirurgisches Besteck mit Nadelhalter, Pinzette und Mikroschere
- 2. Nadelhalter
- 3. Schere
- 4. Pinzette
- 5. Wattestäbchen
- 6. Venenverweilkatheter 18G
- 7. 5/0 Ethilon Faden
- 8. 7/0 Ethilon Faden
- 9. Physiologische Kochsalzlösung
- 10. 1ml Injektionsspritze

3.2.2.2.2. Laparotomie

Vor Beginn der Operation wird ein 18G-Venenverweilkatheter mit Hilfe einer Schere etwa 3mm nach Beginn der Plastikummantelung zirkulär eingekerbt.

Nach der Hautdesinfektion mit 70%igem Ethanol wird die Hautschicht auf einer Länge von 15mm ausgehend von der Symphyse nach kranial mit einer Schere durchtrennt. Durch leichtes Anheben der Bauchmuskelfaszie mit einer anatomischen Pinzette demaskierte sich die Linea alba. Die Linea alba wird nun ebenfalls in Längsrichtung mit einer Schere inzidiert und somit die Peritonealhöhle eröffnet.

3.2.2.2.3. Implantation des Colonstents

Der Zökalpol wird mittels zwei Wattestäbchen aufgesucht und zusammen mit dem terminalem lleum und dem Colon ascendens aus der Peritonealhöhle vorsichtig herausluxiert. Als nächstes wird die Serosa des Colon ascendens 15 mm distal der Ileozäkalklappe streng antimesenterial mit Ethilon 7/0 tangential durchstochen. Oral dieser vorgelegten Einzelknopfnaht wird das Colon ascendens nun mit dem vorbereiteten Venenverweilkatheter punktiert. Dabei wird der Katheter soweit vorgeschoben bis die Einkerbung auf Höhe der Serosa ist. Zur Sicherung des Katheters werden die freien Enden des Fixierungsfadens um diesen geschlungen und ein chirurgischer Knoten in die Einkerbung gelegt. Anschließend wird der Katheter mit einem Stich durch die Darmwand auf der gegenüberliegenden Seite nochmals fixiert. Nach der abgeschlossenen Fixierung wird die Nadel des Venenverweilkatheters vorsichtig zurückgezogen stehenbleibende und der Plastikschlauch etwa 1mm über Serosaniveau abgeschnitten. Durch vorsichtigen Druck auf das Zökum mittels Wattestäbchen füllt sich der implantierte Stent mit Faeces. Die ausgelagerten Darmanteile werden jetzt wieder in die Peritonealhöhle zurückverlagert. Dabei ist darauf zu achten, dass die Stentöffnung dem Peritoneum anliegt. Vor dem Wundverschluss erfolgt eine Flüssigkeitssubstitution intraperitoneal mit 0,5ml physiologischer Kochsalzlösung.

3.2.2.2.4. Wundversorgung

Der Verschluss von Peritoneum, Muskulatur und Faszie erfolgt mit 5/0 Ethilon als fortlaufende Naht. Der Wundverschluss der Hautschicht erfolgt in gleicher Technik.

3.2.3 Postoperative Beobachtung und Überlebenskinetik

Die Versuchstiere werden postoperativ alle 6 Stunden kontrolliert. Bei der Überlebenskinetik beträgt der Gesamtbeobachtungszeitraum 240 Stunden (10 Tage).

Sowohl bei der Überlebenskinetik (siehe Abb. 2.1.), als auch bei den weiteren Versuchen werden die Tiere aus der FX06- und der Kontrollgruppe abwechselnd operiert. Sofort nach dem Wundverschluss wird dem Tier je nach Gruppenzugehörigkeit 0,1ml FX06 0,1ml physiologische entweder oder

Kochsalzlösung intramuskulär (linker Oberschenkel) mit einer Insulinspritze appliziert. Die zweite Applikation erfolgt nach 8 Stunden in den kontralateralen Oberschenkel. Bei der Überlebenskinetik folgen nun noch drei weitere Applikationen im Abstand von jeweils 12 Stunden. Dabei wird die Applikationsseite immer gewechselt.

Nach Ablauf des Beobachtungszeitraumes werden die überlebenden Tiere narkotisiert und durch eine cervicale Dislokation getötet.



Abb. 2.1.: Versuchsablauf Überlebenskinetik; CASP Colon ascendens Stent Peritonitis, NaCl Natriumchlorid (physiologische Kochsalzlösung)

3.2.4. Organentnahmen zur Herstellung von Organüberständen

Die Organentnahmen erfolgen 20 Stunden nach der CASP-Operation (siehe Abb. 2.2.). Die Versuchstiere werden wie unter 3.2.2.1. anästhesiert und auf dem Rücken liegend an Vorderund Hinterläufen mit Heftpflaster auf einer Polystyrolschaumstoffplatte fixiert. Nach der Hautdesinfektion mit 70% igem Ethanol wird die Hautnaht der ersten Operation mit einer Schere eröffnet. Das Peritoneum wird von der Symphyse bis zum Sternum mit einer Schere eröffnet und die Bauchorgane in der Reihenfolge Leber, Milz und linke Niere explantiert. Für die Entnahme der Lunge wird eine Sternotomie mit der Schere durchgeführt und die beiden Lungenflügel jeweils an den Hilusstrukturen abgesetzt. Die explantierten Organe werden in ein mit 2ml eiskaltem sterilem PBS gefüllten Rundbodenröhrchen (10ml) gegeben und anschließend kurzzeitig bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

3.2.5. Gewinnung von Peritoneallavage

Bei der Gewinnung von Peritoneallavage (siehe Abb. 2.2.) wird wie bei der Organentnahme bis einschließlich der Eröffnung der Hautnaht vorgegangen. Die Peritonealhöhle wird nicht eröffnet. Unter sterilen Bedingungen werden 3ml steriles PBS mit einer 20G-Kanüle in eine 10ml Spritze aufgezogen. Mit dieser Spritze wird die Peritonealhöhle anschließend punktiert und die Menge 3ml steriles PBS injiziert. Nach kurzem Schwenken der Flüssigkeit werden wieder insgesamt 2ml zurückgezogen und in 15ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die entnommenen Proben werden bis zur Zentrifugation auf Eis gelagert. Die Zentrifugation erfolgt 10 Minuten lang bei 4.000rpm und 4°C. Der gewonnene Überstand wird mittels Pipette gewonnen und erneut in 15ml Zentrifugenröhrchen überführt, die dann zum Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff gehalten werden. Die weitere Lagerung erfolgt bei -80°C. Die Gewinnung von Peritoneallavage erfolgt 20 Stunden postoperativ.

3.2.6. Gewinnung von Serum

Die Versuchstiere werden analog zur Operation mit Avertin-Lösung narkotisiert. Danach werden die Tiere in die Kriechröhre verbracht an deren Ende der Schwanz herausschaut. Die Schwanzvene wird nun mit einer Insulinspritze punktiert und das Blut in ein 2ml Reagenzgefäß überführt. Bei erfolgloser Punktion der Schwanzvene wird mit einer Hämatokritkapillare der Retroorbitalplexus punktiert und das Blut ebenfalls in einem 2ml Reagenzgefäß aufgefangen. Nach vollständiger Gerinnung wird das Blut für 10 Minuten bei 13.000rpm und 22°C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 2ml Reagenzgefäß überführt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgt bei -80°C.

3.2.7. Gewinnung von Vollblut

Den narkotisierten Tieren wird hier ebenfalls die Schwanzvene oder der Retroorbitalplexus punktiert und das Blut in Reagenzgefäßen gesammelt. Die verwendeten Materialien sind jedoch heparinisiert.

3.2.8. Gewinnung von Organüberständen

Die frisch entnommenen und auf Eis gelagerten Organproben werden gewogen und entsprechend des Ergebnisses mit der 10fachen Menge Lysepuffer in neue 10ml Rundbodenröhrchen überführt. Nach der mechanischen Organlyse entsteht somit eine 10%ige Lösung des Organs (z.B. 100mg Organ in 1ml Lysepuffer). Als Lysepuffer dient die unter 3.1.7. beschriebene 200%ige Verdünnung der CHAPS-Stammlösung mit den entsprechenden Zusätzen.

Vor Beginn der Organhomogenisierung wird das Arbeitswerkzeug des Organlysators (Ultra Thurrx) mit sterilem PBS, NaOH und 70%igem Ethanol gespült. Danach kann die Lyse des ersten Organes erfolgen. Die Homogenisierung eines Organs erstreckt sich dabei zwischen 30 bis 60 Sekunden auf der höchsten Betriebsstufe des Organlysators. Zwischen den einzelnen Organlysen wird das Gerät jeweils in der Reihenfolge PBS, 70%iger Ethanol und wieder PBS gereinigt, damit es zu keiner Verschmutzung der einzelnen Proben kommt. Das gewonnene Homogenisat wird jeweils in ein 2ml Reagenzgefäß überführt und in einem ersten Zentrifugationsschritt 20 Minuten lang bei 13.000rpm und 4°C zentrifugiert. Nach diesem Arbeitsschritt wird der Überstand in ein neues 2ml Reagenzgefäß gefüllt und das am Boden befindliche Pellet verworfen. Nach dem zweiten Zentrifugationsdurchgang, der in den gleichen Einstellung wie der Erste durchgeführt wird, werden die Überstände in drei 500µl

Eppendorfgefäße zu je 60µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung erfolgt bei -80°C.



Abb. 2.2.: Versuchsablauf Organ- und Blutentnahme; CASP Colon ascendens Stent Peritonitis, NaCl Natriumchlorid (physiologische Kochsalzlösung)

3.3. Zytokin- und Chemokinanalyse

3.3.1. Cytometric Bead Array (CBA)

Die Analyse von Zytokinen und Chemokinen aus den tierexperimentell gewonnen Proben (Organüberstände, Serum) erfolgt mit Hilfe des Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kits der Firma BD Biosciences. Bei geringem Bedarf an Probenvolumen erlaubt das hier verwendete Kit die gleichzeitige qualitative und quantitative Diskriminierung von Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-10 (IL-10), Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), Interferon- γ (INF- γ), Tumornekrosefaktor (TNF) und Interleukin-12p70 (IL-12p70).

Der Cytometric Bead Array (CBA) bedient sich in seinen besonderen Eigenschaften dem Grundprinzip des Partikel-Immunoassays (PIA). Der PIA wird wiederum im Sandwich-Format eingesetzt. Grundlage sind hierbei Mikropartikel, auch Beads genannt, die vergleichbar zum konventionellen ELISA die feste Phase und somit die Kopplungsoberfläche für die antigenspezifischen Fängerantikörper darstellen. Die Fängerantikörper binden spezifisch mit ihrem Paratop an das entsprechende Epitop des Antigens, in diesem Fall an das entsprechende Epitop des Zytokins bzw. Chemokins. Um das Antigen im durchflußcytometrischen Messvorgang auch detektieren können, wird dem Probengemisch zu ein sogenannter Detektionsantikörper zugesetzt, der genauso wie der Fängerantikörper spezifisch an das Antigen bindet und mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein-Isothiocyanat [FITC], Phycoerythrin[PE]) gekoppelt ist.

Da im Falle des Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kits gleichzeitig mehrere Antigene in ihrer Qualität und Quantität gemessen werden, spricht man hier von einem Multiplex-Partikel-Immunoassay (Multiplex-PIA). Beim Multiplex-PIA dienen die Eigenschaften Größe und Eigenfluoreszenz der verschiedenen Partikelpopulationen bei der Messung als Unterscheidungsmerkmale.

Bei der durchflußcytometrischen Analyse kommen die Partikel als Punktwolke in einem Dot-Plot, bei dem Forward-Scatter (FSC) gegen Side-Scatter (SSC) aufgetragen ist, zu liegen. Da sich die einzelnen Partikelpopulationen wie oben beschrieben in ihren Eigenfluoreszenzen unterscheiden, können sie anhand von Fluoreszenz 1 gegen Fluoreszenz 2 in einem weiteren Dot-Plot dargestellt und aufgetrennt werden. Jede Partikelpopulation entspricht dabei einem Antigen. Die Quantität jedes einzelnen Antigens lässt sich nun in einem Histogramm-Plot mit Hilfe der Intensität der Fluoreszenz 3 aufzeigen.

Durch die Erstellung von Standardkurven lassen sich die gemessenen Fluoreszenzintensitäten in absolute Zytokin- und Chemokinmengen umrechnen.

3.3.1.1. Versuchsprotokoll

Die Durchführung des Cytometric Bead Array Mouse Inflammation Kits der Firma BD Biosciences erfolgt laut Herstellerangaben. Alle benötigten Reagenzien werden im Kit mitgeliefert.

Die Standardlösung wird in 1ml Assay Diluent zum Top-Standard mit einer Konzentration von 10.000pg/ml rekonstituiert. Nach 15minütiger Inkubation erfolgt die Herstellung einer Verdünnungsreihe in 1:2-Schritten ausgehend vom Top-Standard bis zu einer Konzentration von 20pg/ml. Als Negativkontrolle dient der Assay Diluent.

Für die Herstellung des Capture Bead Mix wird ausgehend von der Anzahl der Proben- und Standardröhrchen die benötigte Menge der jeweiligen 6 Capture Beads (je 5µl Capture Bead pro Zytokin und Röhrchen) zusammengemischt und ausgiebig gevortext um eine mögliche Aggregation zu verhindern. Zu 25µl Probe werden jeweils 25µl Capture Bead Mix und PE Detection Reagent zugegeben, nochmals gevortext und bei Raumtemperatur für 2 Stunden im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wird zu jedem Probenröhrchen 500µl Waschpuffer dazugegeben. Es schließt sich eine 5minütige Zentrifugation bei 1000rpm an. Der Überstand wird verworfen und das sich am Boden befindliche Pellet mit 200µl Waschpuffer resuspendiert.

Für die Kalibrierung des Cytometers werden die Cytometer Setup Beads bereitgestellt. Es werden insgesamt drei Lösungen hergestellt, die alle 50µl Cytometer Setup Beads enthalten. Lösung B enthält zusätzlich 50µl FITC Positive Control Detektor, Lösung C zusätzlich 50µl PE Positive Control Detektor. Alle drei Lösungen werden für 30min ebenfalls bei Raumtemperatur und im Dunkeln inkubiert. Danach wird die Lösung A mit 450µl Waschpuffer, die anderen beiden Lösungen mit je 400µl Waschpuffer aufgefüllt.

3.3.2. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist eine immunologische Messmethode, bei der spezifische Antikörper gegen das zu bestimmende Antigen an eine feste Phase gebunden sind. Nach erfolater Antigen-Antikörper-Reaktion und ausgiebigen Waschschritten zur Entfernung von nicht gebundenem Antigen werden die Immunkomplexe durch einen weiteren enzymgekoppelten Antikörper detektiert (=Sandwich-Methode). Es folgt ein weiterer Waschschritt um nichtgebundene Detektionsantikörper zu eliminieren. Proportional zur Konzentration des Antigens bildet sich nach Substratgabe ein Farbkomplex, der photometrisch quantifiziert werden kann. Anhand einer Standardkurve, erstellt aus Standardwerten mit bekannter ansteigender Probenkonzentration, lässt sich die Antigenkonzentration berechnen.

Im Falle des hier verwendeten Mouse IL-1 β ELISA der Firma Bender MedSystems ist ein Anti-Maus IL-1 β Antikörper an die als feste Phase dienende 96-Well-Mikrotiterplatte adsorbiert. Das in den Proben (Organüberstände, Serum) und Standardlösungen vorhandene Interleukin-1 β bindet an die absorbierten Anti-Maus IL-1 β Antikörper. Im nächsten Schritt wird ein Biotin konjugierter Anti-Maus IL-1 β Antikörper in die Mikrowells gegeben, der wiederum an Interleukin-1 β bindet. Nach einem gründlichen Waschgang wird in einem zweiten Inkubationsschritt Streptavidin-HRP hinzugegeben, das seinerseits an den Biotin konjugierten Anti-Maus IL-1 β Antikörper bindet. Nach einem erneuten Waschgang folgt der dritte und letzte Inkubationsschritt mit der Zugabe der Substratlösung. Die ablaufende enzymatische Reaktion wird mit der Stopplösung zum Stillstand gebracht und der entstandene Farbkomplex bei einer Wellenlänge von 450nm photometrisch quantifiziert.

3.3.2.1. Versuchsprotokoll

Die Durchführung des Mouse IL-1β ELISA der Firma Bender MedSystems erfolgt laut Herstellerangaben.

Anfangs werden alle Wells mit jeweils 400µl Waschpuffer gewaschen. Zur Herstellung der Standardreihe werden 100µl Sample Diluent in alle Standardwells

vorgelegt. Im nächsten Schritt werden 100µl der vorher angefertigten Standardlösung (Konzentration = 1.000pg/ml) in die Wells A1 und A2 pipettiert und mehrfach durch abwechselnde Ejektion und Aspiration durchmischt. Beginnend bei A1 bzw. A2 werden jeweils 100µl absteigend bis G1 bzw. G2 in das nächst benachbarte Well übertragen. Zwischen den Übertragungsschritten ist auf eine gute Durchmischung zu achten. Zum Schluss werden in den beiden Verdünnungsreihen jeweils 100µl verworfen. Die Standardreihe erstreckt sich nun zwischen den Konzentrationen 1.000pg/ml bis 7,8pg/ml. Die Wells H1 und H2 (= Blank Wells) werden mit 100µl Sample Diluent gefüllt. In die restlichen Wells werden jeweils 50µl der Proben in zweifacher Ausführung und 50µl Sample Diluent pipettiert. Nachdem zu allen Proben- und Standardwells 50µl Biotin-Konjugat hinzugefügt wurde, wird die Platte auf einem Shaker bei 100rpm für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird die Platte insgesamt viermal mit jeweils 400µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Danach werden 100µl Streptavidin-HRP in jedes Well pipettiert und die Platte unter den gleichen Bedingungen wie beim ersten Inkubationsschritt für eine Stunde inkubiert. Der nächste Arbeitsschritt beinhaltet einen weiteren Waschschritt und das Hinzufügen von 100µl TMB Substrate Solution in jedes Well. Es folgt eine letzte Inkubation bei Raumtemperatur für etwa 10 Minuten. Die enzymatische Reaktion wird mit jeweils 100µl Stop Solution gestoppt. Es schließt sich die spectrophotometrische Analyse bei einer Wellenlänge von 450nm an.

3.4. Bakteriologische Untersuchung

Mit der bakteriologischen Untersuchung ist der Nachweis von lebenden Bakterien in den einzelnen Kompartimenten der Versuchstiere möglich. Die Entnahme von Organen, Peritonealflüssigkeit und Vollblut erfolgt 20 Stunden nach der Sepsisinduktion.

Die Versuchstiere werden dabei wie unter 3.2.2.1. erläutert, narkotisiert und die einzelnen Proben wie unter den Punkten 3.2.4. bis 3.2.8 beschrieben gewonnen. Die explantierten Organe werden in mit 2ml PBS gefüllten Rundbodenröhrchen gelegt. Zusammen mit dem Blut und der Peritonalflüssigkeit werden die Organe bis zu ihrer Homogenisierung auf Eis gelagert.

Die Organlyse erfolgt mit dem Ultra-Thurax auf der Betriebsstufe 2. Zwischen den Homogenisierungsvorgängen wird wie unter Punkt 3.2.8 aufgelistet der Organlysator gereinigt. Nach der Organlyse werden in jedes Probenröhrchen nochmals 2ml PBS gegeben, sodass das Gesamtvolumen etwa 4ml pro Röhrchen beträgt. Mit Hilfe einer Mikrotiterplatte und PBS wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. Für Vollblut und für die Organe Niere, Lunge und Milz werden folgende Verdünnungsstufen bestimmt: unverdünnt, 1:10 und 1:100. Bei der Peritoneallavage und den Leberproben werden die Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 angefertigt. Jede Probe wird in jeder angegebenen Verdünnungsstufe 3fach bestimmt. Dazu werden Vollblutagarplatten mit jeweils 10µl der Probe beimpft. Die gleichmäßige Verteilung der Probe auf der Agarplatte erfolgt mit Hilfe von Plastikkugeln und manuellem Schütteln. Anschließend werden die Platten im Brutschrank bei 37°C für 24 Stunden verwahrt. Nach dieser Inkubationszeit kommt es zur Auszählung der entstandenen Kolonien. Die Ergebnisse werden in der Einheit "Koloniebildende Einheiten pro ml" (KbE/ml) angegeben.

3.5. Bestimmung der Kapillarpermeabilität

Das Capillary leak Syndrom spielt in der Pathophysiologie der Sepsis eine tragende Rolle. Das Ausmaß der Kapillarpermeabilität lässt sich mit der Evans Blue Färbetechnik darstellen. Der Farbstoff Evans Blue bindet nach der intravenösen Injektion an Plasmaproteine. Bei steigender Extravasation von Plasmaproteinen durch eine verstärkte Kapillarpermeabilität im Rahmen des septischen Geschehens kommt es somit auch zu einer Anreicherung von Evans Blue in den Organen. Die Farbstoffkonzentrationen der Organe können über die photospektrometrisch ermittelten Extinktionswerte und deren Vergleich mit der vorher erstellten Standardkurve ermittelt werden.

3.5.1. Versuchsprotokoll

Die Durchführung der Evans Blue Färbetechnik erfolgt in leichten Modifikationen nach den Beschreibungen von Reutershan et al. und Peng et al. [128, 129]. Die hierzu notwendige Organexplantation kann aus technischen und zeitlichen (differenter Zeitpunkt der Organentnahme) Gründen nicht mit der unter Punkt 3.2.4 genannten Organentnahme erfolgen.

Insgesamt 10 Stunden nach der Sepsisinduktion kommt es nach vorheriger Narkose mit Avertin (siehe 3.2.2.1.) zur Explantation der Lungen. Eine halbe Stunde vor diesem Eingriff werden den Versuchstieren 200µl Evans Blue Farbstoff in einer Konzentration von 20mg/kg Körpergewicht intravenös in die Schwanzvene appliziert. Zur Organentnahme werden das Abdomen und der Thorax wie unter 3.2.4. beschrieben eröffnet. Anschließend werden die Lungen über den schlagenden rechten Ventrikel mit 10ml eiskaltem PBS perfundiert um intravaskuläre Farbstoffreste zu entfernen. Die Lungen können nun an den Hilusstrukturen abgesetzt werden. Nach dem Wiegen werden die entnommenen Organe in Probenröhrchen gelegt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach wird jedes gefrorene Organ zusammen mit 1ml PBS mit dem Ultra Thurrax auf der höchsten Betriebsstufe homogenisiert. Zwischen den Organproben wird das Zerkleinerungswerkzeug wie unter 3.2.8. erläutert gereinigt. Der nächste Schritt beinhaltet eine 14 bis 18stündige Inkubationszeit im 60°C heißen Wasserbad mit jeweils 2ml Formamide pro Organprobe. Nach der Inkubationszeit werden die Proben 30 Minuten lang mit 5000rpm zentrifugiert. Bei jeder einzelnen Probe wird 1ml Überstand in Messküvetten überführt und spectrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 620nm und 740nm analysiert. Als Leerwert dient 1ml Formamide. Die gemessenen Extinktionswerte werden nach der Formel E620 (corrected) = E620 - (1,426 x E740 + 0,030) auf Grund des Vorhandenseins von Hämpigmenten korrigiert und anschließend mit der Standardkurve verglichen. Die Standardkurve wird mit bekannten Konzentrationen zwischen 0,0 und 62,5µg Evans Blue pro 1ml Formamide aufgestellt.

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in Mikrogramm Evans Blue pro Gramm Organgewebe.

3.6. Tierversuchsanzahl der Einzelversuche

Die Gruppengröße der Einzelversuche wurde mittels der Software GraphPad StateMat entsprechend der statistischen Zielkriterien berechnet.

Für die Evaluierung der Überlebenskinetik wurde eine Gruppengröße von jeweils n=10 für die Verum- als auch Kontrollgruppe gewählt (Gesamttieranzahl: 20). Für die Messung der Zytokinspiegel in den einzelnen Organen als auch im Serum betrug die Gruppengröße je n=6 mit Ausnahme der ELISA-Bestimmung für das Zytokin IL-1 β , da hier in einigen Proben die Konzentration unter der Nachweisbarkeitsgrenze lag und somit die Daten nicht miterfasst werden konnten (Gesamttieranzahl: 12). Hier ergab sich im Endeffekt folgende Verteilung der Gruppengrößen: IL-1 β im Serum und in der Milz n=6 je Versuchsgruppe; IL-1 β in der Leber n=5 je Versuchsgruppe; IL-1 β in der Lunge n=5 für die Verumgruppe und n=4 für die Kontrollgruppe. Neben der Zytokinbestimmung aus den Serumproben dieser Versuchsreihe wurde hier parallel auch noch die klinische Chemie bestimmt (ASAT, ALAT und Kreatinin: n=6 pro Versuchsgruppe; S-100: n= 4 für die Verumgruppe und n=2 für die Kontrollgruppe).

Zur Evaluation der Bakterienlast in den einzelnen abdominellen Kompartimenten und Organen betrug die Gruppengröße für die Peritoneallavage sowie für die Organe Niere und Leber n=10 pro Versuchsgruppe, für die Organe Milz und Lunge n=11. Bei der Bestimmung der Bakteriologie im Blut konnte für die Verumgruppe nur ein n=9 und für die Kontrollgruppe ein n=8 erreicht werden, da eine ausreichende Blutgewinnung nicht bei jedem Versuchstier möglich war (Gesamttieranzahl: 22).

Im letzten Teilversuch zur Bestimmung der Gefäßpermeabilität wurden insgesamt 14 Tiere verwendet, wobei ein Tier postoperativ in den ersten 8h verstarb, so dass dieses nicht mit in die Auswertung einfließen konnte. Für die Verumgruppe ergibt sich somit eine Gruppengröße von n=7, für die Kontrollgruppe eine Größe von n=6.

3.7. Statistische Auswertung

Für die gesamte statistische Auswertung wird die Software GraphPad Prism 4 verwendet. Die Überlebenskinetiken werden mit dem Log-Rank-Test nach Kaplan-Meier ausgewertet. Die statistische Auswertung im Ergebnisteil erfolgt mit dem Rangsummentest nach Mann-Whitney mit einem zweiseitigen P-Wert aufgrund der fehlenden Normalverteilung und der kleinen Gruppengrößen. Als Signifikanzniveau wird 5% festgelegt. Unterschiede, die einen P-Wert unter 0,05 ergeben, werden mit einem * gekennzeichnet.

4. Ergebnisse



4.1. Signifikanter Überlebensvorteil durch die Applikation von FX06

Die obige Abbildung zeigt das Ergebnis der Überlebenskinetik nach CASP. Sowohl die Verum (FX06)-, als auch die Kontrollgruppe (NaCl) wurden zur Induktion der polymikrobiellen Sepsis mit einem 18G Katheter behandelt. Sofort nach der Operation wurde der Verumgruppe eine Medikamentendosis von 5µg/kg Körpergewicht gelöst in 100µl NaCl intramuskulär appliziert. Der Kontrollgruppe wurden zum Vergleich 100µl NaCl intramuskulär gespritzt. Die weiteren Applikationen erfolgten nachfolgend wie in der Abbildung 2.1. im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben.

In der Verumgruppe verstirbt nach 36 Stunden ein Versuchstier. Die anderen Versuchstiere dieser Gruppe überleben den Endpunkt des vorher festgelegten Beobachtungszeitraumes von 240 Stunden. Die Letalität weist somit einen Wert von 10% in der Verumgruppe auf. In der Kontrollgruppe dagegen zeigt sich eine Letalität von 80%. Nach 24 Stunden sind bereits 4 Tiere gestorben, nach weiteren 12 Stunden insgesamt 6. Kumulativ sind 48 Stunden nach der Operation somit 8 von 10

Versuchstiere aus der Kontrollgruppe gestorben. Danach verstirbt kein Tier mehr an der durch die Operation bedingten polymikrobiellen Sepsis. Aus dieser Datenlage ergibt sich ein Signifikanzniveau hinsichtlich der Überlebensrate von p=0.0017.

Die hier beschriebene Überlebenskinetik zeigt, dass die Tiere, die postoperativ mit dem Verum behandelt wurden, einen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zur Kontrollgruppe aufweisen.

4.2. Keine signifikanten Unterschiede in Zytokin- und Chemokinkonzentrationen zwischen den Versuchsgruppen

Durch die Induktion der polymikrobiellen Sepsis in den Versuchstieren kommt es zu einer systemischen Entzündungsreaktion mit Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen. Ein Anstieg der Zytokin- und Chemokinkonzentrationen erlaubt somit einen Rückschluss über das Vorhandensein einer systemischen Inflammationsreaktion und deren Schweregrad.

Zur Messung der Zytokinspiegel in den Organen Leber, Milz, Niere und Lunge sowie im Serum wurde wieder eine Verum- und eine Kontrollgruppe mit jeweils n=6 gebildet. Bei beiden Versuchsgruppen wurde die polymikrobielle Sepsis erneut mit einem 18G Stent induziert. Wie in der Abbildung 2.2. im Abschnitt "Material und Methoden" beschrieben, wurde wie schon bei der Erstellung der Überlebenskinetik nach Beendigung der Operation sofort die erste Medikamentendosis von 5µg/kg Körpergewicht gelöst in 100µl NaCl intramuskulär appliziert. Der Kontrollgruppe wurde wieder das gleiche Volumen Kochsalz gespritzt. Nach weiteren 8 Stunden folgte die zweite Applikation. Insgesamt 20 Stunden nach der Operation wurden die Tiere dann geopfert um die Organe sowie das Blut zur Messung entnehmen zu können.

Die Zytokine IL-12, IL-10, IL-6, TNF-α, IFN-γ und MCP-1 wurden mittels BD Cytometric Bead Array im FACS gemessen.

4.2.1. Zytokinspiegel in der Leber

Die Zytokinspiegel in der Leber zeigen im Vergleich zwischen den beiden Versuchsgruppen (jeweils n=6) keine signifikanten Unterschiede auf.

Die TNF-α-Konzentration hat in der Verumgruppe einen Mittelwert von 34,88pg/ml (SEM +/- 13,07), in der Kontrollgruppe von 20,77pg/ml (SEM +/- 7,827) (p=0,57). Die Zytokinspiegel für Interferon-γ betragen durchschnittlich für die mit Verum behandelte Gruppe 2,4pg/ml (SEM +/- 0,3473) und für die Kontrollgruppe 1.433pg/ml (SEM +/- 0,65) (p=0,33). Die Mittelwerte für die MCP-1 Konzentrationen sind in der Verumgruppe 2276pg/ml (SEM +/- 679,5) und 1719pg/ml (SEM +/- 535,9) in der Kontrollgruppe (p=0,9). Bei IL-10 sind die Zytokinspiegel mit jeweils 113,0pg/ml (SEM +/- 24,71) in beiden Versuchsgruppen gleich hoch (p>0,99). Die Messung von IL-6 ergibt einen höheren Wert in der Kontrollgruppe mit 605,5pg/ml (SEM +/- 365,5) im Vergleich zur Verumgruppe mit 480,0pg/ml (SEM +/- 365,7) (p=0,9). Das Zytokin IL-12 weist einen Mittelwert in der Verumgruppe von 1,8pg/ml (SEM +/- 1,8) und in der Kontrollgruppe von 0,5167pg/ml (SEM +/- 0,5167) auf (p>0,99).











IL-12 4.0 3.5-3.0-2.5-2.0-1.5-1.0-0.5-0.0

þg/ml

Verum (FX06) Kontrolle Abb. 9: IL-12-Konzentration in der Leber 20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle

4.2.2. Zytokinspiegel in der Lunge

Die Zytokinspiegel in der Lunge zeigen ein ähnliches Bild wie die der Zytokinmessungen in der Leber (jeweils n=6 pro Versuchsgruppe).

Die Konzentration von TNF- α beträgt im Mittel in der Verumgruppe 43,73pg/ml (SEM +/- 24,98) und in der Kontrollgruppe 42,5pg/ml (SEM +/- 21,78) (p>0,99). Bei IFN- γ zeigt sich eine Konzentration von 1,783pg/ml (SEM +/- 0,9914) in der mit Verum behandelten Versuchsgruppe und in der Kontrollgruppe eine Konzentration von 0,5567pg/ml (SEM +/- 0,3539) (p=0,32). Die MCP-1-Messung ergibt eine mittlere Konzentration von 1817pg/ml (SEM +/- 360,1) in der Verumgruppe und 1477pg/ml (SEM +/- 393,5) in der Kontrollgruppe (p=0,68). Die Zytokinspiegel von IL-10 weisen Werte von 32,03pg/ml (SEM +/- 26,24) in der Verumgruppe und 6,583pg/ml (SEM +/- 6,583) in der Kontrollgruppe auf (p=0,73). IL-6 hat eine mittlere Konzentration in der Verumgruppe von 883,3pg/ml (SEM +/- 728,0) und in der Kontrollgruppe von 727,4 (SEM +/- 441,0) (p=0,9). Das Zytokin IL-12 konnte in beiden Versuchsgruppen nicht detektiert werden.











4.2.3. Zytokinspiegel in der Milz

Die mittlere TNF- α -Konzentration beträgt 133,7pg/ml (SEM +/- 30,04) in der Verumund 73,03pg/ml (SEM +/- 18,15) in der Kontrollgruppe (p=0,06). Die Werte für Interferon- γ zeigen mit einem Mittelwert von 5,667pg/ml (SEM +/- 1,564) in der Verumgruppe und 6,35pg/ml (SEM +/- 3,765) in der mit Placebo behandelten Versuchsgruppe genauso wie bei den anderen Zytokinmessungen in der Milz keine signifikanten Unterschiede auf (p=0,46). Die MCP-1-Konzentrationen weisen Werte von 1409pg/ml (SEM +/- 252,2) für die Verumgruppe und 1184pg/ml (SEM +/- 392,5) für die Kontrollgruppe auf (p=0,79). Für die Zytokine IL-10 und IL-6 ergeben sich in der genannten Reihenfolge für die Verumgruppe die folgenden mittleren Konzentrationen: 9,4pg/ml (SEM +/- 6,137) und 815,4pg/ml (SEM +/- 479,2). Für die Kontrollgruppe lauten die Werte in gleicher Reihenfolge: 23,27pg/ml (SEM +/- 11,76) und 876,8pg/ml (SEM +/- 395,8) (p=0,39 für IL-10, p>0,99 für IL-6). IL-12 kann nur in der Kontrollgruppe detektiert werden (p>0,99). Die Gruppengröße betrug jeweils n=6.









20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle



IL-12 1.5 1.0 0.5 0.0 Verum (FX06) Kontrolle Abb. 20: IL-12-Konzentration in der Milz 20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle

4.2.4. Zytokinspiegel in der Niere

In den Organlysaten der Niere wurden ebenfalls die wichtigsten Zytokine evaluiert (jeweils n=6 pro Versuchsgruppe).

Für die Bestimmung von TNF- α ergeben sich ein Werte von 24,95pg/ml (SEM +/-7,564) in der Verumgruppe und 32,17pg/ml (SEM +/- 12,71) in der Kontrollgruppe. Der Mittelwert ist zwar in der Verumgruppe tendenziell niedriger, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant (p>0,99). Ein ähnliches Bild zeichnet sich für IL-6 ab. Hier beträgt der Mittelwert 1077pg/ml (SEM +/- 463,1) in der Verumgruppe und 2174pg/ml (SEM +/- 1041) in der Kontrollgruppe (p>0,99). Die Werte für INF- γ sind dagegen im Mittel kaum unterschiedlich (Verumgruppe: 0,9pg/ml (SEM +/- 0,6885), Kontrollgruppe: 0,8667pg/ml (SEM +/- 0,3955)) (p=0,69). Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 weist ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf, wobei es jedoch tendenziell in der Kontrollgruppe mit 45,08pg/ml (SEM +/- 22,59) erhöht ist gegenüber 32,75pg/ml (SEM +/- 16,37) in der Verumgruppe (p=0,71). Das Interleukin 12 (IL-12) lässt sich nur in der Verumgruppe nachweisen (p>0,99).

Bei der Bestimmung des Chemokins MCP-1 zeigen sich fast identische Mittelwerte für die beiden Gruppen: 2525pg/ml (SEM +/- 608,7) in der Verumgruppe und 2717pg/ml (SEM +/- 942,8) in der Kontrollgruppe (p>0,99).

Es lassen sich also auch in der Niere zusammenfassend keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zytokin- und Chemokin-Spiegel nachweisen.







20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle



20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle



4.2.5. Zytokinspiegel im Serum

Die im Serum gemessene TNF- α -Konzentration beträgt im Mittel in der Verumgruppe 449,1pg/ml (SEM +/- 251,9) und in der Kontrollgruppe 408,1 (SEM +/- 179,5) (p=0,9). Bei Interferon- γ sind die Mittelwerte fast gleich mit 10,7pg/ml (SEM +/-4,723) in der mit Verum behandelten Gruppe und 10,58pg/ml (SEM +/- 4,136) in der Kontrollgruppe (p=0,79). Bei der MCP-1 Bestimmung ist der Verum-Wert mit 6301pg/ml (SEM +/- 1168) höher als in der Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von 5542pg/ml (SEM +/- 1744) (p=0,73). Die Werte für IL-10 betragen in der Verumgruppe 4091pg/ml (SEM +/- 2751) und in der Kontrollgruppe 2812pg/ml (SEM +/-1709) (p=0,74). Bei IL-6 ist die mittlere Konzentration in der Kontrollgruppe mit 10590pg/ml (SEM +/- 3861) höher als in der Verumgruppe mit 10090pg/ml (SEM +/-2656) (p>0,99). Die IL-12-Konzentrationen im Serum betragen für die Verumgruppe 5,2pg/ml (SEM +/- 2,517) und für die Kontrollgruppe 0,9333pg/ml (SEM +/- 0,9333) (p=0,18). Die Gruppengröße betrug jeweils n=6.









20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle



IL-12



4.2.6. Nachweis von Zytokinen in Organen und Serum mittels ELISA

Neben dem Nachweis der Zytokine bzw. Chemokine TNF- α , INF- γ , IL-6, IL-10, IL-12 und MCP-1 mittels CBA, wurde auch noch das Zytokin IL-1 β mit Hilfe der Immunoassay-Technik nach Induktion eines septischen Krankheitsbildes in der Verum- und Kontrollgruppe untersucht. Nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis durch Implantation eines 18G-Stents und der zweimaligen Applikation von Verum bzw. NaCl (siehe Abb. 2.2.) wurden die gewünschten Proben 20 Stunden nach der Operation entnommen und laut dem unter Punkt 3.3.2.1. dargelegten Versuchsprotokoll weiterverwendet.

Wie schon in den Messungen der anderen Zytokine und Chemokine ergaben sich auch bei den Bestimmungen von IL-1 β zwischen den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. Die Gruppengrößen stellten sich dabei wie folgt dar: Serum und Milz n=6 je Versuchsgruppe; Leber n=5 je Versuchsgruppe; Niere n=6 für die Verumgruppe und n=4 für die Kontrollgruppe; Lunge n=5 für die Verumgruppe und n=4 für die Kontrollgruppe (siehe dazu auch Punkt 3.6.)

In der Verumgruppe zeigen sich die einzelnen mittleren Konzentrationen von IL-1ß mit Werten von 265,2pg/ml (SEM +/- 34,84) in der Leber, 200,4pg/ml (SEM +/- 19,6) in der Lunge, 145,8pg/ml (SEM +/- 12,98) in der Milz, 256,7pg/ml (SEM +/- 22,37) in 11,49pg/ml +/der Niere und (SEM 5,843) im Serum. Die Durchschnittskonzentrationen von IL-1ß in der Kontrollgruppe weisen für die Leber mit 254,6pg/ml (SEM +/- 9,073) und für die Milz mit 150,9pg/ml (SEM +/- 20,04) keine großen Unterschiede zur Verumgruppe auf. Die weiteren Messungen ergeben Mittelwerte von 337,3pg/ml (SEM +/- 67,52) in der Lunge, 224,2pg/ml (SEM +/-23,87) in der Niere und 41,71pg/ml (SEM +/- 27,07) im Serum. (Serum: p=0,11; Milz: p=0,9; Leber: p=0,94; Niere: p=0,45; Lunge: p=0,19).





Abb. 34: IL-1 β -Konzentration in der Lunge 20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle



Abb. 35: IL-1 β -Konzentration in der Milz 20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle



20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle



4.3. Bakterienbesiedlung in den Versuchsgruppen ohne Unterschiede

Zur Bestimmung der Bakterienbesiedlung in den Organen Leber, Milz, Niere und Lunge sowie in den Kompartimenten Serum und Peritoneallavage erfolgten die Durchführung der Operation, die Nachbehandlung sowie die Probenentnahmen und - aufbereitungen wie unter Punkt 3.4. im Abschnitt "Material und Methoden" geschildert. Die Probenentnahme mit der damit verbundenen Tötung der Versuchstiere erfolgte 20 Stunden postoperativ. Die Proben wurden nach entsprechender Aufarbeitung in einer Verdünnungsreihe zu je 10µl auf Blutagarplatten aufgetragen und ausgestrichen. Nach 24h im Brutschrank bei 37°C wurden die Bakterienkolonien ausgezählt.

In allen graphischen Darstellungen der Bakteriologie finden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe.

Die absolute Bakterienanzahl in der Niere beträgt im Mittel in der Verumgruppe (n=10) 813.000 (SEM +/- 449.600) und in der Kontrollgruppe (n=10) 2.559.000 (SEM +/- 1.379.000) (p>0,99). In der Milz befinden sich durchschnittlich 602.000 Bakterien pro ml (SEM +/- 380.400) auf Seiten der Verumgruppe (n=11) und 766.000 Bakterien pro ml (SEM +/- 412.500) in der Kontrollgruppe (n=11) (p=0,69). Die Mittelwerte für die Lunge sind bei den mit Verum behandelten Versuchstieren (n=11) 3.476.000 Bakterien pro ml (SEM +/- 2.791.000) und 3.874.000 Bakterien pro ml (SEM +/-2.198.000) bei den Kontrolltieren (n=11) (p=0,78). Die Bakterienanzahl im Blut beträgt im Schnitt 3.365.000 Bakterien pro ml (SEM +/- 2.116.000) in der Verumgruppe (n=9) und 1.121.000 Bakterien pro ml (SEM +/- 1.039.000) in der Kontrollgruppe (n=8) (p=0,2). In der Leber ist die absolute Bakterienzahl mit 2.813.000 pro ml (SEM +/- 1.432.000) in der Verumgruppe (n=10) niedriger als in der Kontrollgruppe (n=10) mit 16.580.000 Bakterien pro ml (SEM +/- 11.470.000) (p=0,62). Auch in der Peritoneallavage ist die Bakterienanzahl in der Kontrollgruppe (n=10) (17.110.000 Bakterien pro ml +/- 9.070.000) höher als in der Verumgruppe (n=10) (9.606.000 Bakterien pro ml +/- 4.765.000) (p=0,84).









Bakteriologie Leber



Abb. 42: Bakteriologie der Leber, 20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle, jeweils n=10

Bakteriologie Milz



Abb. 39: Bakteriologie der Milz, 20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle, jeweils n=11



Abb. 41: Bakteriologie im Vollblut, 20h nach CASP 18G, Verum (FX06) (n=9) vs. Kontrolle (n=8)

Bakteriologie Peritoneallavage



Abb. 43: Bakteriologie Peritoneallavage, 20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle, jeweils n=10

4.4. Bestimmung von Leber- und Nierenwerten

Mit der Bestimmung von Alaninaminotransferase (ALAT) und Aspartataminotransferase (ASAT) für die Leber sowie Kreatinin (Crea) und Protein S100 für die Niere kann eine mögliche Organtoxizität des Medikaments nachvollzogen werden. Die Werte wurden aus dem Serum gewonnen. Die Blutentnahme erfolgte 20h nach CASP 18G sowie zweimaliger Applikation des Medikaments bzw. NaCl (siehe Abbildung 2.2. sowie Punkt 3.2.6. im Abschnitt "Material und Methoden").

Die mittlere Konzentration von ASAT beträgt in der Verumgruppe (n=6) 4,867 μ katal/l (SEM +/- 0,9308) und in der Kontrollgruppe (n=6) 3,567 μ katal/l (SEM +/- 0,7796) (p=0,37). Zwar sind auch die ALAT-Werte bei den Versuchstieren der Verumgruppe (n=6) (1,372 μ katal/l, SEM +/- 0,3084) leicht höher als in der Kontrollgruppe (n=6) (1,01 μ katal/l, SEM +/- 0,266), aber auch hier ist der Unterschied nicht signifikant (p=0,37).

Bei der Überprüfung der Nephrotoxizität zeigt sich im Falle der Kreatininbestimmung ein niedrigerer Wert in der Verumgruppe (n=6) (4,667 μ mol/l, SEM +/- 1,909) als in der Kontrollgruppe (n=6) (8,667 μ mol/l, SEM +/- 2,348) (p=0,19). Die S-100-Werte unterscheiden sich nur marginal voneinander. In der Verumgruppe (n=4) zeigt sich ein Wert von 0,11 μ g/l (SEM +/- 0,07692) und in der Kontrollgruppe (n=2) ein Wert von 0,07 μ g/l (SEM +/- 0,02) (p=0,67).

Die Ergebnisse zeigen also keine signifikanten Unterschiede. Man darf daher schlussfolgern, dass das Verumpräparat keine organtoxischen Wirkungen auf Leber und Niere hat.



Kontrolle, jeweils n=6

ALAT



Abb. 45: ALAT-Konzentration im Serum, 20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle, jeweils n=6



Serum, 20h nach CASP 18G, Verum (FX06) vs. Kontrolle, jeweils n=6





4.5. Signifikant erhöhte pulmonale Gefäßpermeabilität in der Kontrollgruppe

Zur Bestimmung der Gefäßpermeabilität unter septischen Bedingungen in den Organen Leber, Milz und Lunge wurde bei den jeweiligen Versuchstieren einer Verum- und einer Kontrollgruppe eine polymikrobielle Sepsis mit der CASP-Operation induziert. Die Demaskierung der gesteigerten Gefäßpermeabilität und der Nachweis einer möglichen Wirkung des Verumpräparates bei diesem systemischen Prozess erfolgten nach dem unter Punkt 3.5.1. dargestellten Versuchsprotokoll.

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen auf, wie viel Milligramm Evans Blue pro Gramm Organ nachzuweisen sind. Die Konzentration von Evans Blue in einem Organ ist ein direktes Zeichen für die Gefäßpermeabilität. Ist die Konzentration hoch, so ist die Gefäßpermeabilität und somit die Extravasation von Entzündungszellen auch erhöht bzw. gesteigert.

Zehn Stunden nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis durch CASP 18G und einmaliger Applikation von FX06 bzw. NaCl postoperativ liegen die gemessenen Werte für Evans Blue pro Gramm Lungengewebe bei 1,597mg (SEM +/- 0,5841) für die Verumgruppe (n=7) und 5,114mg (SEM +/- 1.216) für die Kontrollgruppe (n=6). Der Vergleich zwischen den beiden Versuchsgruppen ergibt eine statistisch signifikant erniedrigte Konzentration von Evans Blue in den Lungen der mit FX06 behandelten Versuchstiere (p=0,0221).

Der Wert der Verumgruppe (n=7) für Evans Blue pro Gramm Leber beträgt 10 Stunden postoperativ 2,208mg (SEM +/- 0,3891). Die Kontrollgruppe (n=6) weist einen Mittelwert von 4,141mg (SEM +/- 0,7548) auf. Statistisch ergibt sich aus diesen Werten kein signifikanter Unterschied (p=0,0513), aber es lässt sich eine Tendenz bezüglich einer verminderten Permeabilität in den Lebern der Verumgrruppe aufzeigen.

Hinsichtlich der Konzentration von Evans Blue in der Milz wurde ein Wert von 5,055mg pro Gramm Milz (SEM +/- 1,31) in der Verumgruppe (n=7) gemessen. Die Kontrollgruppe (n=6) zeigt ein arithmetisches Mittel von 6,111mg (SEM +/- 1,492). Eine statistische Signifikanz ergibt sich aus diesen Daten nicht (p=0,8135).







Abb. 49: Evans Blue (mg) pro Lebergewicht (g), Verum (n=7) vs. Kontrolle (n=6), 10h nach CASP 18G



5. Diskussion

5.1. Allgemein

Die Sepsis bzw. septische Krankheitsverläufe nach viszeralchirurgischen Eingriffen stellen nach wie vor eine große klinische Herausforderung bezüglich einer adäquaten Therapie dar. Trotz der verbesserten perioperativen intensivmedizinischen Versorgung, der Weiterentwicklung der operativen Techniken mit Reduktion von Zugangstraumata und Operationsdauer sowie aller neu entwickelten additiven Therapiewerkzeuge sind die Morbidität und Mortalität der Sepsis weiterhin auf hohem, nicht zu akzeptierendem Niveau. Zudem ist die Inzidenz der Sepsis von Jahr zu Jahr steigend, was zum einen an der demographischen Entwicklung in der westlichen Welt liegt aber zum anderen auch in der Ausweitung und Invasivität der Operationsindikationen begründet ist.

Die bisherigen neuen Therapieansätze, die grundlagenwissenschaftlich erfolgsversprechend waren, sind zumeist in der klinischen Anwendung gescheitert. Die Arbeitsgruppe um Warren L. Lee sprach aus diesem Grunde im Jahre 2011 auch vom sogenannten "Graveyard of Discoveries" bezüglich der Sepsisforschung und forderte, dass es Zeit ist, neue Wege bzw. neue Pathomechanismen in der Sepsisforschung zu beleuchten [130]. Ein Hauptaugenmerk sollte dabei auch auf die Endothelbarriere und ihre Rolle in septischen Prozessen gelegt werden.

Die möglichen Therapiemöglichkeiten verteilen sich dabei auf ganz verschiedene Ansatzpunkte. Prinzipiell lässt sich dabei zwischen nicht-endothelialen und endothelialen Komponenten unterscheiden [69]. Zu den nicht-endothelialen Targets gehören lösliche inflammatorische Mediatoren (z.B. LPS, TNF- α) aber auch Zellen wie Leukozyten oder Thrombozyten. Auf diesem Feld entwickelte Therapieansätze haben jedoch keinen Eingang in die klinische Praxis gefunden, da eigentlich sämtliche Phase-3 Studien gescheitert sind [131-134].

Auf Seiten möglicher endothelialer Therapieansätze sind verschiedene Angriffspunkte beachtenswert. Neben einer anti-apoptotischen oder einer antikoagulatorischen Modulation sind auch eine Beeinflussung der in der Sepsis

60

entstehenden Hyperpermeabilität und überschießenden Endothel-Leukozyten-Interaktion denkbar [69].

Petztelbauer et. al konnten in einem myokardialem Ischämie-Reperfusions-Modell zeigen, dass das vom Fibrin abgespaltete Peptid Bβ15-42 kompetitiv an VE-Cadherin bindet und somit eine Interaktion von neutrophilen Granulozyten und VE-Cadherin verhindert. Im Ergebnis kam es in diesem Versuchsaufbau zu einer signifikant reduzierten Leukozytenmigration und Infarktgröße [125].

Ziel dieser Arbeit war es nun, diese Erkenntnisse in ein Modell der polymikrobiellen Sepsis zu überführen und mögliche Wirkungen und Nebenwirkungen zu untersuchen.

5.2. Auswahl der Methodik

Das Modell der "Colon ascendens Stent Peritonitis" (CASP) ist eine etablierte Methode um den Verlauf einer postoperativen Sepsis durch die Indikation einer kotigen Peritonitis mit nachfolgendem septischen Multiorganversagen nachzustellen. Die Letalität lässt sich in diesem Modell durch die Wahl der implantierten Stentgröße gut steuern und reproduzieren. Im postoperativen Verlauf zeigt sich nicht nur in den infektionsnahen (Peritoneallavage), sondern auch in den fernen Kompartimenten (Leber, Milz, Lunge und Serum) ein sepsistypischer Verlauf von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen. Das CASP-Modell stellt somit ein relativ realitätsnahes Modell dar, das zugleich mit einer hohen klinischen Relevanz einhergeht, da dieses Modell eine postoperative Anastomoseninsuffizienz mit nachfolgendem, generalisiertem septischen Krankheitsverlauf am besten widerspiegelt [135].

Tiermodelle, bei denen LPS intravenös appliziert wird, können den eigentlichen Sepsiskriterien bzw. Definitionen nicht standhalten, da ein kontinuierlicher Infektfokus fehlt. Zudem stellen diese Endotoxin-Modelle eher eine systemische inflammatorische Hyperinflammation dar, deren Letalität sehr hoch ist und es somit zu keiner Ausbildung einer kompensatorischen Immunantwort kommen kann. Das Modell der "Cecal ligation and puncture" (CLP) wurde vor dem CASP-Modell entwickelt und wird somit immer als Konkurrenzmodell angesehen. Auf Grund der schon längeren Anwendung sind dementsprechend die Erfahrungen mit diesem Modell größer [136]. Maier et al. konnten jedoch in einem direkten Vergleich beider Modelle aufzeigen, dass die Bakterienlast und die Zytokinlevel im CLP-Modell zu jedem Zeitpunkt viel niedriger sind als im CASP-Modell. Ursächlich hierfür ist eine Kompartimierung des Infektfokus, die durch Abkapselung mit Hilfe von Dünndarmschlingen erreicht werden kann. Im CASP-Modell dahingegen ist auch noch 24h nach Implantation des Stents eine Stuhlleckage präsent. Das CLP-Modell stellt somit eher ein Krankheitsgeschehen bei einem intraabdominellem Abszeß nach [112].

Jedes der heute verfügbaren experimentellen Tiermodelle zur Erforschung der Pathophysiologie und möglicher therapeutischer Ansätze hat natürlich seine Limitationen und kann nie die gesamte Pathophysiologie und den manchmal langwierigen Krankheitsverlauf bei septischen Prozessen im menschlichen Organismus nachstellen [136-138].

5.3. Das Fibrinspaltprodukt Peptid Bβ15-42

Im Jahre 2005 konnten Petzelbauer et al. sowohl in einem akuten als auch chronischen Myokardischämie-Reperfusions-Modell zeigen, dass es durch die Applikation des Fibrinspaltproduktes Peptid Bβ15-42 (FX06) zu einer geringen Infarktgröße und konsekutiv zu einer verringerten Narbenausbildung kommt. Begründet liegt dieser Effekt in der verminderten bzw. teilweise vollständig blockierten Leukozytenmigration, die wiederum die lokale inflammatorische Reaktion nach Reperfusion signifikant reduziert.

Diese grundlagenwissenschaftlichen Ergebnisse haben in der Zwischenzeit zu einer Phase-III-Studie geführt, die FX06 in der klinischen Anwendung supportiv zur primären perkutanen Koronarangiographie mit Intervention bei myokardialen Ischämien mit ST-Hebung untersucht [139]. Die ersten Ergebnisse zeigten auch in der klinischen Anwendung, dass es zwar zu keiner absoluten Reduktion des infarzierten Areals kam, aber dass eine signifikante Verkleinerung des nekrotisch veränderten Gewebeanteils erreicht werden konnte. Darüber hinaus zeichnete sich in
der mit FX06 behandelten Patientengruppe der Trend auf, dass es postinterventionell zu einer verminderten Inzidenz erneuter schwerwiegender kardiovaskulärer Events kommt [140].

Auf Grundlage dieser hervorragenden Ergebnisse wurde die Anwendung von Bβ15-42 erweitert auf grundlagenwissenschaftliche Modelle der Organtransplantation und des hämorrhagischen Schocks.

In einem Rattenmodell der Herztransplantation konnte durch die Anwendung von FX06 ebenfalls der Ischämie-Reperfusionsschaden des transplantierten Organes abgeschwächt werden durch eine signifikante Reduktion der Leukozytenmigration in das Transplantat. Zudem kam es erneut zu einem signifikant verkleinerten Nekroseareal in der FX06 behandelten Versuchsgruppe. Nebenbefundlich ist hervorzuheben, dass auch die Funktion des Transplantats in Form des Schlagvolumens signifikant verbessert werden konnte [141].

Roesner et al. konnten in zwei verschiedenen Modellen des hämorrhagischen Schocks im Schwein nachweisen, dass auch hier die Applikation von FX06 eine organprotektive Wirkung hat mit dem Ergebnis eines besseren neurologischen Outcomes [142] bzw. einer generell signifikant verbesserten Organfunktion des kardiovaskulären Systems [127].

Neben den positiven Effekten von FX06 in kardiovaskulären Modellen wurde die Wirkung von FX06 jedoch auch in Modellen der systemischen Inflammation bzw. der Sepsis getestet. Hierbei zeigte FX06 eine protektive Wirkung bezüglich der Stabilisierung der endothelialen Barriere im Rahmen einer LPS-induzierten Pneumonie bzw. in der durch die intravenöse Applikation verursachten systemischen Hyperinflammation und beim schwerwiegenden Erkrankungsbild des Dengue-Schocksyndroms. Gröger et al. konnten bei diesen Versuchen gleichzeitig aufzeigen, dass die Wirkung von FX06 wahrscheinlich nicht alleine durch die Bindung an VE-Cadherin mit nachfolgender Rac1-Aktivierung vermittelt wird, sondern dass die Thyrosinkinase Fyn aus der Src-Kinasefamilie, die in den nachgeschalteten Signalwegen von VE-Cadherin vorkommt, eine mitentscheidende Rolle hat [126].

In unserer Arbeit konnten wir nun zeigen, dass FX06 auch in einem murinen Modell der polymikrobiellen Sepsis einen positiven Einfluss hat wie man anhand der Überlebenskinetik erkennen kann. Die mit FX06 behandelten Tiere zeigten ein hochsignifikant verbessertes Überleben nach CASP induzierter polymikrobieller Sepsis. Die Letalität der CASP-Methode ist wie bei der humanen Sepsis in der Entstehung eines Capillary Leakage Syndroms mit nachfolgendem letalen Multiorganversagen begründet. FX06 wurde sofort nach Durchführung der Operation intramuskulär appliziert, sprich noch weit vor Manifestation einer systemischen inflammatorischen Reaktion. Es handelte sich hier also um eine präventive Applikation des Agens. Dies ist sicherlich kritisch zu hinterfragen vor dem Hintergrund einer möglichen klinischen Anwendbarkeit. Die Anastomoseninsuffizienz in der kolorektalen Chirurgie, als gefürchtete Komplikation und konsekutive Sepsisursache, beträgt laut Literatur bis zu 15% [143-145]. Das würde im Umkehrschluss bedeuten, dass man mehr als 80% der operierten Patienten unnötigerweise mit einem Medikament behandeln würde. Auf der anderen Seite ist mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau die Wirksamkeit von FX06 nicht belegbar, wenn die erste Applikation erst nach der Diagnose einer manifesten Sepsis erfolgt.

5.4. Messung der Gefäßpermeabilität

Zur Bestimmung des Schweregrades einer möglichen gestörten Endothelbarriere wurde die Evans Blue Methode angewendet. Durch die Bindung des Farbstoffes an Plasmaproteine, die bei einem möglichen Capillary Leakage Syndrom von intra- nach extravasal austreten können, ist eine indirekte Aussage über das Ausmaß der Endothelbarrierestörung möglich.

In der durchgeführten Versuchsreihe zeigte sich eine signifikant höhere Anreicherung des Farbstoffes in den Lungenpräparaten der Kontrollgruppe im Vergleich zu den mit FX06 behandelten Tieren. In den weiteren untersuchten Organen Leber und Milz deutet sich zumindest bei den Leberpräparaten ein deutlicher Trend zu einer ebenfalls erhöhten endothelialen Permeabilität bei den mit NaCI behandelten Tieren an.

Ausgehend von den heute bekannten möglichen pathophysiologischen Mechanismen bei der abdominellen Sepsis mit einer Aktivierung von Leukozyten im

Darm-assozierten lymphatischen Gewebe und einer daraus resultierenden massiven Zytokinproduktion, die durch den Weitertransport über den Ductus thoracicus die pulmonale Mikrozirkulation beeinträchtigt, erscheinen die hier aufgezeigten Ergebnisse im Gesamtkontext schlüssig.

Bisher ist die hier aufgeführte Arbeit die einzige, die den Einfluss von FX06 auf die Gefäßpermeabilität in einem Modell der polymikrobiellen Sepsis untersucht. Es liegen somit keine Vergleichsdaten aus der Literatur vor. Einzig eine Arbeit aus dem Jahr 2012 von Jennewein et al. testet FX06 im Modell der CLP. Hier zeigt sich eine signifikante Reduktion der pulmonalen Leukozytenmigration, was als indirektes Zeichen einer Protektion der endothelialen Barriere durch FX06 im inflammatorischen Geschehen zu werten ist [146].

Durch die Stabilisierung der endothelialen Barriere werden konsekutiv die Mikrozirkulation und damit die Versorgung jedes einzelnen Organes verbessert. Das durch die systemische Hyperinflammation ausgelöste Capillary leakage Syndrom wird abgeschwächt und somit auch die Entstehung eines Multiorganversagens verhindert [147].

Im Endeffekt resultiert aus dieser Systematik ein verbessertes Überleben, wie in der Überlebenskinetik eindrücklich dargestellt werden konnte.

Warum die Gefäßpermeabilität nur in den Lungenpräparaten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen aufweist und nicht auch in Leber und Milz bleibt zu diskutieren. Bei den Leberpräparaten zeigt sich zumindest ein deutlicher Effekt für eine verbesserte Endothelfunktion in den mit FX06 behandelten Tieren. Hier ist davon auszugehen, dass sich dieser Effekt auch signifikant zeigen würde bei einer Erweiterung der Gruppengröße.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre, dass der Zeitpunkt der Untersuchung nach Induktion des septischen Stimulus zu früh gewählt wurde und somit die Mikrozirkulation in der Milz noch gar nicht beeinträchtigt wurde.

Auf der anderen Seite spielt die Milz im klinischen Alltag von septischen Krankheitsbildern keine allzu große Rolle, sondern die führenden Organsysteme sind die Lunge sowie Leber und Niere.

5.5. Bakteriologie

Um einen möglichen Einfluss von FX06 auf das Wachstum und die Verteilung von Bakterien als Infektionserreger zu untersuchen, erfolgte die postoperative Organentnahme bzw. Probengewinnung um das Wachstum in den einzelnen abdominellen Kompartimenten nachvollziehen zu können.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass es in der Verteilung und in der Quantität der Bakterienkolonien keine signifikanten Unterschiede gibt, sondern dass die Ergebnisse sehr dicht beieinander liegen. Daraus lässt sich zum einen ableiten, dass FX06 keinen Einfluss auf das Bakterienwachstum und auf eine mögliche Kompartimentierung hat. Des weiteren zeigen die Ergebnisse, dass die infektiologische Belastung in beiden Versuchsgruppen gleich hoch war und die aufgezeigte erhöhte Letalität in der Kontrollgruppe nicht durch eine schwerwiegendere Sepsis begründet ist, sondern durch den Einfluss von FX06 und seinen barriereprotektiven Effekt.

In vergleichbaren Studien zur Methodik der CASP wie z.B. bei Maier et al. [112] ist die bakterielle Belastung in den einzelnen Kompartimenten höher, was aber auch an der Verwendung eines größeren Stentdurchmessers zur Induktion der polymikrobiellen Peritonitis liegen könnte. Trotzdem reicht die in dieser Versuchsreihe erreichte bakterielle Belastung aus, um ohne eine adäguate Therapie bzw. Intervention eine hohe Letalität zu erreichen auf Grund eines schwerwiegenden septischen Krankheitsbildes.

5.6. Beeinflussung des Zytokinprofils in der Sepsis durch FX06

Durch einen inflammatorischen Stimulus werden verschiedenste Signalkaskaden aktiviert, die schlussendlich zu einer systemischen Reaktion führen. In diesen Signalkaskaden spielen Zytokine und Chemokine eine entscheidende Rolle mit proaber auch antiinflammatorischen Eigenschaften. Eines der bekanntesten proinflammatorischen Zytokine ist sicherlich TNF-α, welches jahrelang auch als das "zentrale" Zytokin in der Pathogenese von septischen Krankheitsbildern angesehen wurde. Aus diesem Grunde wurde in der Vergangenheit immer wieder versucht, Antikörper gegen Zytokine zu entwickeln um Signalwege abzuschwächen bzw. zu stoppen. Dieser Ansatzweg zeigte sich jedoch in der klinischen Anwendung alles andere als erfolgsversprechend. Vielmehr kam es zu einer höheren Morbidität und Letalität in den mit Antikörper behandelten Versuchsgruppen, so dass dieser therapeutische Ansatz wieder verlassen wurde.

Die Bestimmung von Zytokinen hat im grundlagenwissenschaftlichen Setup jedoch nach wie vor seine Bedeutung in der Bewertung von stattfindenden immunologischen Prozessen und möglichen immunomodulatorischen Eigenschaften in der Testung von pharmakologischen Substanzen.

Die hier durchgeführte Bestimmung von verschiedenen pro- als auch antiinflammatorischen Zytokinen sowie von Chemokinen hatte die Absicht aufzuzeigen, ob FX06 bei einer intramuskulären Applikation immunomodulatorische Eigenschaften aufweist. Dazu wurden nicht nur die Zytokin- und Chemokinlevel im Serum sondern auch in ausgesuchten einzelnen Organen untersucht.

Umfassend kann man festhalten, dass sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen darstellen lassen. Vor allem die beiden wichtigen proinflammatorischen Zytokine TNF-α und Interleukin-6 zeigen eigentlich keine nennenswerten Unterschiede im Serum auf. Dies spricht für eine gleichmäßige Aktivierung von immunkompetenten Zellen in beiden Versuchsgruppen. Ein gleiches Bild zeichnet sich auch in der Untersuchung der Lunge und Niere. Daraus lässt sich allgemein schlussfolgern, dass FX06 keine immunomodulatorischen Eigenschaften zu haben scheint.

Dem gegenüber steht jedoch eine Arbeit von Jennewein et al. [146], wo sich unter FX06 Applikation eine signifikant reduzierte Expression von proinflammtorischen Zytokinen in der Leber und auch signifikant reduzierte Plasmalevel nachweisen lassen. In dieser Studie wurde eine modifizierte Form der "Coecum Ligature and Punction"-Methode zur Sepsisinduktion verwendet. An dieser Stelle kann, wie eingangs erwähnt, darüber diskutiert werden, welche Wertigkeit die CLP-Methode als polymikrobielles Sepsismodell hat. Viel wichtiger ist jedoch, dass die Autoren kein funktionelles Korrelat bzw. keinen Signalweg darlegen konnten, der die immunmodulatorischen Eigenschaften erklärt.

Aus diesem Grund argumentieren die Autoren, dass die abgeschwächte proinflammtorische Antwort in den mit FX06 behandelten Tieren doch am ehesten durch die Stabilisierung der endothelialen Barriere zu Stande kommt.

Trotzdem bleibt offen, warum Jennewein et al. im Gegensatz zu den hier vorliegenden Daten signifikante Unterschiede nachweisen konnten. Eine Erklärung könnten die unterschiedlichen Applikationsweisen darstellen. Auf der einen Seite die intramuskuläre Bolusgabe und auf der anderen Seite zum einen eine intravenöse Bolusgabe bzw. eine kontinuierliche intraperitoneale Applikation. Vielleicht wird dadurch eine höhere systemische Konzentration des Agens erreicht, wodurch der Effekt der Barrierestabilisierung noch weiter verstärkt wird und mögliche weitere Effektmechanismen in den Vordergrund rücken. Dies bleibt bis zum jetzigen Zeitpunkt aber nur Spekulation und bedarf somit noch einer weiteren grundlagenwissenschaftlichen Aufarbeitung.

5.7. Organtoxizität von FX06

Bei der Testung von neuen möglichen therapeutischen Agenzien gehört auch die Bestimmung von möglichen toxischen Effekten dazu. In der hier vorliegenden Arbeit wurden dazu zum einen die hepatischen Transaminasen und zum anderen Kreatinin und das Protein S-100 betrachtet.

Die Transaminasen Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Alanin-Aminotransferase (ALAT) waren tendenziell in den FX06 behandelten Tieren leicht erhöht. Dieser Unterschied ist jedoch als marginal zu betrachten und erlaubt keine klinischen Rückschlüsse bezüglich einer möglichen hepatischen Toxizität von FX06.

Ein etwas anderes Bild stellt sich jedoch bei der Kreatininbestimmung dar. Hier zeigen die Tiere, die nur das Placebo appliziert bekommen haben, einen fast doppelt so hohen Wert als die mit FX06 behandelten Tiere. Ein Signifikanzniveau wird hierbei jedoch nicht erreicht, was an der bestehenden Varianz von bis zu ±2,3µmol/l liegen könnte. Es lässt sich aber vorsichtig ableiten, dass bei den mit Placebo behandelten Tieren schon eine septische Nephropathie eingesetzt hat, die zu einer verminderten Kreatinin-Clearance und somit konsekutiv zu einem erhöhten Serumkreatininwert geführt hat. Eine Erklärung für die verbesserte Nierenfunktion unter FX06 könnte

wiederum die verbesserte Mikrozirkulation im Endorgan sein, was eine verbesserte Perfusion der Niere und somit eine verbesserte Organfunktion zur Folge hat. Auf alle Fälle lässt sich aber auch hier eine nephrotoxische Wirkung von FX06 ausschließen.

Das Protein S-100 ist ein eher unspezifischer Marker für verschiedenste zelluläre Prozesse. Unter anderem ist S-100 erhöht bei inflammatorischen Vorgängen, aber auch bei apoptotischen Prozessen [148]. Die Aussagekraft ist daher nur eingeschränkt. Im Vergleich der beiden Versuchsgruppen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede bei sehr eng beieinander liegenden Werten.

Es lässt sich also abschließend festhalten, dass FX06 weder hepato- noch nephrotoxisch zu sein scheint. Die deutlich niedrigeren Serumkreatininwerte in der mit FX06 behandelten Gruppe sind am wahrscheinlichsten auf die verbesserte Mikrozirkulation zurückzuführen.

5.8. Klinische Bedeutung

Die Sepsis ist nach wie vor ein tägliches Problem in der klinisches Praxis, was sämtliche Fachdisziplinen vor große Herausforderungen und Rätsel stellt. Dabei muss man leider festhalten, dass es in der kausalen Therapie der Sepsis in den letzten Jahren keine große Weiterentwicklung gab, bis auf die Entwicklung noch schonenderer Verfahren zur Fokussanierung und die Etablierung neuer Breitspektrum-Antibiotika. Auf der anderen Seite kommt es jedoch Jahr für Jahr zu einem Anstieg von multiresistenten Keimen bzw. zur Etablierung neuer Pathogene, die auf bestimmte Antibiotikatherapien nicht mehr sensibel reagieren.

Die grundlagenwissenschaftliche Forschung auf dem Gebiet der Sepsis hat zwar zu neuen Erkenntnissen in Bezug auf pathophysiologische Mechanismen geführt, eine Darlegung oder gar eine erfolgreiche Entwicklung von therapeutischen Agenzien konnte jedoch nicht erreicht werden. Aus diesem Grunde spricht Warren L. Lee nicht umsonst von "einem Friedhof der Entdeckungen", wenn er über den Stand möglicher therapeutischer Ansätze in der Sepsis spricht.

Es ist wahrscheinlich unnötig zu erwähnen, dass eine alleinige Reduktion septischer Krankheitsbilder durch eine Verhinderung des auslösenden Stimulus zu erreichen wäre. Die Vielzahl der möglichen Stimuli lässt dies nicht zu. Nach unserem heutigen Wissensstand müssen wir davon ausgehen, dass die Endstrecke der septischen Krankheitsbilder die endotheliale Schädigung mit konsekutiver Mikrozirkulationsstörung und nachfolgendem Organversagen darstellt. In der Entstehung dieses Capillary Leaks bzw. im Zusammenspiel der Interaktionspartner von Seiten des Immunsystems mit dem Endothel könnte ein neuer und ganz entscheidender Therapieansatz stecken.

Genau in diesem Feld entwickelt FX06 seine Wirkung, indem es zu einer verminderten Leukozytenmigration und zu einer Endothelstabilisierung führt wie in der hier vorliegenden Arbeit gezeigt.

Dass die Stabilisierung der Endothelbarriere einen positiven Einfluss auf das Outcome in der LPS-induzierten Hyperinflammation hat, konnte Schick et al. auch durch die Applikation des Phosphodiesterase-4-Inhibitors Rolipram zeigen. Durch die Applikation von Rolipram kam es zu einem intrazellulären Anstieg der cAMP-Konzentration, was wiederum einen positiven Einfluss auf die Junktionsproteine hat [147, 149, 150].

Bei der Verwendung von FX06 in der Sepsis ist sicherlich noch eine weitere Validierung der ersten rudimentären Daten von Nöten. Dazu gehören natürlich auch eine genauere Dosis-Findungskurve und die Etablierung eines Applikationsweges. In der hier vorliegenden Arbeit wurde FX06 intermittierend intramuskulär appliziert. Die oben genannte Arbeit von Jennewein et al. hat dagegen einen intraperitonealen Weg und einen intravenösen Zugangsweg gewählt.

Kritisch anzumerken ist zudem, dass in den beiden Studien eine Applikation sofort bzw. relativ zeitnah nach Induktion einer Sepsis erfolgt ist. Eine Translation in die klinische Praxis ist an diesem Punkt natürlich schwierig, da nicht jeder Patient, der z.B. eine mögliche septische Komplikation nach einem operativen Eingriff ausbilden könnte, prophylaktisch mit FX06 behandelt werden kann. Es stellt sich aus diesem Grunde die Aufgabe, die Wirkung von FX06 zu eruieren, wenn sich ein septisches Krankheitsbild klinisch schon manifestiert hat.

5.9. Kritik und Einschränkungen

Im vorangegangenen Absatz wurden bezüglich der Anwendung von FX06 schon die Grenzen der hier erhobenen Daten und die daraus resultierenden notwendigen wissenschaftlichen Anstrengungen für die Zukunft formuliert.

Insgesamt muss man festhalten, dass jegliche grundlagenwissenschaftliche Arbeit auf dem Gebiet der Sepsis angreifbar ist, da es enorm schwierig ist, ein Sepsismodell zu finden, das dem klinischen Verlauf im Menschen nahe kommt und gleichzeitig eine gute Reproduzierbarkeit aufweist. Der Vorteil der hier verwendeten große CASP-Methode sicherlich ist die relativ Nähe zur Klinik der Anastomoseninsuffizienz mit konsekutiver Peritonitis und Ausbildung eines septischen Krankheitsbildes. Zum anderen ist die Reproduzierbarkeit eingeschränkt, da es interindividuelle Unterschiede zwischen den Tieren gibt bzgl. der Quantität des infektiologischen Stimulus.

Die verwendete Evans-blue Methode zur Charakterisierung einer möglichen Permeabilitätsstörung ist eine in der Literatur etablierte Methodik. Interessant wäre es sicherlich, die Mikrozirkulation in Echtzeit an postkapillaren Venulen zu beobachten mit Hilfe der Intravitalmikroskopie. In der Grundlagenforschung wird dafür häufig die intestinale Mikrozirkulation verwendet mit der Einschränkung, dass dazu Ratten verwendet werden. Bei Mäusen sind nämlich die mesenterialen postkapillären Venulen nur sehr schlecht bis gar nicht darstellbar. Aus diesem Grunde wurde in der hier vorliegenden Arbeit auf die Intravitalmikroskopie verzichtet.

6. Zusammenfassung

Die Sepsis ist eine in der Öffentlichkeit zumeist unbekannte Erkrankung, trotz der äußerst hohen Wichtigkeit im klinischen Alltag [151]. Sie stellt nach wie vor die häufigste Todesursache auf nicht kardiologischen Intensivstationen dar, wobei die Inzidenz jährlich weiter ansteigt. Die Gründe für die steigende Inzidenz und die persistierend hohe Letalität sind zum einen, wie im gesamten Gesundheitssektor, die Altersstruktur der westlichen Bevölkerung und zum anderen die medizinischtechnischen Möglichkeiten auch Patienten im weit fortgeschrittenem Alter in kurativer Intention zu therapieren mit der Gefahr von höheren Morbiditäts- und Letalitätsraten.

Ein weiterer Fakt ist zudem sicherlich, dass es in den Therapieoptionen der Sepsis keine wirklichen Fortschritte gab. Die Sepsisforschung hat es geschafft, immer neuere pathophysiologische Mechanismen aufzuzeigen, so dass die Komplexität schon fast zur Verzweiflung geführt hat. Mögliche Therapieansätze, die in vitro und in Tiermodellen erfolgsversprechend waren, sind zumeist in klinischen Studien gescheitert.

Aus diesem Grunde bleiben zum heutigen Zeitpunkt dem klinisch tätigen Arzt nur zwei kausale Therapiestrategien übrig. Zum einen die Fokussanierung, wenn denn der Fokus diagnostizierbar ist, und zum anderen die antibiotische, antivirale bzw. antifungale medikamentöse Therapie. Alle weiteren intensivmedizinischen Bemühungen lassen sich unter dem Gesichtspunkt einer supportiven und additiven Therapie subsumieren. Dazu gehört auch das hämodynamische Management, obwohl man über die Jahre immer wieder festgestellt hat, dass es auf der Endstrecke der Sepsis zu einem Multiorganversagen auf Grund einer mangelhaften Organperfusion kommt.

Ursächlich hierfür ist das sogenannte Capillary Leakage, das vor allem an postkapillären Venulen entsteht. Die aktuell verfügbaren hämodynamisch wirksamen Medikamente (z.B. Noradrenalin, Adrenalin, Dobutamin, Vasopressin) haben jedoch auf dieses Capillary Leakage keinen Einfluss.

Die Therapie des Capillary Leakage ist natürlich definitionsgemäß keine kausale Therapie der Sepsis, weil der auslösende Stimulus nicht das Ziel ist, sondern die Endstrecke der durch den Stimulus aktivierten pathophysiologischen Prozesse der Sepsis. Dass dieser neue Therapieansatz zur Stabilisierung der endothelialen Barriere sinnvoll sein kann, konnte nicht nur in der hier vorliegenden Arbeit aufgezeigt werden, sondern auch durch andere Arbeitsgruppen [146, 147].

Der Wirkmechanismus von FX06, der zur Stabilisierung der Endothelbarriere führt muss sicherlich noch einmal genau evaluiert werden, genauso wie die Klärung der bestmöglichen Applikationsform bzw. -weges.

Es bleibt aber festzuhalten, dass FX06 ein Agenz ist, das die Endothelbarriere zu stabilisieren scheint und dadurch die Entstehung eines Capillary Leakage abschwächt werden kann. Schlussendlich führt dies zu einem Überlebensvorteil im murinen polymikrobiellen Sepsismodell. Dieser Erkenntnis gilt es jetzt in weiteren wissenschaftlichen Anstrengungen nachzugehen, um vielleicht eine Translation in den klinischen Alltag zu schaffen.

7. Literaturverzeichnis

- 1. Levy, M.M., et al., 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med, 2003. **31**(4): p. 1250-6.
- 2. Moerer, O. and M. Quintel, *[Sepsis in adult patients definitions, epidemiology and economic aspects].* Internist (Berl), 2009. **50**(7): p. 788, 790-4, 796-8.
- Beale, R., et al., Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. Infection, 2009.
 37(3): p. 222-32.
- 4. Martin, G.S., et al., *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.* N Engl J Med, 2003. **348**(16): p. 1546-54.
- 5. Angus, D.C., et al., *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care.* Crit Care Med, 2001. **29**(7): p. 1303-10.
- 6. Engel, C., et al., *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study.* Intensive Care Med, 2007. **33**(4): p. 606-18.
- 7. Alberti, C., et al., *Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients.* Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(1): p. 77-84.
- 8. Esper, A. and G.S. Martin, *Is severe sepsis increasing in incidence AND severity?* Crit Care Med, 2007. **35**(5): p. 1414-5.
- 9. Yende, S. and D.C. Angus, *Long-term outcomes from sepsis.* Curr Infect Dis Rep, 2007. **9**(5): p. 382-6.
- 10. Ibrahim, I., *It is time to label sepsis as a public health problem.* J Crit Care, 2008. **23**(4): p. 452-3.
- 11. Heyland, D.K., et al., *Long-term health-related quality of life in survivors of sepsis. Short Form 36: a valid and reliable measure of health-related quality of life.* Crit Care Med, 2000. **28**(11): p. 3599-605.
- 12. Reinhart, K., et al., [Diagnosis and therapy of sepsis. Guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine]. Internist (Berl), 2006. **47**(4): p. 356, 358-60, 362-8, passim.
- 13. Budelmann, G., *[Hugo Schottmuller, 1867-1936. The problem of sepsis].* Internist (Berl), 1969. **10**(3): p. 92-101.
- 14. Bone, R.C., W.J. Sibbald, and C.L. Sprung, *The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure.* Chest, 1992. **101**(6): p. 1481-3.
- 15. Bone, R.C., et al., *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine.* Chest, 1992. **101**(6): p. 1644-55.
- 16. Horner, C., et al., *[Role of the innate immune response in sepsis].* Anaesthesist, 2004. **53**(1): p. 10-28.
- 17. Boontham, P., et al., *Surgical sepsis: dysregulation of immune function and therapeutic implications.* Surgeon, 2003. **1**(4): p. 187-206.
- 18. Schütt, C. and B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*. Vol. 1. Auflage. 2006, München: Elsevier Spektrum Akademischer Verlag.

- 19. Rittirsch, D., M.A. Flierl, and P.A. Ward, *Harmful molecular mechanisms in sepsis.* Nat Rev Immunol, 2008. **8**(10): p. 776-87.
- 20. Turner, J.R., *Intestinal mucosal barrier function in health and disease.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 799-809.
- 21. Ward, P.A., *The dark side of C5a in sepsis.* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(2): p. 133-42.
- 22. Goldfarb, R.D. and J.E. Parrillo, *Complement.* Crit Care Med, 2005. **33**(12 Suppl): p. S482-4.
- 23. Huber-Lang, M.S., et al., *Complement-induced impairment of innate immunity during sepsis.* J Immunol, 2002. **169**(6): p. 3223-31.
- 24. Erdei, A., K. Kerekes, and I. Pecht, *Role of C3a and C5a in the activation of mast cells.* Exp Clin Immunogenet, 1997. **14**(1): p. 16-8.
- 25. del Balzo, U., M.J. Polley, and R. Levi, C3a-induced contraction of guinea pig ileum consists of two components: fast histamine-mediated and slow prostanoid-mediated. J Pharmacol Exp Ther, 1989. **248**(3): p. 1003-9.
- 26. Kildsgaard, J., et al., *Cutting edge: targeted disruption of the C3a receptor gene demonstrates a novel protective anti-inflammatory role for C3a in endotoxin-shock.* J Immunol, 2000. **165**(10): p. 5406-9.
- 27. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis.* Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-91.
- 28. Hauber, H.P. and P. Zabel, *[Pathophysiology and pathogens of sepsis]*. Internist (Berl), 2009. **50**(7): p. 779-80, 782-4, 786-7.
- 29. Castellheim, A., et al., *Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis.* Scand J Immunol, 2009. **69**(6): p. 479-91.
- 30. Bianchi, M.E., *DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger.* J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 1-5.
- 31. Cavaillon, J.M. and M. Adib-Conquy, *Monocytes/macrophages and sepsis*. Crit Care Med, 2005. **33**(12 Suppl): p. S506-9.
- 32. Brown, K.A., et al., *Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis.* Lancet, 2006. **368**(9530): p. 157-69.
- 33. Takeda, K., T. Kaisho, and S. Akira, *Toll-like receptors.* Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 335-76.
- 34. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.* Nature, 1997. **388**(6640): p. 394-7.
- 35. Bone, R.C., *Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome* (*SIRS*). Journal of Endotoxin Research, 1995. **2**(3): p. 151-155.
- 36. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L.L. Moldawer, *Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity.* Shock, 2001. **16**(2): p. 83-96.
- 37. Satthaporn, S. and O. Eremin, *Dendritic cells (I): Biological functions.* J R Coll Surg Edinb, 2001. **46**(1): p. 9-19.
- 38. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 767-811.
- 39. Hoebe, K., E. Janssen, and B. Beutler, *The interface between innate and adaptive immunity.* Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 971-4.
- 40. Hsieh, C.S., et al., *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages.* Science, 1993. **260**(5107): p. 547-9.

- 41. Zhu, J. and W.E. Paul, *CD4 T cells: fates, functions, and faults.* Blood, 2008. **112**(5): p. 1557-69.
- 42. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *Antigen-specific memory B cell development.* Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 487-513.
- 43. Tarlinton, D., *B-cell memory: are subsets necessary?* Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 785-90.
- 44. LeBien, T.W. and T.F. Tedder, *B lymphocytes: how they develop and function.* Blood, 2008. **112**(5): p. 1570-80.
- 45. Ho, F., et al., *Distinct short-lived and long-lived antibody-producing cell populations.* Eur J Immunol, 1986. **16**(10): p. 1297-301.
- 46. Hotchkiss, R.S. and I.E. Karl, *The pathophysiology and treatment of sepsis.* N Engl J Med, 2003. **348**(2): p. 138-50.
- 47. Bone, R.C., C.J. Grodzin, and R.A. Balk, *Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process.* Chest, 1997. **112**(1): p. 235-43.
- 48. Lederer, J.A., M.L. Rodrick, and J.A. Mannick, *The effects of injury on the adaptive immune response.* Shock, 1999. **11**(3): p. 153-9.
- 49. Adib-Conquy, M. and J.M. Cavaillon, *Compensatory anti-inflammatory response syndrome*. Thromb Haemost, 2009. **101**(1): p. 36-47.
- 50. Werdan, K., Pathophysiology of septic shock and multiple organ dysfunction syndrome and various therapeutic approaches with special emphasis on immunoglobulins. Ther Apher, 2001. **5**(2): p. 115-22.
- 51. Blackwell, T.S. and J.W. Christman, *Sepsis and cytokines: current status.* Br J Anaesth, 1996. **77**(1): p. 110-7.
- 52. Paterson, R.L. and N.R. Webster, *Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome.* J R Coll Surg Edinb, 2000. **45**(3): p. 178-82.
- 53. Shimaoka, M. and E.J. Park, *Advances in understanding sepsis.* Eur J Anaesthesiol Suppl, 2008. **42**: p. 146-53.
- 54. Marshall, J.C., *Neutrophils in the pathogenesis of sepsis.* Crit Care Med, 2005. **33**(12 Suppl): p. S502-5.
- 55. Abraham, E. and M. Singer, *Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction*. Crit Care Med, 2007. **35**(10): p. 2408-16.
- 56. Cavaillon, J.M., et al., *Immunodepression in sepsis and SIRS assessed by ex vivo cytokine production is not a generalized phenomenon: a review.* J Endotoxin Res, 2001. **7**(2): p. 85-93.
- 57. Fischer, E., et al., Interleukin-1 receptor antagonist circulates in experimental inflammation and in human disease. Blood, 1992. **79**(9): p. 2196-200.
- 58. Girardin, E., et al., Imbalance between tumour necrosis factor-alpha and soluble TNF receptor concentrations in severe meningococcaemia. The J5 Study Group. Immunology, 1992. **76**(1): p. 20-3.
- 59. Marchant, A., et al., *Interleukin-10 production during septicaemia.* Lancet, 1994. **343**(8899): p. 707-8.
- 60. Munford, R.S. and J. Pugin, *Normal responses to injury prevent systemic inflammation and can be immunosuppressive.* Am J Respir Crit Care Med, 2001. **163**(2): p. 316-21.
- 61. Opal, S.M. and V.A. DePalo, *Anti-inflammatory cytokines.* Chest, 2000. **117**(4): p. 1162-72.
- 62. Green, D.R. and H.M. Beere, *Apoptosis. Gone but not forgotten.* Nature, 2000. **405**(6782): p. 28-9.

- 63. Hotchkiss, R.S., et al., *Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction.* Crit Care Med, 1999. **27**(7): p. 1230-51.
- 64. Hotchkiss, R.S., et al., *Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(25): p. 14541-6.
- 65. Hotchkiss, R.S., et al., *Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis.* J Immunol, 2002. **168**(5): p. 2493-500.
- 66. Hotchkiss, R.S., et al., *Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans.* J Immunol, 2001. **166**(11): p. 6952-63.
- 67. Venet, F., et al., Increased circulating regulatory T cells (CD4(+)CD25 (+)CD127 (-)) contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. Intensive Care Med, 2009. **35**(4): p. 678-86.
- 68. Venet, F., et al., *Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes.* Crit Care Med, 2004. **32**(11): p. 2329-31.
- 69. Aird, W.C., *The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome.* Blood, 2003. **101**(10): p. 3765-77.
- 70. Aird, W.C., *Endothelium as a therapeutic target in sepsis.* Curr Drug Targets, 2007. **8**(4): p. 501-7.
- 71. Bernard, G.R., et al., *Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis.* N Engl J Med, 2001. **344**(10): p. 699-709.
- 72. Levi, M., E. de Jonge, and T. van der Poll, *New treatment strategies for disseminated intravascular coagulation based on current understanding of the pathophysiology.* Ann Med, 2004. **36**(1): p. 41-9.
- 73. Rudiger, A., M. Stotz, and M. Singer, *Cellular processes in sepsis.* Swiss Med Wkly, 2008. **138**(43-44): p. 629-34.
- 74. Kollef, M.H. and D.P. Schuster, *The acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 1995. **332**(1): p. 27-37.
- 75. Carrico, C.J., et al., *Multiple-organ-failure syndrome.* Arch Surg, 1986. **121**(2): p. 196-208.
- Marshall, J.C., N.V. Christou, and J.L. Meakins, *The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure.* Ann Surg, 1993. **218**(2): p. 111-9.
- 77. Wolochow, H., G.J. Hildebrand, and C. Lamanna, *Translocation of microorganisms across the intestinal wall of the rat: effect of microbial size and concentration.* J Infect Dis, 1966. **116**(4): p. 523-8.
- 78. Alexander, J.W., et al., *The process of microbial translocation.* Ann Surg, 1990. **212**(4): p. 496-510; discussion 511-2.
- 79. Baker, J.W., et al., *Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut.* J Trauma, 1988. **28**(7): p. 896-906.
- 80. Deitch, E.A., *Bacterial translocation of the gut flora.* J Trauma, 1990. **30**(12 Suppl): p. S184-9.
- 81. Deitch, E.A., *The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure.* Arch Surg, 1990. **125**(3): p. 403-4.
- 82. van der Waaij, D., J.M. Berghuis-de Vries, and L.-v. Lekkerkerk, *Colonization resistance of the digestive tract in conventional and antibiotic-treated mice.* J Hyg (Lond), 1971. **69**(3): p. 405-11.

- 83. Banwell, J.G., et al., *Intestinal microbial flora after feeding phytohemagglutinin lectins (Phaseolus vulgaris) to rats.* Appl Environ Microbiol, 1985. **50**(1): p. 68-80.
- 84. Emmanuilidis, K., et al., *Critical role of Kupffer cell-derived IL-10 for host defense in septic peritonitis.* J Immunol, 2001. **167**(7): p. 3919-27.
- 85. Van Leeuwen, P.A., et al., *Clinical significance of translocation.* Gut, 1994. **35**(1 Suppl): p. S28-34.
- 86. Biffl, W.L. and E.E. Moore, *Splanchnic ischaemia/reperfusion and multiple organ failure.* Br J Anaesth, 1996. **77**(1): p. 59-70.
- 87. Deitch, E.A., *Role of the gut lymphatic system in multiple organ failure.* Curr Opin Crit Care, 2001. **7**(2): p. 92-8.
- 88. Rombeau, J.L. and J. Takala, *Summary of round table conference: gut dysfunction in critical illness.* Intensive Care Med, 1997. **23**(4): p. 476-9.
- 89. Swank, G.M. and E.A. Deitch, *Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes.* World J Surg, 1996. **20**(4): p. 411-7.
- 90. Deitch, E.A., *Gut-origin sepsis: evolution of a concept.* Surgeon, 2012. **10**(6): p. 350-6.
- 91. Deitch, E.A., et al., *Evidence favoring the role of the gut as a cytokinegenerating organ in rats subjected to hemorrhagic shock.* Shock, 1994. **1**(2): p. 141-5.
- 92. Magnotti, L.J., et al., *Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock.* Ann Surg, 1998. **228**(4): p. 518-27.
- 93. Maier, S., et al., *[Special aspects of abdominal sepsis].* Chirurg, 2005. **76**(9): p. 829-36.
- 94. Berger, D. and K. Buttenschoen, *Management of abdominal sepsis.* Langenbecks Arch Surg, 1998. **383**(1): p. 35-43.
- 95. Marshall, J.C. and M. Innes, *Intensive care unit management of intra-abdominal infection.* Crit Care Med, 2003. **31**(8): p. 2228-37.
- 96. Marshall, J.C., et al., *Source control in the management of severe sepsis and septic shock: an evidence-based review.* Crit Care Med, 2004. **32**(11 Suppl): p. S513-26.
- 97. Caille, V., et al., *Histocompatibility leukocyte antigen-D related expression is specifically altered and predicts mortality in septic shock but not in other causes of shock.* Shock, 2004. **22**(6): p. 521-6.
- 98. Tschoeke, S.K. and L.L. Moldawer, *Human leukocyte antigen expression in sepsis: what have we learned?* Crit Care Med, 2005. **33**(1): p. 236-7.
- 99. Ertel, W., et al., *Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients.* Blood, 1995. **85**(5): p. 1341-7.
- 100. Tschaikowsky, K., et al., Coincidence of pro- and anti-inflammatory responses in the early phase of severe sepsis: Longitudinal study of mononuclear histocompatibility leukocyte antigen-DR expression, procalcitonin, C-reactive protein, and changes in T-cell subsets in septic and postoperative patients. Crit Care Med, 2002. **30**(5): p. 1015-23.
- 101. Volk, H.D., et al., *Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis.* Intensive Care Med, 1996. **22 Suppl 4**: p. S474-81.
- 102. Heidecke, C.D., et al., *Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection.* Am J Surg, 1999. **178**(4): p. 288-92.

- 103. Heidecke, C.D., et al., [Immune paralysis of T-lymphocytes and monocytes in postoperative abdominal sepsis. Correlation of immune function with survival]. Chirurg, 2000. **71**(2): p. 159-65.
- 104. Hensler, T., et al., *Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery.* Infect Immun, 1997. **65**(6): p. 2283-91.
- 105. Hensler, T., et al., *Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production.* J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2655-9.
- 106. O'Sullivan, S.T., et al., *Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection.* Ann Surg, 1995. **222**(4): p. 482-90; discussion 490-2.
- 107. Weighardt, H., et al., Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production. Surgery, 2000. **127**(3): p. 309-15.
- 108. Fink, M.P. and S.O. Heard, *Laboratory models of sepsis and septic shock.* J Surg Res, 1990. **49**(2): p. 186-96.
- 109. Deitch, E.A., Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. Shock, 1998. **9**(1): p. 1-11.
- 110. Schultz, M.J. and T. van der Poll, *Animal and human models for sepsis.* Ann Med, 2002. **34**(7-8): p. 573-81.
- 111. Dejager, L., et al., *Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?* Trends Microbiol, 2011. **19**(4): p. 198-208.
- 112. Maier, S., et al., *Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis.* Shock, 2004. **21**(6): p. 505-11.
- 113. Ley, K., *Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process.* Cardiovasc Res, 1996. **32**(4): p. 733-42.
- 114. Zarbock, A. and K. Ley, *Neutrophil adhesion and activation under flow*. Microcirculation, 2009. **16**(1): p. 31-42.
- 115. Kolaczkowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
- 116. Muller, W.A., *Mechanisms of leukocyte transendothelial migration.* Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 323-44.
- 117. Luscinskas, F.W., et al., *The role of endothelial cell lateral junctions during leukocyte trafficking.* Immunol Rev, 2002. **186**: p. 57-67.
- 118. Wittchen, E.S., *Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration.* Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**: p. 2522-45.
- 119. Bach, T.L., et al., *Endothelial cell VE-cadherin functions as a receptor for the beta15-42 sequence of fibrin.* J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30719-28.
- 120. Chalupowicz, D.G., et al., *Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation.* J Cell Biol, 1995. **130**(1): p. 207-15.
- 121. Jennewein, C., et al., *Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation.* Mol Med, 2011. **17**(5-6): p. 568-73.
- 122. Mosesson, M.W., *Fibrinogen and fibrin structure and functions.* J Thromb Haemost, 2005. **3**(8): p. 1894-904.
- 123. Olexa, S.A., et al., *Structure of fragment E species from human cross-linked fibrin.* Biochemistry, 1981. **20**(21): p. 6139-45.
- 124. Vali, Z. and H.A. Scheraga, *Localization of the binding site on fibrin for the secondary binding site of thrombin.* Biochemistry, 1988. **27**(6): p. 1956-63.

- 125. Petzelbauer, P., et al., *The fibrin-derived peptide Bbeta15-42 protects the myocardium against ischemia-reperfusion injury.* Nat Med, 2005. **11**(3): p. 298-304.
- 126. Groger, M., et al., *Peptide Bbeta(15-42) preserves endothelial barrier function in shock.* PLoS One, 2009. **4**(4): p. e5391.
- 127. Roesner, J.P., et al., *Bbeta15-42 (FX06) reduces pulmonary, myocardial, liver, and small intestine damage in a pig model of hemorrhagic shock and reperfusion.* Crit Care Med, 2009. **37**(2): p. 598-605.
- 128. Reutershan, J., et al., Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(5): p. L807-15.
- Peng, X., et al., Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. Am J Respir Crit Care Med, 2004. 169(11): p. 1245-51.
- 130. Goldenberg, N.M., et al., *Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis.* Sci Transl Med, 2011. **3**(88): p. 88ps25.
- 131. Marshall, J.C., *Clinical trials of mediator-directed therapy in sepsis: what have we learned?* Intensive Care Med, 2000. **26 Suppl 1**: p. S75-83.
- 132. Marshall, J.C., *Such stuff as dreams are made on: mediator-directed therapy in sepsis.* Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(5): p. 391-405.
- 133. Riedemann, N.C., R.F. Guo, and P.A. Ward, *The enigma of sepsis.* J Clin Invest, 2003. **112**(4): p. 460-7.
- 134. Zeni, F., B. Freeman, and C. Natanson, *Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment.* Crit Care Med, 1997. **25**(7): p. 1095-100.
- 135. Traeger, T., et al., Colon ascendens stent peritonitis (CASP)--a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. J Vis Exp, 2010(46).
- 136. Buras, J.A., B. Holzmann, and M. Sitkovsky, *Animal models of sepsis: setting the stage.* Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(10): p. 854-65.
- 137. Esmon, C.T., *Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis?* Crit Care Med, 2004. **32**(5 Suppl): p. S219-22.
- 138. Rittirsch, D., L.M. Hoesel, and P.A. Ward, *The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis.* J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 137-43.
- 139. Atar, D., et al., Rationale and design of the 'F.I.R.E.' study. A multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study to measure the effect of FX06 (a fibrin-derived peptide Bbeta(15-42)) on ischemia-reperfusion injury in patients with acute myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. Cardiology, 2007. **108**(2): p. 117-23.
- 140. Atar, D., et al., Effect of intravenous FX06 as an adjunct to primary percutaneous coronary intervention for acute ST-segment elevation myocardial infarction results of the F.I.R.E. (Efficacy of FX06 in the Prevention of Myocardial Reperfusion Injury) trial. J Am Coll Cardiol, 2009. 53(8): p. 720-9.
- 141. Wiedemann, D., et al., *The fibrin-derived peptide Bbeta(15-42) significantly attenuates ischemia-reperfusion injury in a cardiac transplant model.* Transplantation, 2010. **89**(7): p. 824-9.
- 142. Roesner, J.P., et al., A double blind, single centre, sub-chronic reperfusion trial evaluating FX06 following haemorrhagic shock in pigs. Resuscitation, 2009. **80**(2): p. 264-71.

- 143. Alves, A., et al., *Factors associated with clinically significant anastomotic leakage after large bowel resection: multivariate analysis of 707 patients.* World J Surg, 2002. **26**(4): p. 499-502.
- 144. Kruschewski, M., et al., *Risk factors for clinical anastomotic leakage and postoperative mortality in elective surgery for rectal cancer.* Int J Colorectal Dis, 2007. **22**(8): p. 919-27.
- 145. Rullier, E., et al., *Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer.* Br J Surg, 1998. **85**(3): p. 355-8.
- 146. Jennewein, C., et al., *The fibrinopeptide bbeta15-42 reduces inflammation in mice subjected to polymicrobial sepsis.* Shock, 2012. **38**(3): p. 275-80.
- 147. Schick, M.A., et al., *Phosphodiesterase-4 inhibition as a therapeutic approach to treat capillary leakage in systemic inflammation.* J Physiol, 2012. **590**(Pt 11): p. 2693-708.
- 148. Donato, R., et al., *Functions of S100 proteins*. Curr Mol Med, 2013. **13**(1): p. 24-57.
- 149. Schlegel, N., et al., *Lipopolysaccharide-induced endothelial barrier breakdown is cyclic adenosine monophosphate dependent in vivo and in vitro.* Crit Care Med, 2009. **37**(5): p. 1735-43.
- 150. Schlegel, N. and J. Waschke, *Impaired cAMP and Rac 1 signaling contribute* to *TNF-alpha-induced endothelial barrier breakdown in microvascular endothelium.* Microcirculation, 2009. **16**(6): p. 521-33.
- 151. Rubulotta, F.M., et al., *An international survey: Public awareness and perception of sepsis.* Crit Care Med, 2009. **37**(1): p. 167-70.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

06. April 2014

Danksagung

Mein Dank gilt allen meinen Mitmenschen, ohne deren Unterstützung und Hilfestellung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Als erstes möchte ich meinen besonderen Dank an Herrn Prof. Dr. med. Claus-Dieter Heidecke und Herrn Prof. Dr. med. Stefan Maier richten für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe und die Bereitstellung dieser interessanten und herausfordernden Fragestellung. Darüber hinaus danke ich der gesamten Arbeitsgruppe, allen voran Frau Dr. Pia Menges und Frau Dr. med. Katharina Beyer für die konstruktiven Anregungen und Kritiken sowie für die Korrekturlesung des Manuskriptes. Ich danke zu dem der MTA Antje Müller, deren zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Ein besonderes Dankeschön richtet sich an den Promovenden Herrn Tobias Ebker für die Einarbeitung in die operativen und experimentellen Techniken sowie für die freundschaftliche Hilfe.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie für ihre unermüdliche Unterstützung, ihr großes Verständnis und ihre grenzenlose Zuneigung bedanken. Sie war und ist mir ein großer Rückhalt.