

Medizinische Fakultät
der
Universität Essen

Chirurgisches Zentrum
Aus der Klinik und Poliklinik
für Unfallchirurgie
Forschergruppe Schock und Multiorganversagen

Endotoxintoleranz und hämorrhagischer Schock bei Ratten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Medizin
durch die Universität Essen

vorgelegt von
Marcus Norbert Ackermann
aus Essen, 2001

Dekan: Univ. Prof. Dr. med. H. Grosse-Wilde
1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. rer. nat. F.U. Schade
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. E. Kreuzfelder
3. Gutachter: Univ. Prof. Dr. med. W. Seeger, Giessen

Rigorosum: 05.10.2001

1 Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bisher als Publikationen in der Fachliteratur veröffentlicht:

1. **Ackermann, M.**, Reuter, M, Flohe, S., Bahrami, S., Redl, H., and Schade, F. U. Cytokine synthesis in the liver of endotoxin-tolerant and normal rats during hemorrhagic shock. Journal of endotoxin research Vol. 7, No 2, 105–112, 2001
2. **Ackermann, M.**, Reuter, M, Flohe, S., Bahrami, S., Redl, H., and Schade, F. U. Endotoxin tolerance protects against hemorrhagic shock via a TNF inhibitory serum factor. zur Publikation eingereicht . 2001.
3. **Ackermann, M.**, Reuter, M, Flohe, S., Flach, R., Bahrami, S., Schlag, G., and Schade, F. U. Endotoxintoleranz und hämorrhagischer Schock bei Ratten. Langenbecks.Arch.Chir.Suppl.Forumbd. 1, 181-184. 1998.
4. Dominguez Fernandez, E., Flohé, S., Siemers, F., Nau, M, **Ackermann, M.**, Ruwe, M., and Schade, F. U. Endotoxin tolerance protects against local hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. Journal of endotoxin research 6(4), 321-328. 2000.
5. Flohe S, Dominguez Fernandez E, **Ackermann M**, Hirsch T, Borgermann J, Schade FU: Endotoxin tolerance in rats: expression of TNF-alpha, IL-6, IL- 10, VCAM-1 AND HSP 70 in lung and liver during endotoxin shock. Cytokine. 1999; 11: 796-804
6. Flohe, S., **Ackermann, M.**, Reuter, M, Nast-Kolb, D., and Schade, F. U. Sublethal hemorrhagic shock reduces tumor necrosis factor - producing capacity in different cell compartments. Eur.Cytokine.Netw. 11(3), 420-426. 1-10-2001.
7. Reuter, M, **Ackermann, M.**, Flohe, S., Flach, R., Bahrami, S., Schlag, G., and Schade, F. U. Transfusion von Plasma endotoxintoleranter Ratten verbessert die Überlebensrate beim hämorrhagischen Schock im Rattenschockmodel. Langenbecks.Arch.Chir.Suppl.Kongressbd. 1, 177-180. 1998.
8. **Ackermann, M.**, Reuter, M, Bahrami, S., and Schade, F. U. Präkonditionieren durch kurze Hämorrhagie verbessert die Hämodynamik und die Überlebensrate nach hämorrhagischem Schock. Hefte zur Unfallchirurgie 62(62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie), 23. 1997. Springer Verlag. Abstract
9. **Ackermann, M.**, Flohe, S., Heukamp, T., and Schade, F. U. Sublethal hemorrhagic shock reduces TNF- - producing capacity in different compartments. Shock 12(supplement 1), 32. 1999. Abstract
10. Reuter, M, Bahrami, S., **Ackermann, M.**, Leichtfried, G., Schiesser, A., Paul, E., Redl, H., Schechter, D. C., and Schlag, G. A moderate hypovolaemic insult improves hemodynamics and survival rate in rats subjected to a subsequent prolonged hypovolaemic shock. Shock 8(supplement 1), 23. 1987. Abstract
11. Reuter, M, Bahrami, S., **Ackermann, M.**, Leichtfried, G., Schiesser, A., Paul, E., Redl, H., Schlag, G., and Schade, F. U. Improved survival after hemorrhagic shock in rats rendered tolerant to endotoxin or resuscitated with plasma of tolerant rats. Shock 8(66), 23. 1997.Abstract

2 Inhaltsverzeichnis

1 Publikationen	3
2 Inhaltsverzeichnis.....	4
3 Einleitung	6
3.1 Klinische Bedeutung des hämorrhagischen Schocks	6
3.2 Hämorrhagischer Schock	6
3.2.1 Definition	6
3.2.2 Pathophysiologie	7
3.3 Tumor Nekrose Faktor α - TNF α (Cachectin)	9
3.4 Endotoxin.....	10
3.5 Endotoxintoleranz.....	11
3.5.1 Historie	11
3.5.2 Zytokine.....	12
3.5.3 Kortikosteroide	13
3.5.4 Interleukin 10.....	14
3.5.5 Ein unbekannter TNF- Inhibitor	15
3.6 Fragestellung der Arbeit	16
4 Material	17
4.1 Chemikalien und Substanzen	17
5 Methoden.....	19
5.1 Hämorrhagischer Schock an der Ratte.....	19
5.1.1 Versuchsprinzip	19
5.1.2 Versuchstierhaltung.....	19
5.1.3 Katheterherstellung	19
5.1.4 Katheterimplantation.....	19
5.1.5 Induktion des hämorrhagischen Schocks (Abb. 2)	20
5.1.6 Entnahme von Leberbiopsien.....	21
5.1.7 Entnahme von Blut und Plasmaproben	22
5.1.8 Plasmatransfusion	22
5.2 Endotoxintoleranz.....	22
5.2.1 Versuchsprinzip	22
5.2.2 Endotoxin- Applikation (Abb. 3)	22
5.2.3 Blutentnahmen (Abb. 3).....	22
5.3 Bioassays	23

5.3.1	Stimulation von Vollblut	23
5.3.2	Stimulation von Milzzellen	23
5.3.3	Stimulation von Knochenmarkzellen	24
5.3.4	Makrophagen- Zelllinie RAW 264,7.....	24
5.3.5	Stimulations- und Hemmtest auf Vollblut oder RAW 264,7	24
5.4	Analytische Verfahren	25
5.4.1	ELISA für TNF α und IL-6.....	25
5.4.2	Polymerase-Chain-Reaction (PCR).....	26
5.4.2.1	RNA – Isolierung und cDNA- Synthese.....	26
5.4.2.2	Semiquantitative PCR.....	27
6	Ergebnisse	28
6.1	Endotoxin-Toleranz	29
6.1.1	Klinische Parameter	29
6.1.2	TNF α - Produktion.....	32
6.2	Hämorrhagischer Schock	36
6.2.1	Klinische Parameter	37
6.2.2	Zytokinsynthese der Leber	38
6.2.3	TNF α - inhibitorische Aktivität.....	40
6.2.4	Zytokinproduktion anderer Kompartimente.....	41
6.3	Plasmatransfusion	44
6.4	Präkonditionierung.....	48
6.5	Vergleich der Hemmaktivitäten.....	50
7	Diskussion	52
7.1	Verbesserung der Überlebensrate.....	52
7.2	Natur der Endotoxintoleranz.....	53
7.3	Immunsuppression nach Hämorrhagie.....	56
8	Zusammenfassung.....	61
9	Literatur	62
10	Danksagungen	69
11	Lebenslauf.....	70

3 Einleitung

3.1 Klinische Bedeutung des hämorrhagischen Schocks

Durch Unfälle oder Gewalt verursachte Verletzungen stellen die häufigsten Todesursachen im Alter zwischen 1 und 44 Jahren dar⁶³. 50% dieser Todesfälle treten innerhalb der ersten Stunde aufgrund starken Blutverlustes oder ZNS-Verletzungen auf. Weitere 30% der Patienten versterben innerhalb von 2 Stunden nach dem Unfall meist an inneren Verletzungen⁶³. Grundstein der Behandlung von traumatischem, hämorrhagischem Schock ist das Auffinden und die Kontrolle der Blutungsquellen sowie die schnelle Flüssigkeitssubstitution zur Wiederherstellung physiologischer Kreislaufverhältnisse. Nachdem mit dieser Strategie in der Vergangenheit große Erfolge bei der Behandlung Schwerverletzter erreicht wurden, sieht man mittlerweile, dass Sepsis und Multiorganversagen die häufigsten Todesursachen im weiteren Verlauf nach schweren Verletzungen auch bei intensivmedizinischer Betreuung sind^{49;69}. Im Hinblick auf diese Entwicklung sind experimentelle Untersuchungen über die Pathophysiologie und Behandlung von Trauma/Hämorrhagie essentiell. Solche Studien könnten die Grundlage für rationale Therapien liefern, die Mortalität und Morbidität von Unfallopfern in Zukunft senken könnten.

3.2 Hämorrhagischer Schock

3.2.1 Definition

Der Schock wurde 1977 von MacLean folgendermassen definiert: „Inadäquate Durchblutung lebenswichtiger Organe oder die Unfähigkeit der Körperzellen zu normalem Metabolismus von Nährstoffen“. Goris beschrieb den Schock als einen Zustand, in dem die Sauerstoffversorgung der Mitochondrien durch Störungen in der (Mikro-) Zirkulation insuffizient ist⁴⁹. Man sieht, dass der Schock und alle seine Erscheinungsformen im Endeffekt durch eine für längere Zeit bestehende Minderdurchblutung lebenswichtiger Organe entsteht. Der hämorrhagische Schock, ein Sonderfall des hypovolämischen Schocks, ist durch ein zu geringes zirkulierendes Blutvolumen gekennzeichnet, und ist nicht notwendigerweise mit größeren Gewebeerletzungen oder Knochenbrüchen assoziiert. Im klinischen Alltag kommt der hämorrhagische Schock unter Anderem bei penetrierenden

Verletzungen oder Schnittwunden vor, die mit einem erheblichen Blutverlust verbunden sind. Kommt es hierbei zu einem Versagen der neurohumoralen Kompensationsmöglichkeiten des Organismus, führt dies zu einer Minderperfusion von Organsystemen und damit zu lokaler oder systemischer Hypoxämie.

3.2.2 Pathophysiologie

McCord beschrieb 1985 den hämorrhagischen Schock als Ischämie des ganzen Körpers⁷². Kompensiert man den posttraumatischen Blutverlust durch Gabe von Blutkonserven oder Blutersatzflüssigkeiten frühzeitig, erreicht man die Reperfusion und Reoxigenierung dieser Organe. Diese Ischämie/Reperfusionereignisse führen mit der Aktivierung von Monozyten/Makrophagen durch Produkte der humoralen Abwehrkaskade (z.B. des Komplementsystems) zur Ausbildung einer systemischen Inflammation, die das Versagen von Organen bewirken kann. Chaudry fasste die immunologischen Aspekte nach Hämorrhagie und Wiederdurchblutung 1990 zusammen²¹: er beschrieb, dass anhaltende Hypotension eine Supprimierung der spezifischen und unspezifischen zellvermittelten Immunität zur Folge hat. Dies zeigte sich in einer Depression der Lymphozytenfunktionen, Erniedrigung der Fc/C3B-Rezeptoren-Expression von Makrophagen und damit erniedrigte Opsonin-vermittelte Phagozytose, supprimierte IL-2 Produktion der Milz und verminderte Antigen-Präsentation von Peritoneal- und Milzmakrophagen sowie der Kupffer-Zellen. Des Weiteren wurde eine Abnahme der Bildungskapazität für TNF α der Monozyten/Makrophagen im Blut, der Milz und von Peritonealmakrophagen nach Hämorrhagie und während einer Sepsis beschrieben. Diese Veränderungen des Immunsystems sind unabhängig von Schwankungen der absoluten Menge der Lymphozytenpopulationen oder der relativen Zusammensetzung der Subpopulationen. Sie zeigen sich sofort nach Hämorrhagie bis längere Zeit nach Reperfusion. Auf der anderen Seite kann man eine Zunahme der Bildungskapazität für proinflammatorische Zytokine wie TNF α und deren Bildung von Kupffer-Zellen beobachten. Chaudry folgerte aus diesen Ergebnissen, dass die Anfälligkeit des Organismus für Sepsis nach Hämorrhagie auf diese Immunsuppression zurückzuführen ist. Gemeinsam mit einer exzessiven

Produktion proinflammatorischer Zytokine durch die Leber bilden diese Vorgänge die Grundlage für das posttraumatische Organversagen.

Ischämie/Reperfusion führt in Geweben zur „oxidativem Stress“, das heißt zu einem Missverhältnis von prooxidativen zu antioxidativen Faktoren. Die wichtigste Rolle unter den reaktiven Oxidantien spielt hierbei das Superoxydanion (O_2^-), welches einerseits durch die Aktivierung der Xanthinoxidase bei Ischämie, und andererseits während des „oxidative burst“ von Monozyten/Makrophagen gebildet wird. Einen kritischen Punkt in diesem Zusammenhang stellt die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen dar, die durch das vermehrte Auftreten von Adhäsionsmolekülen des Endothels nach Ischämie/Reperfusion begünstigt wird. Hierdurch wird das Endothel der Wirkung von Leukozytenprodukten bevorzugt ausgesetzt. Die Schädigung von Membranen durch Lipidperoxidation oder Proteolyse führt zu einer erhöhten Permeabilität, Ödemen und damit zu Funktionsstörungen in Organen. Die Wirkungen von freien Radikalen auf Zellen wurden von Redl et al. 1993 zusammengefasst⁸⁴.

In der Vergangenheit haben verschiedene Studien gezeigt, dass neben der Lunge, der Leber und der Niere, der Darm eine besondere Rolle im hämorrhagischen Schock spielt. Aufgrund der oben beschriebenen Endothelläsionen kommt es zu Störungen seiner physiologischen Barrierefunktionen und eine Translokation von Bakterien oder ihrer Bestandteile wie dem Endotoxin in das zirkulierende Blut wird möglich^{5,6}. Dieses Endotoxin erreicht mit dem Blutfluss über die Pfortader die Leber und bewirkt in deren Kupffer-Zellen eine Induktion von proinflammatorischen Zytokinen wie $TNF\alpha$ oder IL-6²⁹, welche eine systemische Inflammation einleiten können⁶⁶. Wie schon oben beschrieben begünstigen die erhöhte $TNF\alpha$ -Bildung der Kupffer-Zellen einerseits und die verminderte Fähigkeit zu Phagozytose und Antigenpräsentation, sowie die Depression der Lymphozytenfunktionen andererseits die Ausbildung einer Sepsis und Multiorganversagens. Vor allem $TNF\alpha$ scheint eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der Organschädigungen zu spielen. Erhöhte Konzentrationen von zirkulierendem $TNF\alpha$ wurden in Studien an experimenteller Hämorrhagie beschrieben⁸⁶ und Antikörper gegen $TNF\alpha$ verbesserten die Überlebensrate nach hämorrhagischem Schock⁷.

3.3 Tumor Nekrose Faktora - TNF α (Cachectin)

TNF α ist ein Protein mit dem Molekulargewicht von 17 kDa, das vornehmlich von Monozyten und Makrophagen, aber auch von einer Vielzahl anderer Zellen wie z.B. Endothelzellen und Mikroglia-Zellen gebildet wird⁸⁰. Die aktive Form des Moleküls ist ein Trimer, für das zwei verschiedene Rezeptoren mit unterschiedlichen Signal-Transduktionswegen und physiologischen Wirkungen bekannt sind^{16;95}. Eine membrangebundene Form von TNF α von 26 kDa, aus der durch Proteolyse die lösliche 17 kDa-Form entsteht, wurde ebenfalls beschrieben¹⁰¹. Die Bedeutung dieser beiden Formen und die Beteiligung von Proteasen an der Abspaltung aus dem Membrankomplex ist noch fraglich⁷⁹. Sowohl im hämorrhagischen – als auch im Endotoxin-Schock kommt diesem Zytokin eine zentrale Bedeutung zu. Sehr hohe Spiegel von TNF α werden nach experimenteller Hämorrhagie sowie nach LPS-Injektionen in verschiedenen Tierspezies und in Menschen gemessen^{11;12;24;26;73;85;86;106}. Die Antwort des RES auf Hämorrhagie erfolgt recht schnell, so dass man schon nach 30 min während des Schocks einen TNF α -Spiegel im Blut messen kann, der über 2 Std. ansteigt und nach 4 Std. nicht mehr nachweisbar ist³. Einen ähnlichen Verlauf nimmt die TNF α -Antwort auf LPS-Injektionen^{39;40}. TNF α ist in seiner physiologischen Funktion ein wichtiger Faktor der unspezifischen Abwehr. Inadäquat niedrige TNF α Produktion führt zu erhöhter Anfälligkeit eines Organismus gegen Infektionen, wobei unphysiologisch hohe TNF α -Spiegel das Vollbild eines septischen Schocks auslösen können. Applikation von TNF α löst in vielen Tierspezies das Vollbild eines septischen Schocks mit Fieber, Leukopenie, Disseminierter Intravasaler Coagulation (DIC) und Organversagen z.B. von Niere und Lunge aus. Bei entsprechender Dosis wirkt TNF α letal^{77;99}. Poly- und monoklonale Antikörper gegen TNF α schützen Mäuse, Ratten, Schweine, Paviane und andere Versuchstiere vor normalerweise letalen LPS-Dosen oder vor hämorrhagischem Schock^{4;8;14;55;100}. Klinische Testungen mit monoklonalen Antikörpern gegen humanes TNF α bei Sepsispatienten zeigten jedoch bisher keinen Erfolg. Für Pharmaka, die die Freisetzung von TNF α hemmen, wie z.B. der Phosphodiesterase-Hemmer Pentoxyphyllin (Trental[®]), konnte ein therapeutischer Nutzen in experimentellen Schockmodellen nachgewiesen werden^{93;94}. In jüngster Zeit gab es verschiedene Studien, die während einer

Endotoxintoleranz die Bildung eines unbekanntes $\text{TNF}\alpha$ -Inhibitors beschrieben und diesen für die protektiven Eigenschaften der Endotoxintoleranz verantwortlich machen^{37;92}. Dieses Phänomen wird in den folgenden Abschnitten genauer beschrieben und ist ein Thema dieser Dissertation.

Die vorgenannten Befunde weisen auf $\text{TNF}\alpha$ als einen zentralen letalen Mediator im septischen wie im hämorrhagischen Schock hin. $\text{TNF}\alpha$ ist ebenfalls an vielen Krankheitsprozessen wie Rheuma und Malaria beteiligt. Ursprünglich und namensgebend erregte dieses Zytokin durch seine antitumoröse Eigenschaft die Aufmerksamkeit. $\text{TNF}\alpha$ wirkt zytotoxisch auf verschiedene Zell-Linien und führt zu Nekrose in manchen Tumoren^{17;61}. Aufgrund der hohen Eigentoxizität von $\text{TNF}\alpha$ ist aber sein therapeutischer Einsatz gegenwärtig begrenzt.

3.4 Endotoxin

Ende des neunzehnten Jahrhunderts beschrieb Pfeiffer erstmals toxische Substanzen in Bakterienkulturen, die fieberinduzierende Wirkung besaßen⁸¹. Erst zwischen 1930 und 1940 waren Versuche, biologisch aktive Fragmente aus Gramnegativen Bakterien zu isolieren und anzureichern, erfolgreich und es gelang, diese endotoxischen Substanzen als Lipopolysaccharide (LPS) zu identifizieren. (Die Begriffe Endotoxin und LPS werden im Folgenden synonym verwendet.) Die Lipopolysaccharide aller gramnegativen Bakterien setzen sich aus drei wesentlichen Bestandteilen zusammen:

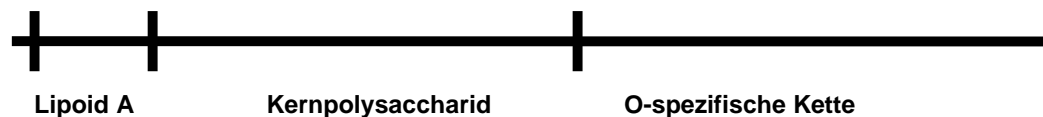


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Lipopolysaccharid-Moleküls

1949 wurde schließlich der Lipidanteil als der für die toxische Wirkung verantwortliche Teil identifiziert und als „Lipoid A“ bezeichnet^{87;88}.

LPS stellt einen der potentesten Aktivator des Immunsystems dar. Die typischen endotoxischen Effekte sind Fieber, Leukozytose, Hypotension, und endotoxischer Schock, welcher zu Multiorganversagen und Tod führen kann. Die

Zellen der Monozyten/Makrophagen-Linie stehen durch ihre Fähigkeit zur Produktion von Mediatoren wie Zytokinen in engem Zusammenhang mit der Regulation dieser komplexen biologischen Phänomene⁴⁴.

Neben seinem schädigenden Potential existieren auch Effekte des LPS, welche eine schützende Wirkung für den Organismus vermitteln können wie zum Beispiel die Stimulation der B-Zell-Reifung und Proliferation, die Nekrose von Tumoren und die Steigerung der unspezifischen Immunabwehr. Auch bei diesen Effekten spielen Monozyten/Makrophagen eine zentrale Rolle, da auch sie durch endogene Mediatoren wie Zytokine vermittelt werden.

Die exakten Mechanismen des LPS-Wirkung auf Zellen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Einige Studien weisen auf die Existenz von Rezeptoren oder Bindungsproteinen hin¹⁰⁷.

Bewiesen ist, dass die Applikation von LPS zu einer Stimulation der Zytokinsynthese bei Tieren und Menschen führt^{87;88}. Dies führte zu der heute allgemein angenommenen Annahme, dass die biologischen Effekte des LPS von Zytokinen vermittelt werden. Vor allem der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF α) spielt eine zentrale Rolle in diesem Zusammenhang. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Antikörper gegen TNF α vor Schäden nach Endotoxin-Schock oder Bakteriämie schützen und die Letalität dieser Ereignisse senken^{14;45;100} (siehe Kap.1.3.).

3.5 Endotoxintoleranz

3.5.1 Historie

Ende des 19. Jahrhunderts versuchte man durch Applikation bakterieller Vakkzine (hitzeinaktivierte Gramnegative Bakterien) Fieber zu induzieren und so Patienten mit Infektionskrankheiten oder Tumoren zu heilen. Hierbei machte man die Beobachtung, dass nach wiederholter Gabe ein Vielfaches der initialen Menge appliziert werden musste, um die gewünschte Fieberreaktion hervorzurufen.

1894 wurde von Centanni erstmals beschrieben, dass die wiederholte Gabe einer aus Bakterienkulturen aufbereiteten pyrogenen Substanz eine Toleranz gegenüber seiner eigenen pyrogenen Aktivität induzierte¹⁸. Er vermutete in der von ihm beobachteten Reduktion der Fieberreaktion eher einen zellulär

vermittelten Mechanismus als eine serologische Immunreaktion¹⁹. Diese Beobachtung wurde von den Erfahrungen anderer unterstützt, die zeigen konnten, dass Resistenz gegenüber einer pyrogenen Fraktion, die aus *Salmonella typhosa* präpariert war, nicht mit zirkulierenden Antikörpern gegen diese Substanz erklärt werden konnte³³.

Die klassische Definition der Endotoxintoleranz wurde von S. Greisman et al. erarbeitet⁵³: Sie zeigten, dass in Kaninchen und Menschen einzelne Infusionen oder Bolusgaben geringer Mengen von Endotoxin ausreichen, um eine etwa 48-stündige Toleranz zu induzieren. Diese aufgrund ihres Zeitverlaufs als „frühe Phase“ bezeichnete Toleranz konnte mit Gaben verschiedener Endotoxine überprüft werden und zeigte keine O-Antigen-Spezifität. Wurde diese Toleranz allerdings zu einem späteren Zeitpunkt getestet, konnte man eine „späte Phase“ der Endotoxintoleranz beobachten. Diese Phase manifestierte sich ca. 72 Stunden nach Endotoxingabe und steigerte sich über einige Tage. Sie war spezifisch für das Endotoxin, welches zur Toleranzinduktion verwendet wurde. Nachdem man weiterhin Serumfraktionen von -mit Gramnegativen Bakterien oder Endotoxin vorbehandelten- Kaninchen präpariert hatte, kam man zu dem Schluss, dass die späte Phase der Endotoxintoleranz durch die Bildung von Antikörpern gegen die O-spezifische Kette des LPS bedingt ist⁵².

3.5.2 Zytokine

Induziert man Endotoxintoleranz in Versuchstieren oder Menschen, bewirkt die erste LPS-Gabe die Synthese von Zytokinen. Es konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass diese Reaktion nach wiederholter Gabe von LPS in Ratten⁴⁰, Kaninchen⁷¹ und Menschen⁵⁰ ausbleibt. Die Veränderung in der Synthese ist nicht für alle Zytokine gleich: Während $\text{TNF}\alpha$ und IL-1 bei andauernder Toleranz supprimiert bleiben, erholt sich die Syntheseleistung für colony stimulating factor (CSF) bis zu einem gewissen Grad⁶⁵ und die IL-6 Synthese erreicht ihr ursprüngliches Ausmaß⁴⁰. Eine Hauptidee aus diesen Studien war, dass die reduzierte Synthesekapazität dieser Mediatoren der Endotoxinwirkungen einen wichtigen Teil des Mechanismus der Endotoxintoleranz darstellt.

Nachdem bekannt war, dass Zytokine für die Ausbildung von Endotoxinwirkungen verantwortlich sind, untersuchte man deren Beteiligung an der Endotoxintoleranz. Das „endogene Pyrogen“ war das erste Zytokin, welches bezüglich seiner Fähigkeit untersucht wurde, Toleranz zu induzieren. Es wurde gefunden, dass auch wiederholte Gaben dieser Substanz nicht zur Ausbildung einer Toleranz bezüglich seiner Pyrogenität führt². Dieser Befund wurde später mit rekombinantem IL-1 bestätigt¹⁰⁵. Kombinierte man allerdings IL-1 mit rekombinantem humanem TNF α , konnte man beobachten, dass diese beiden Zytokine synergistisch bei der Induktion einer Endotoxintoleranz wirken¹⁰⁵.

Im Folgenden erhielt man durch eine Vielzahl weiterer Studien Erkenntnisse, die darauf hindeuteten, dass dem TNF die zentrale Rolle bei der Vermittlung der LPS-Wirkungen und auch im Mechanismus der Endotoxintoleranz zukommt: nachdem TNF α als rekombinantes Präparat erhältlich war, wurden Versuche unternommen, seine antineoplastischen Eigenschaften therapeutisch zu nutzen²⁰. Bei diesen Versuchen machte man die Beobachtung, dass wiederholte Gaben von humanem rekombinantem TNF α in Ratten zur Ausbildung einer Toleranz gegen die letalen Effekte des TNF α führten. Diese TNF-Toleranz entwickelte sich über 3 Tage, hielt 2 – 4 Tage an und war nach 2 Wochen abgeklungen. Eine erhöhte Elimination durch Antikörper wurde ausgeschlossen⁴¹. Interessanterweise besteht eine Kreuztoleranz zwischen TNF und LPS: Vorbehandlung mit LPS schützt gegen die letalen Wirkungen des TNF und TNF-Vorbehandlung gegen LPS-Schock.

Versuche, die mit TNF α Antikörpern gemacht wurden, zeigten, dass diese die Mäuse vor den letalen Effekten des LPS schützten, dessen Pyrogenität jedoch nicht beeinflussten. Es wurde diskutiert, dass IL-1 wohl der Auslöser für Fieber nach LPS-Gabe, TNF α jedoch für die letalen Effekte verantwortlich sei¹⁴.

3.5.3 Kortikosteroide

Bereits 1954 wurde beobachtet, dass Kortison vor den letalen Wirkungen des Endotoxins schützt⁴⁷. Des Weiteren wurden Kortikoide als Inhibitoren der Synthese von TNF⁴⁶, IL-1⁹⁶ und IL-6⁶⁴ erkannt und es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der endogenen Kortisonproduktion Mäuse gegenüber Endotoxin²², IL-1 und TNF¹⁰ sensibilisiert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden,

dass Endotoxingaben zu Ausschüttung von endogenen Kortikosteroiden führt und es wurde diskutiert, ob dieser Mechanismus für die Ausbildung der Endotoxintoleranz verantwortlich sei¹¹². Nachfolgende Arbeiten konnten allerdings zeigen, dass auch in adrenaletomierten Mäusen, in Tiermodellen mit erniedrigter Kortikoidwirkung (wiederholte Gaben von Kortison) und auch nach Gabe von Glukokortikoidantagonisten Endotoxintoleranz induzierbar ist^{22;62}. Fasst man diese Studien zusammen, kann man sagen, dass Glukokortikoide zwar eine Rolle bei der Empfindlichkeit gegen LPS und Zytokine spielen, jedoch bei der Vermittlung der protektiven Effekte durch eine Vorbehandlung mit LPS oder Zytokinen keine Relevanz haben.

3.5.4 Interleukin 10

IL-10 wurde als Inaktivator von Makrophagen- Funktionen identifiziert²⁸ und schützt Mäuse vor einem Endotoxin-Schock⁵⁴. Eine Rolle von IL-10 bei der Endotoxintoleranz ist jedoch sehr fraglich. Endotoxinbehandlung von Makrophagen *in vitro* führt dazu, dass die Zellen auf eine 20 h später erfolgende erneute Aktivierung mit LPS nur in sehr begrenztem Maße reagieren. Für die humane Zelllinie MonoMac 6 konnte gezeigt werden, dass in einem solchen Versuchsaufbau vermehrt IL-10 gebildet wird, TNF α und IL-1- Synthese jedoch stark reduziert sind. Es wurde daher vermutet, dass IL-10 ein entscheidender Mediator für diese *in vitro*- Desensibilisierung sein könnte. Auf der anderen Seite konnte aber gezeigt werden, dass Mäuse, deren IL-10-Produktion durch Ausschaltung des IL-10-Gens eliminiert ist, zwar sensibler gegenüber der letalen Wirkung des Endotoxins reagierten, Endotoxintoleranz jedoch grundsätzlich induzierbar bleibt⁹. Daher scheint IL-10 kein relevanter Faktor im Mechanismus der Endotoxintoleranz zu sein. Diese Daten werden durch neuere Untersuchungen belegt: Es wurde gefunden, dass die IL-10-Spiegel in endotoxintoleranten Mäusen nach LPS-Gabe signifikant niedriger waren als in normalen Versuchstieren⁹². Des Weiteren war die IL-10 Synthese mononukleärer Zellen, die aus dem Blut endotoxintoleranter Menschen isoliert wurden, nach LPS-Stimulation sehr viel niedriger als vor Toleranz-Induktion³⁵.

3.5.5 Ein unbekannter TNF- Inhibitor

1960 wurde von Freedman beobachtet, dass sich pyrogene Toleranz in Kaninchen durch Serumtransfusion von endotoxintoleranten Versuchstieren passiv übertragen lässt⁴³. Nachdem man nachgewiesen hatte, dass kein Unterschied zwischen den Seren eines über Wochen oder eines über 6 Tage mit Endotoxin vorbehandelten Spenders hinsichtlich der Toleranz und ihrer Übertragbarkeit bestand, ging man davon aus, dass es sich bei dem beobachteten Phänomen nicht um die Transfusion von Antikörpern gegen Endotoxin gehandelt hatte⁴². Eine genauere Charakterisierung der für die Übertragbarkeit verantwortlichen Faktoren wurde von Freedman nicht durchgeführt. In den letzten Jahren wurden von unserer Forschergruppe eine Reihe von Erkenntnissen gewonnen, die Freedmans Forschungen bestätigen. Mäuse wurden mit einer einzelnen, relativ hohen LPS-Dosis vorbehandelt. Nach 4 Tagen, vor und 30 min nach einer weiteren LPS-Gabe, wurde den nun endotoxintoleranten Tieren Blut entnommen und Serum gewonnen. Dieses Serum war in der Lage die TNF α -Produktion von LPS-stimuliertem murinem Vollblut signifikant zu senken. Diese inhibitorische Aktivität war weder in toleranten Mäusen vor der zweiten LPS-Gabe, noch in normalen Mäusen, 30 min nach einer LPS-Gabe vorhanden. Der Inhibitor war ein Protein, nicht identisch mit IL-10 und suppressierte die Bildung von TNF α , jedoch nicht seine Wirkung⁹². Eine gleichartige Aktivität wird von Makrophagen aus endotoxintoleranten Mäusen produziert. Diese sind darüberhinaus in der Lage vor den letalen Folgen eines Endotoxin-Schocks zu schützen³⁷. Eine genauere Charakterisierung dieses unbekanntes Inhibitors ist Gegenstand weiterer Forschungen und Teil der vorliegenden Arbeit.

3.6 Fragestellung der Arbeit

Ausgehend von der These, dass Endotoxintoleranz auf einer veränderten Zytokinsynthese (-Steuerung) basiert und die Letalität nach hämorrhagischem Schock vor allem auf einer TNF α -Reaktion der Leber auf transloziertes Endotoxin zu beruhen scheint, war es Ziel dieser Arbeit, die Zytokinproduktion verschiedener Kompartimente beim hämorrhagischen Schock einerseits und die Auswirkungen einer zuvor induzierten Endotoxintoleranz auf Hämorrhagie andererseits zu untersuchen. Es sollten zunächst Erkenntnisse über die Zytokinsynthese der Leber und anderer Kompartimente gewonnen werden. weiterhin sollte die Hypothese geprüft werden, ob Endotoxintoleranz vor hämorrhagischem Schock schützt.

Folgende Voraussetzungen stützen diese Hypothese:

Endotoxintoleranz schützt vor Endotoxin-Schock und ist mit der verminderten Produktion von TNF α assoziiert^{13;14;40;56;90}.

TNF α ist ein zentraler Mediator im hämorrhagischen Schock, dessen Ausschaltung eine Verbesserung der Überlebensrate zur Folge hat.^{7;8;86;90}

Des Weiteren wurde durch Plasmatransfusion von endotoxintoleranten Versuchstieren auf Ratten im Schock ein Therapieversuch nach hämorrhagischem Schock unternommen. Dieser Versuch stützt sich auf folgende Erkenntnisse:

Endotoxintoleranz ist mit der Produktion eines unbekanntes Faktors, der die TNF α -Produktion hemmt, assoziiert^{37;90-92}.

Endotoxintoleranz ist durch Serumtransfusion übertragbar^{42;43}.

4 Material

4.1 Chemikalien und Substanzen

- ABTS-Lösung: Direkt vor Verbrauch wurden in jeweils 1 ml auf 37°C vorgewärmtem Substratpuffer (3.1.x) 1mg 2,2-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) diammoniumsalz (ABTS, SIGMA) gelöst und 25 µl 0,1%ige Wasserstoffperoxydlösung (30%, Merck) hinzugegeben.
- Agarose Standard EEO (Fa. Serva)
- Blockpuffer für ELISA: 10% fötales Kälberserum (FCS) in PBS
- Coating- Puffer für ELISA: 100 mmol NaHCO₃ (4,2 g) wurden in 1000 ml H₂O bidest. gelöst, der pH- Wert wurde mit 50 mM Na₂CO₃ auf 8,5 eingestellt.
- DMEM Medium mit Penicillin/Streptomycin: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Nr. D6429, SIGMA, Irvine, UK) wurde mit 10000 IE/500 µg Penicillin/Streptomycin (ROCHE) versetzt.
- Ethidiumbromid (Fa. Bayer)
- Fötale Kälberserum FCS: Die genannten Medien wurden mit 10% endotoxinfreiem und sterilem fötalen Kälberserum der Firma GIBCO BRL versetzt.
- Lipopolisaccharid (LPS) aus Escherichia coli (E. coli): LPS aus E. coli wurde von der Firma DIFCO, Detroit, USA, bezogen.
- Lipopolisaccharid (LPS) aus Salmonella friedenau (S.fr.) und Citrobacter freundii (C.fr.): LPS aus S. friedenau und C. freundii wurde uns großzügigerweise von Prof. Dr. Helmut Brade, Biochemische Mikrobiologie, Forschungszentrum Borstel, zur Verfügung gestellt. Das LPS wurde mittels Phenol/Wasser aus den Bakterien extrahiert, lyophilisiert, in das Triethylammonium-Salz überführt und zu 1 mg/ml oder 5 mg/ml in sterilem, pyrogenfreiem Wasser gelöst.
- Liquemin[®] (Fa. Bayer)
- MTT-Lösung: 1 g 3-(4,5- Dimethylthiazol- 2 yl)- 2,5- diphenyl-tetrazoliumbromid (MTT, SIGMA, Deisenhofen) wurde in 200 ml PBS (3.1.5.1.) gelöst, und anschließend sterilfiltriert (Minisart NML, Sartorius, Göttingen).
- Narkotika: Rompun[®] (Fa. Bayer), Ketanest[®] (Fa. Janssen)

- PBS für ELISA: NaCl 1,370 M, KCl 0,027 M, Na₂HPO₄ x 12 H₂O 0,103 M, KH₂PO₄ 0,015 M
- PBS steril: Dulbecco`s, (SIGMA, Irvine, UK)
- Penicillin/Streptomycin (ROCHE)
- RPMI 1640 Medium mit Penicillin/Streptomycin: RPMI1640- Medium (GIBCO BRL) wurden mit 10000 IE/500 µg Penicillin/Streptomycin (ROCHE) versetzt.
- Stopplösung für ELISA: 2%ige Oxalsäure in H₂O
- Substratpuffer für ELISA: 0.1 M Natriumcitrat - dihydrat, pH: 4.5, eingestellt mit 2.5 M Zitronensäure
- Superscript[®], reverse Transcriptase (Fa. Gibco, Eggenstein)
- Taq-Polymerase (Fa. Boehringer)
- Tumor- Nekrose- Faktor α (TNF α): Rekombinanter TNF α von Mäusen und Ratten wurde von der Firma Genzyme (IC- CHEMICALS, München) bezogen.
- Waschpuffer für ELISA: In 1000 ml PBS (3.1.4.2.) wurden 11 ml Polyoxyethylen-sorbitanmonolaurat (Tween 20, 10%ig, EIA Grad, BIO RAD) gegeben.

5 Methoden

5.1 Hämorrhagischer Schock an der Ratte

5.1.1 Versuchsprinzip

Männlichen Sprague-Dawley-Ratten wird über einen Jugularvenenkatheter Blut entnommen, so dass der arterielle Mitteldruck auf einen Wert von 35 ± 5 mmHg sinkt. Hierdurch wird ein hämorrhagischer Schock induziert.

5.1.2 Versuchstierhaltung

350 - 400 g schwere, männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden vom zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen, Leiter Prof. Dr. Millitzer, oder vom Ludwig Boltzmann Institut für klinische und experimentelle Traumatologie, Wien, Leiter Prof. Dr. Schlag bezogen. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen gehalten: Tag-Nacht Rhythmus (12 h hell, 12 h dunkel), Raumtemperatur 22 ± 2 °C, rel. Luftfeuchtigkeit $55 \pm 5\%$, Luftumwälzung 15-fach pro Stunde. Die Ratten wurden in Kunststoffkäfigen in Gruppen von je 6 Tieren gehalten. Sie erhielten Wasser und artgerechtes Trockenfutter ad libitum.

5.1.3 Katheterherstellung

Die verwendeten Katheter wurden selber hergestellt. Die Venenkatheter wurden aus einem Silikonschlauch hergestellt, in den eine abgesägte und entgratete gelbe Kanüle geschoben wurde. Die Arterienkatheter wurden ebenso hergestellt, jedoch wurde ein Polyäthylenschlauch verwendet. Vor der Verwendung wurden die Katheter im Dampfsterilisator sterilisiert.

5.1.4 Katheterimplantation

Die auf Wärmeplatten liegenden Tiere werden durch i.m. Injektion von Ketamin/Xylazin ($112/15$ mg/kg KG) in die hintere Muskulatur des linken Oberschenkels narkotisiert. Am Hals wird ventral ein ca. 2 cm langer Hautschnitt links parallel von der Luftröhre vorgenommen. Nach stumpfer Präparation der linken Vena jugularis interna wird diese möglichst weit kranial ligiert und

möglichst weit proximal durch einen Gefäßclip unterbunden. Nun wird der zuvor mit NaCl (+5 U Liquemin / ml) gefüllte Katheter durch einen Einschnitt in die Vene eingeführt, dessen Spitze nach Lösen des Gefäßclips ca. 4 cm weit bis in den rechten Vorhof des Herzens vorgeschoben und eingebunden.

Zur Implantation des Katheters in die Arteria femoralis wird zunächst ein ca. 2 cm langer Hautschnitt an der Innenseite des rechten Oberschenkels parallel zum Femurkopf vorgenommen. Nach stumpfer Präparation des Gefäß-Nervenbündels wird dieses mit einer Schere eröffnet und die Arteria femoralis stumpf, vom Leistenband bis zum Abgang der Arteria epigastrica inferior, von der Vena femoralis und dem Nervus femoralis isoliert. Nun wird die Arterie möglichst weit distal jedoch kranial des Abgangs der Arteria epigastrica inferior ligiert und ein Gefäßclip möglichst weit kranial gesetzt. Nach Einschneiden des Gefäßes mit einer Schere wird der Katheter eingeschoben und nach Entfernung des Clips bis in die Bauchorta vorgeschoben. Diese Katheterlage wird durch Aufsetzen des Gefäßclips auf die Arterie gesichert.

Die Implantation beider Katheter erfolgt nach Rasur und Desinfektion des Operationsgebietes mit Betaisodona-Lösung, unter sterilen Bedingungen. Die Implantationsstellen wurden in Anschluss an die Operationen bis zum Abschluss der Versuche mit feuchten und sterilen Baumwolltupfern abgedeckt.

5.1.5 Induktion des hämorrhagischen Schocks (Abb. 2)

Nach der Katheterimplantation wird der arterielle Katheter über einen Druckwandler an einen Monitor angeschlossen, so dass eine direkte Blutdruckmessung möglich ist. Über den Jugulariskatheter wird nun so lange Blut entnommen bis der arterielle Mitteldruck des Versuchstieres bei 35 ± 5 mmHg (normal 100 ± 5 mmHg) liegt. Dieser Blutdruck wird für 3 Stunden eingestellt. Hierfür ist es aufgrund der neurohumoralen Regelmechanismen der Versuchstiere nötig, den Druck ständig zu überwachen und gegebenenfalls weitere Blutmengen zu entnehmen, oder sterile Kochsalzlösung (+5 U Liquemin/ml) zu infundieren. Das entnommene Blut wird mit der doppelten Menge Kochsalzlösung (+5 U Liquemin/ml) versetzt und bei 37°C in einer 50 ml Perfusorspritze aufbewahrt. Nach 3 Stunden wird das Blut über den arteriellen Katheter innerhalb einer weiteren Stunde reinfundiert. Nach der Reinfusion des Blutes bleiben die

Versuchstiere 2 Stunden auf der Wärmeplatte liegen. Die Katheter werden nach Abschluss des Experiments entfernt, die Gefäße ligiert und die Wunden mit einer Hautnaht verschlossen.

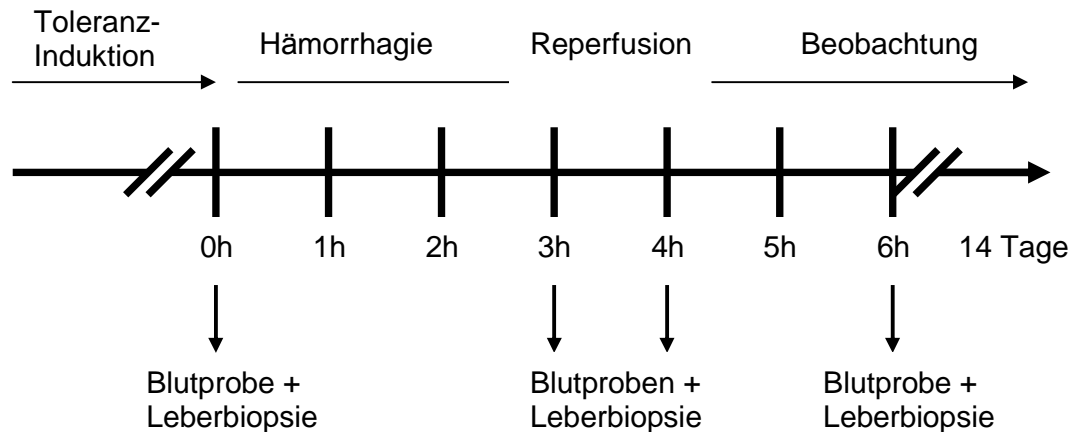


Abb. 2: Zeitlicher Ablauf des Versuchs „Hämorrhagischer Schock“. Nach der Vorbehandlung mit LPS (Kontrollgruppe NaCl) zur Induktion der Endotoxintoleranz wurden die Ratten einer Hämorrhagie von 3 Stunden unterzogen. Nach der Reperfusion über 1 Stunde wurden sie 14 Tage beobachtet. Blutentnahmen erfolgten vor und nach der Hämorrhagie, sofort und 2 Stunden nach Reperfusion.

5.1.6 Entnahme von Leberbiopsien

Leberbiopsien werden während der Versuche mit hämorrhagischem Schock von den narkotisierten Ratten entnommen. Unter sterilen Bedingungen wird nach medialer Laparotomie von ca. 2 cm Länge der rechte Leberlappen aufgesucht und jeweils sofort nach der Katheterimplantation, nach 1 Stunde Hämorrhagie, sofort nach der Reinfusion des Blutes und 2 Stunden nach der Reinfusion ein Keil von 3mm Länge mit einem Skalpell entnommen. Die Entnahmestelle wird mit chirurgischem Nahtmaterial verschlossen, so dass der Blutverlust gering bleibt und hinsichtlich des Experiments zu vernachlässigen ist. Die offene Bauchdecke wird bis zum Ende des Versuchs mit feuchten, sterilen Tüchern austamponiert, nach der letzten Leberprobenentnahme mit Einzelkopfnähten verschlossen und die Ratte anschließend aus der Narkose erweckt.

5.1.7 Entnahme von Blut und Plasmaproben

Blutproben von ca. 750 µl werden sofort nach der Katheterimplantation, nach einer Hämorrhagiedauer von 1 Stunde, sofort nach der Reinfusion des Blutes und 2 Stunden nach der Reinfusion über den Jugulariskatheter entnommen und mit 3 U Liquemin versetzt. 500 µl der Probe wird abzentrifugiert und das Plasma bei –20°C eingefroren.

5.1.8 Plasmatransfusion

Das zur Induktion der Hämorrhagie entnommene Blut wird zentrifugiert und der Plasmaüberstand abgenommen. Anschließend wird das fehlende Plasma durch das eines anderen Versuchstieres ersetzt. Diese Mischung aus autologen Zellen und heterologem Plasma wird zur Retransfusion verwendet.

5.2 Endotoxintoleranz

5.2.1 Versuchsprinzip

Durch wiederholte Gaben von Endotoxin soll in Ratten eine Endotoxintoleranz induziert werden.

5.2.2 Endotoxin- Applikation (Abb. 3)

Das Endotoxin (E. Coli - LPS, DIFCO, Detroit, Michigan, USA) wird in 2ml steriler NaCl-Lösung verdünnt und mit einer 12er Kanüle intraperitoneal injiziert. Das LPS wird an 5 aufeinanderfolgenden Tagen in folgender Höhe appliziert: Tag 1: 0.1 mg/kg Körpergewicht; Tag 2 – 5: 0.5 mg/kg KG.

5.2.3 Blutentnahmen (Abb. 3)

Am ersten und letzten Tag der Toleranzinduktion werden vor und 2 Stunden nach der LPS-Gabe ca. 1 ml Blut durch Punktion des retroorbitalen Venenplexus entnommen und mit 3 U Liquemin versetzt. Die Entnahme erfolgte unter Äthernarkose mit Hilfe einer Hämatokritkapillare (Ø 1,3 mm). 500 µl des Blutes werden zentrifugiert und das Plasma bei –20 °C eingefroren, der Rest wird für den unter 3.3.1. beschriebenen Bioassay verwendet.

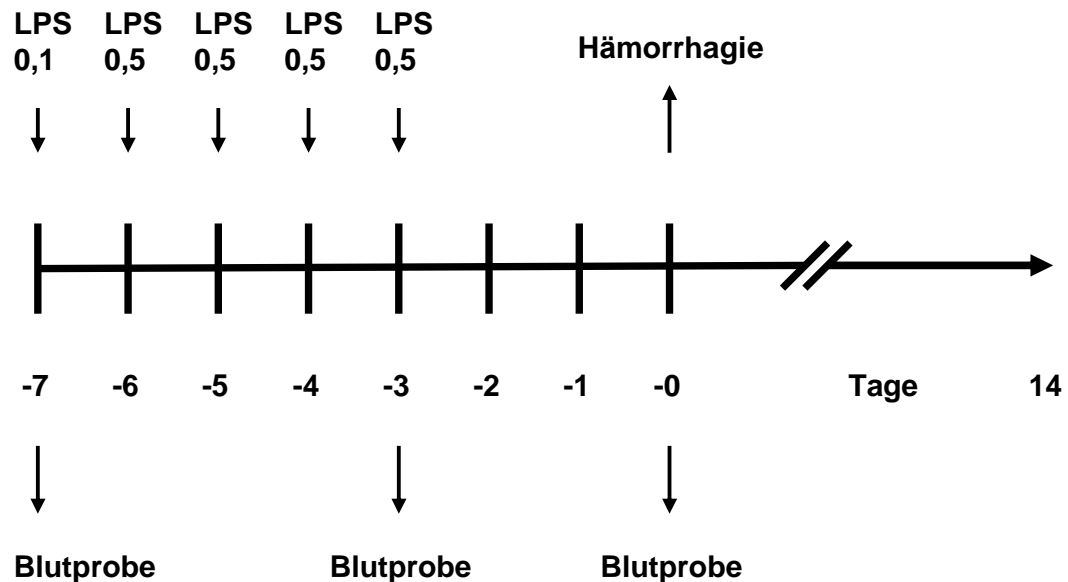


Abb. 3: Schematische Darstellung des Verlauf der Endotoxintoleranz-Induktion. LPS-Mengen sind in mg/kg Gewicht dargestellt. Es erfolgen 5 intraperitoneale LPS-Gaben an aufeinanderfolgenden Tagen. Vor und zwei Stunden nach der ersten und letzten LPS- Gabe, sowie vor dem hämorrhagischen Schock wurden Blutproben und Leberbiopsien entnommen.

5.3 Bioassays

5.3.1 Stimulation von Vollblut

100µl des heparinisierten Blutes werden 1:1 mit RPMI 1640 – Medium versetzt und in Flachboden – Mikrotiterplatten 4h mit LPS inkubiert (S.fr, 0, 1, 10, 100 ng/ml , 37 °C, 5% CO₂).

5.3.2 Stimulation von Milzzellen

Zur Gewinnung einer Milzzellsuspension wird die, nach Laparotomie einer getöteten Ratte entnommene, Milz durch ein Edelstahlsieb passiert. Nach Lyse der Erythrozyten mit NH₄Cl werden die Milzzellen 3x mit sterilem PBS gewaschen und in RPMI 1640–Medium mit 2,5% FCS resuspendiert, so dass eine Zellkonzentration von 5x10⁶ Zellen /ml vorliegt. Diese Suspension wird a 100 µl in Flachboden – Mikrotiterplatten pipettiert und 4 h mit LPS inkubiert (S.fr., 0, 1, 10, 100 ng/ml, 37 °C, 5% CO₂).

5.3.3 Stimulation von Knochenmarkzellen

Der Oberschenkelknochen der Ratte wird an beiden Enden abgeschnitten und das Knochenmark mit Hilfe einer Kanüle und steriler NaCl-Lösung ausgespült. Nach Absinken von Knochenresten wird der Überstand entnommen und Zellklumpen werden durch wiederholtes Resuspendieren mit einer Pipette gelöst. Nach 3-maligem Waschen mit sterilem PBS werden die Zellen in RPMI- Medium mit 2,5% FCS resuspendiert und in einer Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml in Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät. Die kultivierten Zellen werden 4 h mit LPS inkubiert (S.fr., 0, 1, 10, 100 ng/ml, 37 °C, 5% CO₂).

5.3.4 Makrophagen- Zelllinie RAW 264,7

1×10^6 RAW 264,7 (mouse monocyte-macrophage, American Culture Collection, ATCC Nr.: TIB 71) werden in Zellkulturflaschen mit 30 ml DMEM-Medium pipettiert und inkubiert (37°C, 10% FCS und Penicillin/Streptomycin, 5% CO₂). Nach 2 Tagen wird das Medium gewechselt. Die Zellernte erfolgt nach weiteren 24 Stunden Kultivierung indem das Kulturmedium verworfen, die Zellen 3x mit 10 ml Medium ohne FCS gewaschen und anschließend nach Zugabe von 10 ml Medium ohne FCS vorsichtig mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Mittels der Neubauer Zählkammer wird die Zellzahl bestimmt und mit FCS-freiem DMEM-Medium auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. 200 µL dieser Zellsuspension (d.h. 2×10^5 RAW 264,7) werden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatte pipettiert und für 2 Stunden bei oben genannten Bedingungen inkubiert. Nach Austausch der Kulturüberstände gegen frisches, serumfreies Medium stehen die Zellen für Experimente zur Verfügung. Zur Stimulation werden diese Zellen 4 h mit LPS inkubiert (S.fr., 0, 1, 10, 100 ng/ml, 37 °C, 5% CO₂).

5.3.5 Stimulations- und Hemmtest auf Vollblut oder RAW 264,7

Um eine eventuell vorhandene Stimulations- oder Hemmwirkung von Plasmaproben auf die Zytokinsynthese LPS-stimulierten Vollblutes oder Makrophagen (RAW 264,7) zu erfassen wird den oben beschriebenen Stimulationsansätzen 5% des zu testenden Plasmas zugesetzt. Die Zytokinsynthese des Vollblutes oder der Makrophagen wird nach Ablauf der Inkubationszeit in einem geeigneten analytischen Verfahren (z.B. ELISA)

bestimmt, und eine etwaige Hemmwirkung der Proben quantifiziert. Ausgedehnte Vorversuche zeigten, dass eine Plasmazugabe von 5% und eine LPS-Stimulation von 80 – 100% der maximal möglichen Stimulation ein optimales und reproduzierbares Testergebnis ergaben.

5.4 Analytische Verfahren

5.4.1 ELISA für TNF α und IL-6

Antikörper:

- Maus /Ratte TNF α ELISA :

- 1. Antikörper
Monoklonaler Hamster-Anti-Maus/Ratte TNF α , GENZYME, Cambridge
- 2. Antikörper
Polyklonaler Kaninchen-Anti-Maus/Ratte TNF α , GENZYME, Cambridge
- Standard
Rekombinantes Maus TNF α , GENZYME, Cambridge
Rekombinantes Ratten TNF α , GENZYME, Cambridge
- 3. Antikörper
Ziege-Anti-Kaninchen- IgG HRPO, DIANOVA

- Maus IL 6 ELISA

- 1. Antikörper
Monoklonaler Ratte-Anti-Maus IL 6, GENZYME, Cambridge
- 2. Antikörper
Polyklonaler Kaninchen-Anti-Maus IL 6, GENZYME, Cambridge
- Standard
Rekombinantes Maus IL 6, GENZYME, Cambridge
- 3. Antikörper
Ziege-Anti-Kaninchen- IgG HRPO, DIANOVA

Bei diesem Assay handelt es sich um ein Sandwich-System in Mikrotiterplatten mit hydrophiler Oberflächenbeschichtung, wobei ein monoklonaler Antikörper gegen das jeweilige zu detektierende Zytokin als Festphase eingesetzt wurde. Der 1. Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1 : 1000 in 100 μ l „Coating“-Puffer/Vertiefung aufgetragen und zum Adhären über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Aufziehen der Antikörper wurde 2 h bei 37°C mit 300 μ l Blockpuffer/Vertiefung geblockt um unspezifische Kreuzreaktionen zu vermeiden.

Die Platten wurden 3 mal mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und somit unspezifische Reaktionen in der Messung zu

vermeiden. Zur Verdünnung der Proben und der Standard- Verdünnungsreihe wurde Blockpuffer verwendet.

Als Standard wurde zunächst das jeweilige rekombinante Zytokin in 7 Schritten von 4 ng/ml bis 0,0625 ng/ml 1:2 mit Blockpuffer verdünnt und 100 µl dieser Verdünnungsansätze auf die Platten pipettiert. Die Proben, deren Zytokingehalt bestimmt werden sollte, wurden ebenfalls verdünnt (1:2) und in einem Gesamtvolumen von 100 µl auf die Platten gegeben, welche anschließend 2 h bei 37°C inkubiert wurden.

Der Überstand wurde nach Ablauf der Inkubationszeit dekantiert und die Mikrotiterplatten dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Im Anschluss daran wurde der 2. Antikörper 1:100 in Blockpuffer verdünnt, 100 µl dieser Lösung in die Vertiefungen pipettiert und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert.

Nach Dekantieren und Waschen wurde der 3. Antikörper aufgetragen (1:1500 mit Blockpuffer verdünnt, 100 µl/Vertiefung, 1h, 37°C). Die Mikrotiterplatten wurden danach erneut gewaschen und durch einmaliges Spülen mit Substratpuffer umpuffert. Nach dem Umpuffern wurden 100 µl frisch zubereitete ABTS-Lösung (3.1.1.) zugegeben. Die sich entwickelnde Farbreaktion wurde nach 20 - 30 minütiger Inkubation durch Hinzugabe von 100 µl Stopplösung abgestoppt. Anschließend Hilfe eines ELISA-Readers die Extinktion der Proben gemessen und der Zytokingehalt jeder Probe mit Hilfe einer Analyse der Standardverdünnungsreihe ausgewertet.

Zu diesem Zweck wurde die Software MikroWin 3.0, MIKROTEK LABORSYSTEME GmbH, benutzt.

5.4.2 Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

5.4.2.1 RNA – Isolierung und cDNA- Synthese

Gewebeproben der Rattenlebern werden mit Hilfe eines sterilen Spritzenkolbens und GTC-Puffer zerkleinert. Die so gewonnene Suspension wird zur weiteren Zerkleinerung in eine „Shredder“ Säule (Quiagen, Hilden) pipettiert und hindurchzentrifugiert. Die weitere Isolierung der Gesamt-RNA erfolgt mit dem Rneasy Extraktions-Kit (Fa. Quiagen, Hilden). Der RNA-Gehalt der so gewonnenen Proben wird photometrisch bestimmt und 1 µl wird zur weiteren Verarbeitung verwendet. Unter Zugabe von 25 pmol oligo-dt-Primer, 0,1 M DTT und 10 µM einer jeden NTP wird in einem Gesamtvolumen von 20 µl unter

Zuhilfenahme einer murinen Leukämie-Virus-reverse-Transkriptase (Superscript®, Fa. Gibco, Eggenstein) die RNA in cDNA umgeschrieben. Für die folgende PCR wird die cDNA 1:5 verdünnt und bei -20 °C aufbewahrt.

5.4.2.2 Semiquantitative PCR

Die PCR wird pro Ansatz mit 1 µl Taq-Polymerase (Boehringer, Mannheim), 0,2 µmol dNTP, und 200 pmol des jeweiligen Primers in 100 µl Gesamtvolumen in einem GeneAmp 2400 Thermocycler (Perkin-Elmer) durchgeführt. Die folgenden Primer, Zyklenzahlen und cDNA- Mengen werden benutzt:

Tabelle.1: Charakterisierung der bei der PCR verwendeten Primer.

Primer	Sequenz sence (s) / antisence (a)	Größe (bp)	Menge cDNA (µl)	Zyklen
GAPDH	s:TGAAGGTCCGAGTCAACGGATTTT a:CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC	982	2; 1; 0,5; 0,25; 0,125	30
IL-6	s:CTTCCAGCCAGTTGCCTTCT a:GAGAGCATTGGAAGTTGGGGG	496	2; 1; 0,5; 0,25; 0,125	35
IL-10	s:TGCCTTCAGTCAAGTGAAGACT a:AAACTATTCATGGCCTTGTA	326	2; 1; 0,5; 0,25; 0,125	35
HSP70	s:TGCTGACCAAGATGAAGGAG a:AGAGTCGATCTCCAGGCTGG	492	2; 1; 0,5; 0,25; 0,125	33
TNF α	s:ATGAGCACAGAAAGCATGATCC a:GAAGATGATCTGAGTGTG	251	2; 1; 0,5; 0,25; 0,125	33

Jeder PCR-Zyklus wird 30 s bei 95 °C, 30 s bei 50 °C und 45 s bei 72 °C eingestellt. Die Primer sind Exon/Intron flankierend ausgewählt, um die Kontamination des Produkts durch die Amplifizierung von chromosomaler DNA zu vermeiden. Das PCR-Produkt wird nach Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid analysiert. Die Menge des Produktes wird durch fluoreszenzspektroskopische FluorImager Analyse (Fa. Molecular Dynamics) bestimmt, wobei für jedes Zytokin 5 verschiedene cDNA Verdünnungen eingesetzt werden, um sicherzustellen, dass ein lineares Verhältnis zwischen cDNA und detektierter Fluoreszenzintensität eingehalten wird. Die Ergebnisse aus der fluoreszenzspektroskopischen Messung werden

durch lineare Regressionsanalyse mit der eingesetzten cDNA-Menge korreliert und der Korrelationskoeffizient errechnet.

Bei geeigneten PCR-Bedingungen werden folgende Korrelationen zwischen cDNA und detektiertem PCR-Produkt erhalten:

Tabelle. 2: Korrelation zwischen cDNA- Einsatz und detektiertem PCR-Produkt

Primer	Korrelation cDNA : PCR-Produkt
GAP-DH	< 0,98
TNF α	<0,95
IL-6	<0,97
IL-10	<0,97
HSP70	<0,98

Alle gemessenen PCR-Produkte wurden auf die Menge des „Housekeeping Gens“ GAP-DH normalisiert und werden als relative Einheiten pro GAP-DH angegeben.

6 Ergebnisse

In den folgenden Versuchen wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Die Ratte wird oft als ungeeignetes Versuchstier für Untersuchungen mit Endotoxin erachtet, da sie eine enorme natürliche Resistenz gegenüber LPS besitzt. Im Vergleich mit dem Menschen benötigt man bei Ratten eine 1000fach höhere Dosis um vergleichbare Wirkungen hervorzurufen. Dennoch sind in der Ratte sowohl die klinischen Parameter als auch die Entzündungsmediatoren im Vergleich mit anderen Tierspezies und dem Menschen in ihrem Verlauf ähnlich. Insbesondere das reichhaltige Sortiment an Materialien für analytische Verfahren (Primer, Antikörper) hinsichtlich der Zytokine und die relativ günstigen Kosten für Anschaffung und Haltung der Tiere macht die Ratte letztlich zu einem idealen Versuchstier. Die Induktion der Endotoxintoleranz und der anschließende hämorrhagische Schock erfolgte nach dem auf Seite 23 abgebildeten Schema.

6.1 Endotoxin-Toleranz

6.1.1 Klinische Parameter

Wie in Abb. 3 beschrieben, wurden die Versuchstiere mit täglichen, intraperitonealen Gaben von LPS (*E. coli*, gelöst in 2 ml NaCl-Lösung) vorbehandelt. Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge an NaCl-Lösung. Während des ersten Tages konnte man nach der LPS-Gabe eine deutliche Verschlechterung des Allgemeinzustandes der Ratten beobachten. Das Fell sträubte sich, die Aktivität der Tiere war im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich reduziert und die Nahrungsaufnahme war geringer. Diese Beobachtungen nahmen am zweiten Tag schon deutlich ab und ab dem dritten Tag waren keine äußerlichen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mehr zu erkennen. Man konnte allerdings feststellen, dass die mit LPS vorbehandelten Ratten während den ersten 5 Tagen signifikant mehr an Gewicht verloren als die mit NaCl behandelten Tiere.

Tabelle. 3: Körpergewicht der Versuchstiere vor und nach Induktion der Endotoxintoleranz. Die mit LPS vorbehandelten Ratten verloren deutlich mehr Gewicht als die Tiere der Kontrollgruppe.

Rattengruppe	n	Gewichtsverlust (g)	p (T-Test, LPS-Gruppe vs Kontrollgruppe.)
LPS- vorbehandelt	20	4 ± 10	0,01
Kontrollgruppe	60	14 ± 9	

Nach Endotoxingaben wird typischerweise ein Abfall des Hämatokrits sowie der Zahl der Plättchen und Leukozyten beobachtet. Im Folgenden wird gezeigt, wie sich diese klinischen Schockparameter während der Toleranzinduktion und dem anschließenden hämorrhagischen Schock verhalten. Dargestellt ist der Verlauf des Hämatokrits (Hkt) während der Toleranzinduktion sowie dem hämorrhagischen Schock als Mittelwert + Standardabweichung. Der Hkt der toleranten Ratten ist signifikant geringer als der Hkt der Kontrollgruppe.

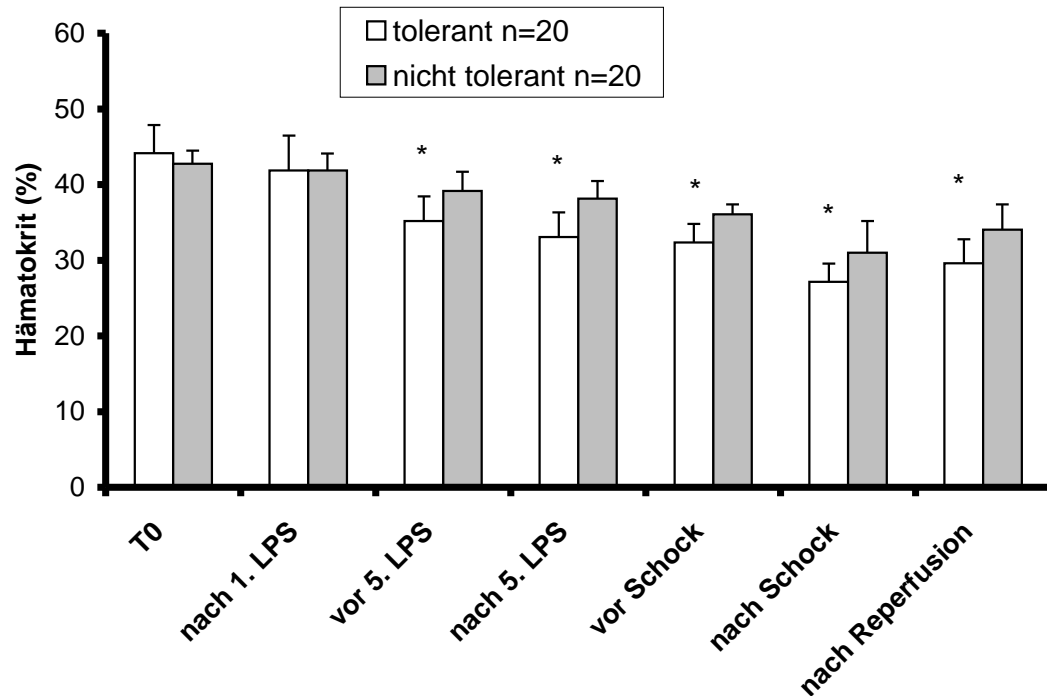


Abb. 4: Verlauf des Hämatokrits während Toleranzinduktion und hämorrhagischem Schock (Mittelwert + Standardabweichung) * = $p < 0,05$, ungepaarter T-Test

Der Hämatokritwert fällt in beiden Gruppen während der Vorbehandlungszeit ab, was durch die Injektionen von Kochsalzlösung zu erklären ist. Auffällig ist, dass der Hämatokritwert in der mit LPS behandelten Gruppe im gleichen Masse abfällt, jedoch signifikant geringer ist. Dies könnte ein Zeichen für induzierte Endotoxintoleranz sein, da LPS-Gaben normalerweise durch $\text{TNF}\alpha$ -vermittelte Bildung von Adhäsionsmoleküle und Leukozytenadhäsion am Endothel zu einem Verlust intravasaler Flüssigkeit ins Interstitium führt. Da dieser Flüssigkeitsverlust anscheinend nicht eintritt und es sogar zu einer Verdünnung des Blutes kommt könnte dies ein Hinweis auf eine Steigerung von Gegenregulationsmechanismen hinweisen.

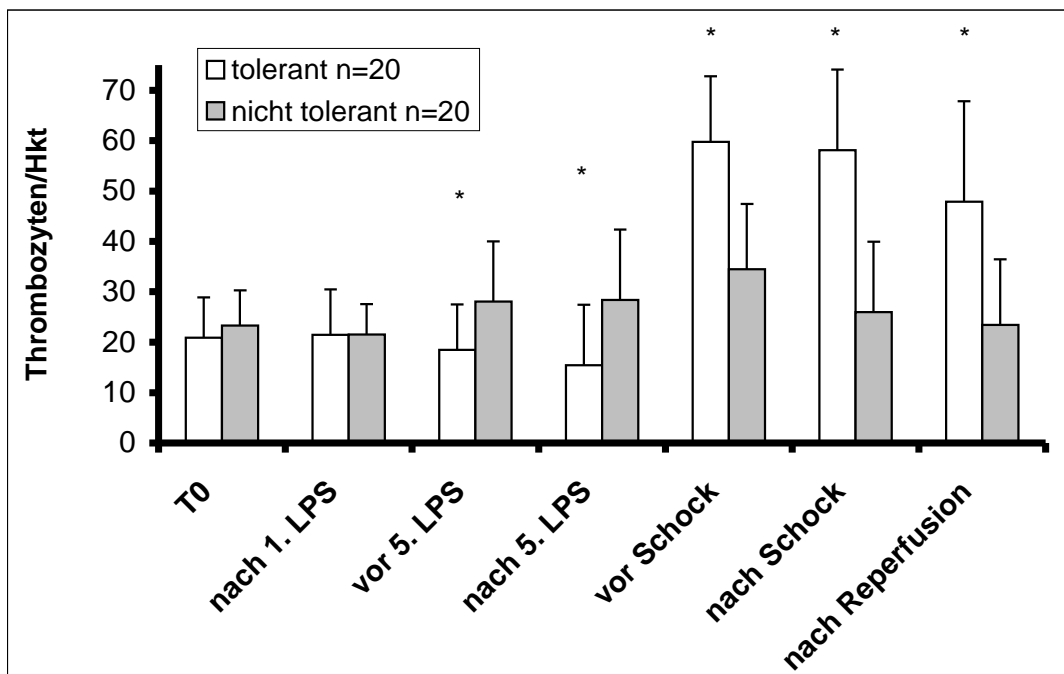


Abb. 5: Verlauf der Thrombozytenzahl normiert auf den Hämatokrit (Hkt) während Toleranzinduktion und hämorrhagischem Schock (Mittelwert + Standardabweichung). * = $p < 0,05$, ungepaarter T-Test

Man erkennt dass die täglichen LPS-Gaben zu einem Thrombozytenabfall führen. Die Thrombozyten fallen während der Toleranzinduktion zunächst im Vergleich mit der Kontrollgruppe signifikant ab, erholen sich jedoch in den 2 Tagen bis zum Schock und steigen signifikant an. Auch nach Schock und nach der Reperfusion sind im Blut der endotoxintoleranten Ratten im Vergleich mit normalen Ratten signifikant höhere Thrombozyten vorhanden.

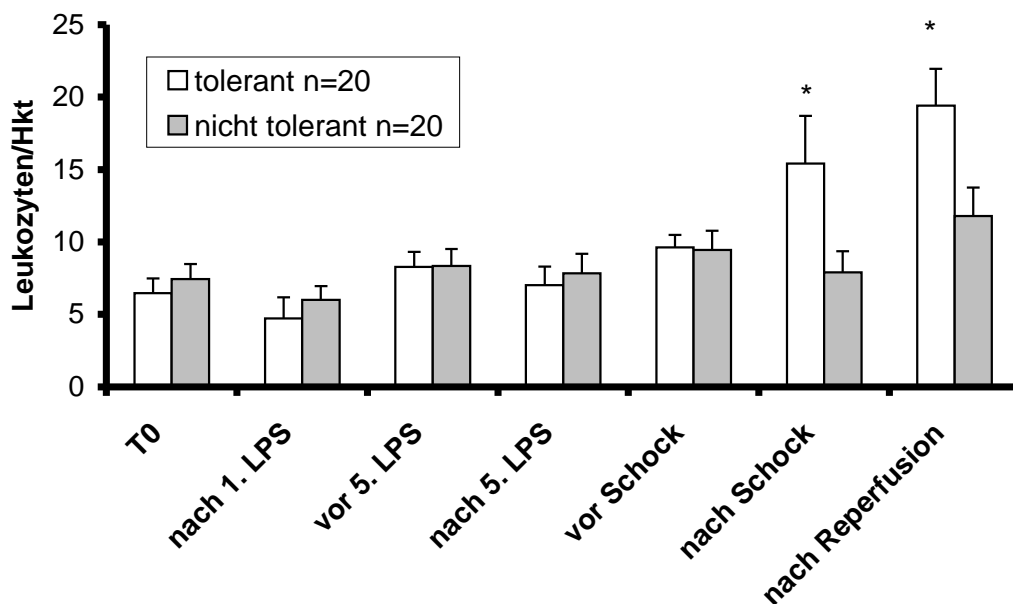


Abb. 6: Gesamtleukozyten während Toleranzinduktion und hämorrhagischem Schock genormt auf den Hkt (Mittelwert + Standardabweichung). * = $p < 0,05$, T-Test)

Der Verlauf der Leukozytenzahl ist in Abb. 6 als Mittelwert + Standardabweichung genormt auf den Hämatokrit dargestellt. Hämorrhagie führt bei endotoxintoleranten Ratten zu einer signifikanten Erhöhung der Leukozytenzahl im peripheren Blut. Diese Erhöhung ist im Blut normaler Ratte nach Hämorrhagie nicht nachzuweisen.

6.1.2 TNF α - Produktion

Endotoxintoleranz ist wie oben beschrieben mit einer verminderten Produktionskapazität von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α nach LPS-Stimulation verbunden. Anhand dieses Phänomens überprüften wir den Erfolg der Toleranzinduktion an der TNF α -Produktion nach LPS- Gabe *in vivo*. Hierzu war es zunächst nötig eine Zeitkinetik für die Produktion von TNF α nach LPS – Stimulation *in vivo* zu erstellen (Abb.8): dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der TNF α Serumkonzentration im Zeitverlauf nach einer intraperitonealen Injektion von 0,5ng/kg Kg LPS von 3 Ratten

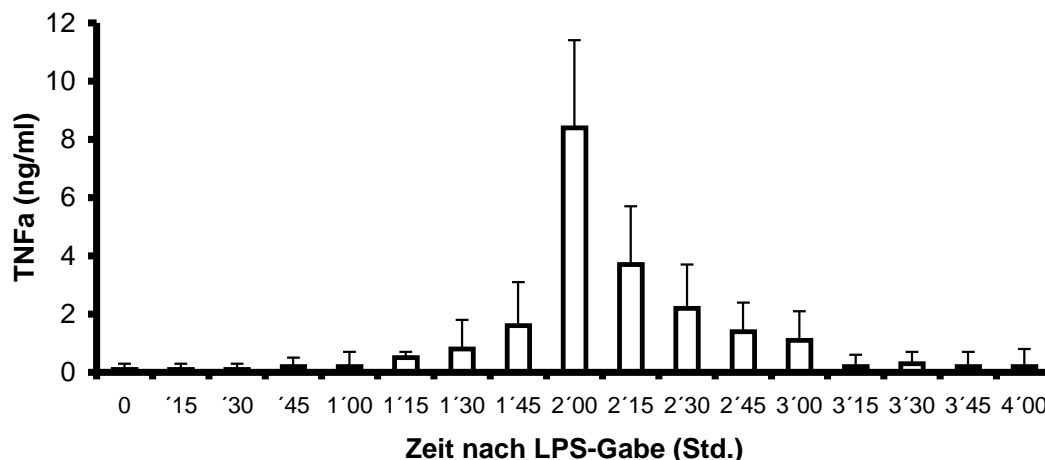


Abb.8: Dargestellt ist der Zeitverlauf des *in vivo* TNF α -Spiegels nach Gabe von 0,5 ng LPS von *E.coli*. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von 3 Ratten. Das Maximum der TNF α -Antwort nach LPS- Gabe liegt nach 2 Stunden nach intraperitonealer Injektion.

Man sieht, dass TNF α - Serumspiegel nur in einem recht kleinen Zeitfenster valide messbar sind. Aufgrund dieser Ergebnisse entschieden wir uns die *in vivo* TNF α - Spiegel jeweils 2 h nach LPS-Gabe am ersten und letzten Tag unserer Vorbehandlung zu bestimmen. Aus Abbildung 9 wird deutlich, dass diese nach der Vorbehandlung deutlich erniedrigt sind:

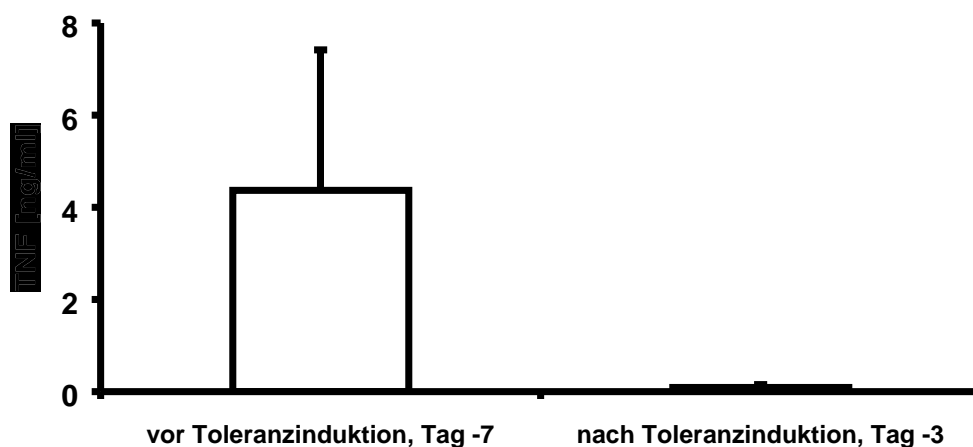


Abb. 9: Mittelwerte und Standardabweichung der *in vivo* TNF α Spiegel von 25 Ratten 2h nach intraperitonealer LPS- Gabe. An Tag -7 erfolgte die erste und an Tag -2 die letzte LPS (*E.coli*) Injektion im Rahmen des von uns verwendeten Schemas zur Toleranz-Induktion. Der TNF α -Gehalt ist nach erfolgter Toleranz-Induktion signifikant erniedrigt.

Die Reduktion der TNF α -Produktion von Blutkulturen nach Inkubation mit LPS ist ein weiterer Parameter für erfolgreiche Endotoxintoleranz-Induktion. Um dieses nachzuweisen wurde den Ratten vor der Toleranzinduktion am Tag -7 und nach der LPS-Vorbehandlung am Tag 0 Blut entnommen und dieses mit LPS (S.fr., 100ng/ml) inkubiert. Anschließend wurde der TNF α -Gehalt in den Überständen des Ansatzes im ELISA gemessen. Wie in Abbildung 10 dargestellt konnten wir auch in diesem Test eine stark erniedrigte TNF α -Produktion nach erfolgreicher Induktion von Endotoxintoleranz nachweisen:

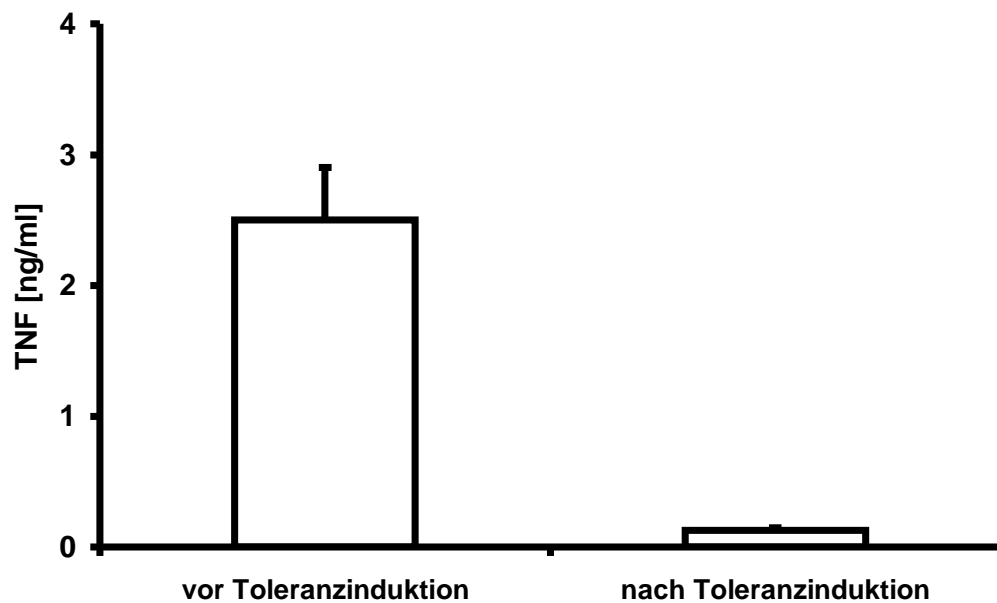


Abb. 10: Nach der Toleranz-Induktion ist die ex vivo TNF α -Bildungskapazität des Blutes signifikant erniedrigt. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von 25 Ratten.

In der Literatur wurde, wie in 1.5.5. dargestellt, die Bildung eines unbekanntes TNF α -Inhibitors beschrieben, der während der Induktion der Endotoxintoleranz gebildet wird und im Serum nachweisbar ist. Auch im Serum der endotoxintoleranten Ratten konnte diese TNF α inhibitorische Aktivität nachgewiesen werden. Sie bewirkt eine Abnahme der TNF α -Produktion sowohl von Rattenblut, als auch von einer Makrophagen-Zell-Linie. Anhand der Makrophagen-Zell-Linie stellten wir sicher, dass es bei diesem Phänomen um eine wirkliche Hemmaktivität und nicht auf eine zelltoxische Wirkung des Plasmas handelte. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Hemmtests

(Beschreibung siehe 3.3.5.) zur Identifizierung und Quantifizierung dieser Hemmaktivität mit Hilfe der Zell-Linie durchgeführt.

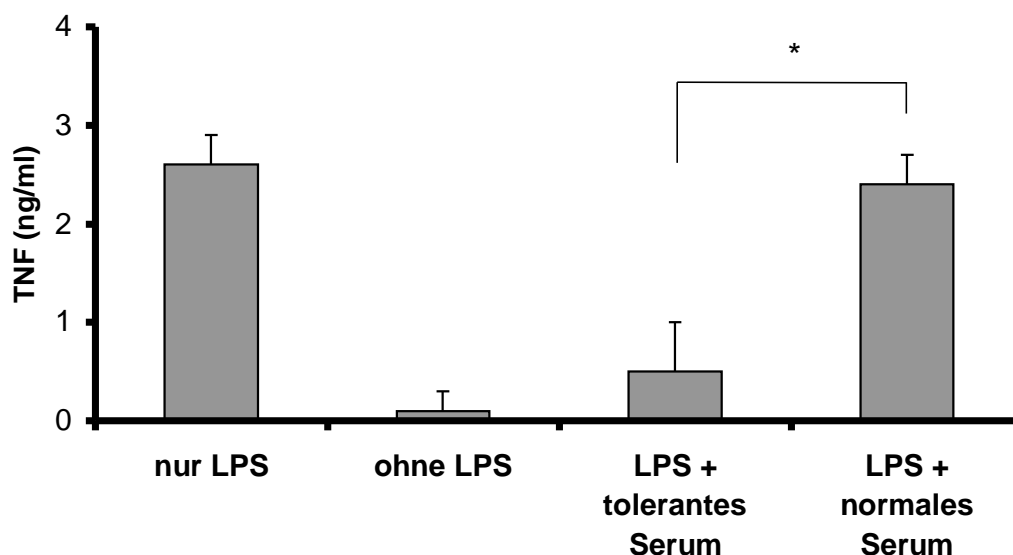


Abb. 11: TNF α -Produktion von Rattenvollblut nach Stimulation mit LPS (S.Friedenau, 100ng/ml, 4 Std.). Die TNF α -Produktion wird durch die Anwesenheit von 5% Serum einer endotoxintoleranten Ratte um ca. 80% reduziert ($p < 0,01$, T-Test). Normales Serum hat keinen Einfluss auf die TNF α -Synthese.

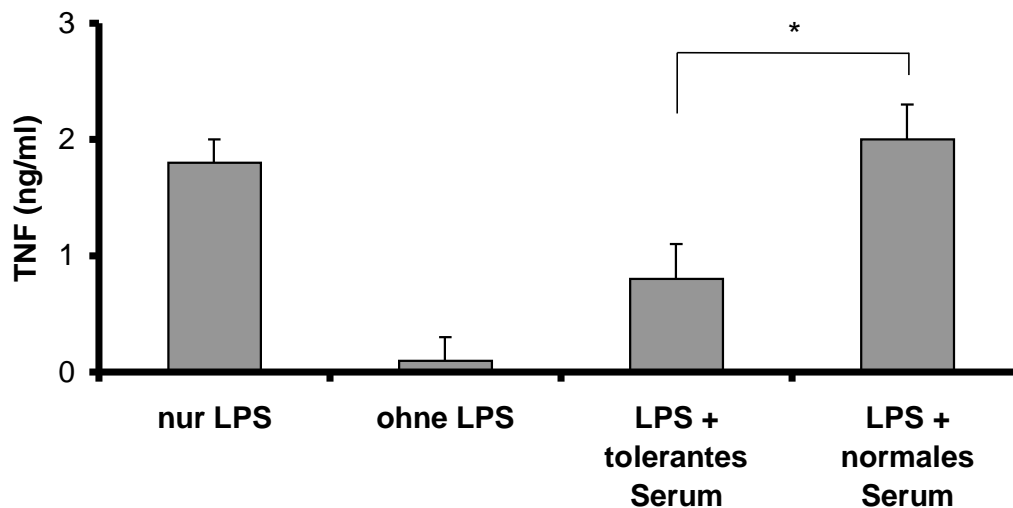


Abb. 12: TNF α -Produktion von murinen Makrophagen nach Stimulation mit LPS (S.Friedenau, 100ng/ml, 4 Std.). Die TNF α -Produktion wird durch die Anwesenheit von 5% Serum endotoxintoleranter Ratten um ca. 50% reduziert ($p < 0,01$, T-Test). Normales Serum hat keinen Einfluss auf die TNF α -Synthese.

6.2 Hämorrhagischer Schock

In der Literatur werden verschiedene Modelle für hämorrhagischen Schock erwähnt. Es werden Modelle mit und ohne Narkose, mit und ohne Heparinisierung und Modelle mit Einhaltung eines fixen Blutentnahmevolumentens im Gegensatz zur Einhaltung eines fixen Blutdrucks unterschieden. Zur Durchführung unserer Experimente wählten wir ein Tiermodell für hämorrhagischen Schock mit anästhesierten, heparinisierten Ratten unter Beibehaltung eines fixen arteriellen Mitteldrucks während der Hämorrhagie. Die Katheterimplantation und die lange Versuchsdauer sowie die Entnahme von Leberbiopsie machte eine Heparinisierung und Narkose unumgänglich. Tiermodelle mit einem fixen Blutentnahmevolumentens eignen sich mehr für Untersuchungen der neurohumeralen Regulationsmechanismen. Der zeitliche Ablauf unseres Modells wird in Abb. 13 noch einmal erläutert:

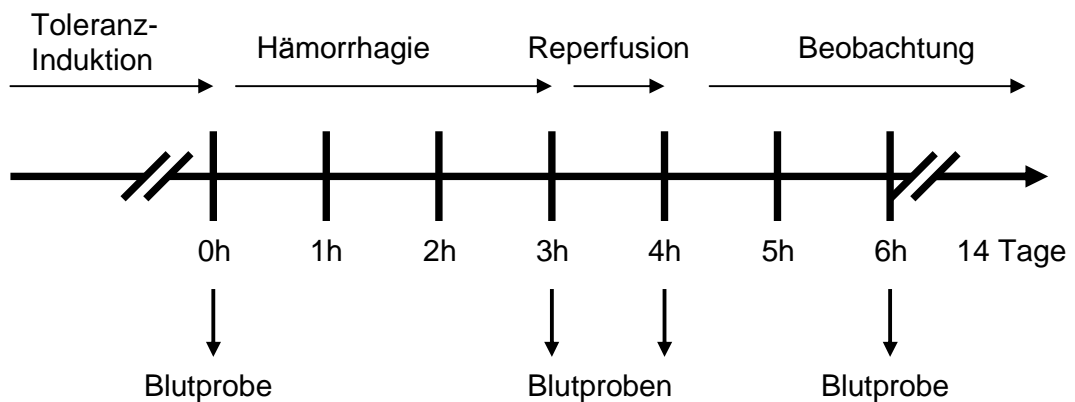


Abb. 13: Zeitlicher Ablauf des Versuchs „Hämorrhagischer Schock“. Nach der Vorbehandlung mit LPS (Kontrollgruppe NaCl) wurden die Ratten einer Hämorrhagie von 3 Stunden unterzogen. Nach der Reperfusion über 1 Stunde wurden sie 14 Tage beobachtet. Blutentnahmen erfolgten vor und nach der Hämorrhagie, sofort und 2 Stunden nach Reperfusion.

Als Kontrollgruppe wurden Ratten bei sonst gleicher Behandlung ohne Hämorrhagie und Reperfusion mitgeführt. In dem dargestellten Tiermodell wurde bei normalen Ratten eine Überlebensrate von 20% festgestellt. Die Induktion von Endotoxintoleranz verbesserte die Überlebensrate auf 80%:

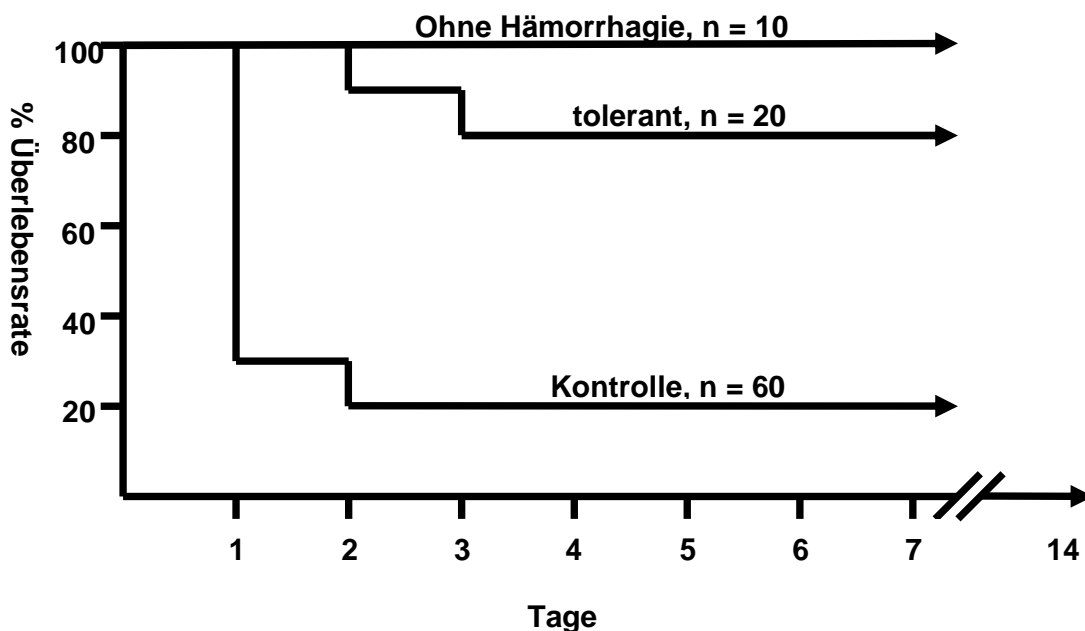


Abb. 14: Überlebensrate normaler und endotoxintoleranter Ratten nach hämorrhagischem Schock von 3 Stunden. Die Tiere versterben innerhalb von 3 Tagen nach Hämorrhagie. Endotoxintoleranz verbessert die Überlebensrate nach hämorrhagischem Schock von 20% auf 80%.

6.2.1 Klinische Parameter

Zunächst fiel auf, dass den endotoxintoleranten Ratten weniger Blut zum Einstellen eines arteriellen Mitteldrucks von 35 ± 5 mmHg entnommen werden musste als den Tieren der Kontrollgruppe.

Tab. 4: Blutentnahmenvolumen zur Einstellung des MAP auf 35 mmHg. Dargestellt ist das Volumen normalisiert auf das Körpergewicht. ($p < 0.01$, ungepaarter T-Test)

	tolerant, n = 20	Kontrolle, n = 20	T-Test
Blutvolumen in % des Gewichts	$8,4 \pm 0,6\%$	$7,0 \pm 0,3\%$	$p < 0,01$

6.2.2 Zytokinsynthese der Leber

Hämorrhagie führt durch die systemische Ischämie/Reperfusion einerseits und die Translokation von Endotoxin aus dem Darm andererseits, zu einer Zytokininduktion in der Leber. Hinsichtlich der deutlich verbesserten Überlebensrate endotoxintoleranter Versuchstiere untersuchten wir zunächst die Expression der mRNA proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ und IL-6, und zweitens das antiinflammatorische Zytokin IL-10 sowie das HSP70, welche beide in der Literatur schon als Mediatoren der Endotoxintoleranz diskutiert wurden. Es zeigte sich, dass ein hämorrhagischer Schock die Bildung der untersuchten Faktoren in der Leber induziert. Auffällig war, dass die 3 Stunden Hämorrhagie nicht zu einer messbaren Synthese von $\text{TNF}\alpha$, IL-6 und IL-10 führten. Erst nach der Reperfusion stiegen die Werte an, was darauf hinweisen könnte, dass auch die Schäden erst durch Reperfusion gesetzt werden. Unterschiede in der Reaktion auf hämorrhagischen Schock und Reperfusion zwischen endotoxintoleranten und normalen Ratten konnten wir beim $\text{TNF}\alpha$ und dem IL-6 feststellen: hämorrhagischer Schock führt zur Induktion von $\text{TNF}\alpha$ mRNA in der Leber. Die höchsten mRNA-Level zeigen sich nach der Reperfusion. Endotoxintoleranz führt zu einer signifikant reduzierten $\text{TNF}\alpha$ mRNA-Induktion gegenüber normalen Ratten.

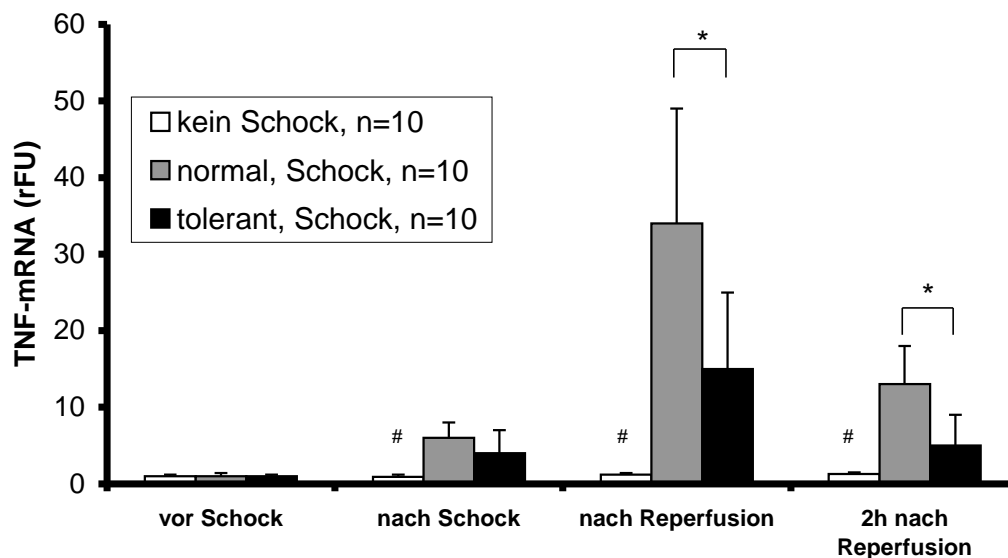


Abb. 15: $\text{TNF}\alpha$ mRNA in Leberbiopsien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 10 Ratten in relativen Fluoreszenzeinheiten (rFU). * = $p < 0,01$ tolerant vs normal, # = $p < 0,01$ kein Schock vs Schock, ungepaarter T-Test

Die Messung von IL-6 mRNA führte zu dem in Abb. 16 dargestellten Ergebnis: Hämorrhagischer Schock und Reperfusion führt zur Induktion von IL-6 mRNA in der Leber. Vor und nach Schock waren keine erhöhten IL-6 mRNA Levels zu erkennen. Die Reperfusion führt zu einer deutlichen Induktion von IL-6. Diese Induktion ist bei endotoxintoleranten Ratten signifikant gegenüber normalen Ratten erhöht, fällt jedoch nach 2 Stunden wieder ab.

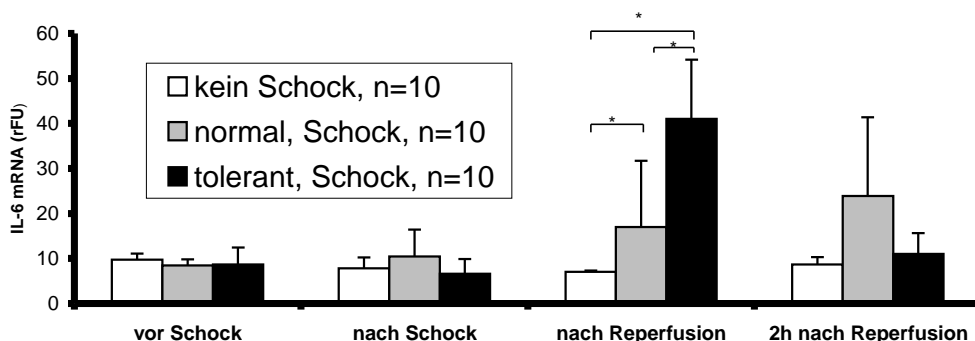


Abb. 16: IL-6 mRNA in Leberbiopsien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 10 Ratten in relativen Fluoreszenzeinheiten (rFU). * = $\rho < 0,05$, ungepaarter T-Test.

Hämorrhagischer Schock und Reperfusion führt zur Induktion von IL-10 mRNA in der Leber endotoxintoleranter, sowie unbehandelter Ratten. Die Induktion der Endotoxintoleranz führt ebenfalls zu einer Induktion von IL10-mRNA, ist jedoch nicht mit einer signifikant veränderten Produktion nach hämorrhagischem Schock im Vergleich zu normalen Tieren verbunden (Abb. 17).

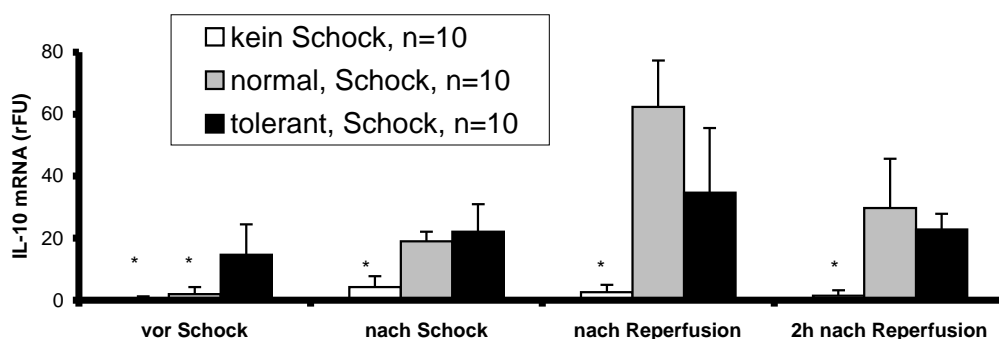


Abb. 17: IL-10 mRNA in Leberbiopsien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 10 Ratten in relativen Fluoreszenzeinheiten (rFU). (* = $\rho < 0,01$, ungepaarter T-Test)

Die Messung von HSP 70 mRNA in der Leber ergab die in Abb.19 dargestellten Ergebnisse. Hämorrhagischer Schock und Reperfusion führt zur Induktion von HSP70 mRNA in der Leber endotoxintoleranter, sowie unbehandelter Ratten. Ohne hämorrhagischen Schock wird die Bildung von HSP70 in diesem Experiment nicht induziert. Signifikante Unterschiede sind zwischen der endotoxintoleranten und der normalen Rattengruppe nicht nachzuweisen.

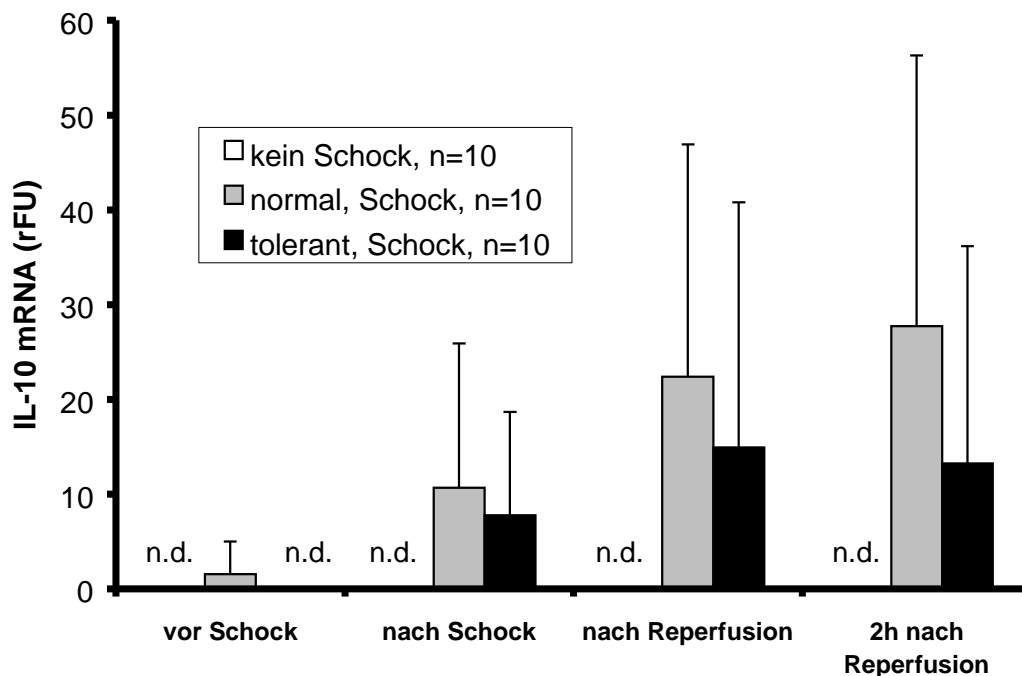


Abb. 19: HSP70 mRNA in Leberbiopsien. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von 10 Ratten in relativen Fluoreszenzeinheiten (rFU). (n.d. : nicht detektierbar)

6.2.3 TNF α - inhibitorische Aktivität

Den Versuchstieren zu folgenden Zeitpunkten Blutproben entnommen: vor Schock, nach Schock, nach Reperfusion, 2 Stunden nach erfolgter Reperfusion. Aufgrund des engen Zeitfensters, in dem TNF α -Spiegel nach dessen Induktion standardisierbar messbar sind (siehe Abb.8), war es nicht möglich reproduzierbar aussagekräftige TNF α -Spiegel im Serum der Versuchstiere zu bestimmen. Die gewonnenen Plasmaproben wurden auf eine TNF α -inhibitorische Aktivität hin untersucht. Hierzu verwendeten wir den unter 3.3.5 beschriebenen Stimulations- und Hemmtest mit murinen Makrophagen. Hierzu werden Makrophagen unter

Hinzugabe von zu testendem Serum mit LPS stimuliert und deren $\text{TNF}\alpha$ -Produktion im Überstand gemessen. Hierbei zeigt sich, dass Seren endotoxintoleranter Ratten die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion von Makrophagen signifikant hemmen. In Abb. Zeigt sich diese Hemmaktivität im Serum endotoxintoleranter Ratten. Auch im Serum normaler Ratten tritt nach hämorrhagischem Schock eine $\text{TNF}\alpha$ inhibitorische Aktivität auf:

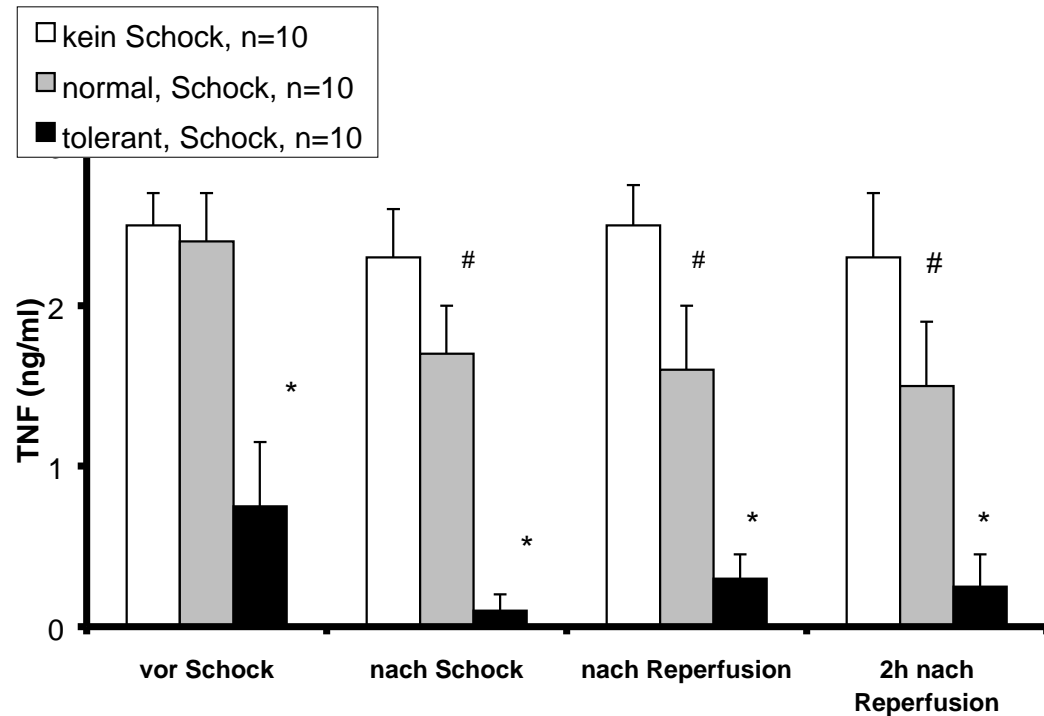


Abb. 20: Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion von murinen Makrophagen nach Stimulation mit LPS (S. friedenaue, 100ng/ml, 4h) unter Anwesenheit von 5% Plasma. Plasma endotoxintoleranter Ratten reduziert die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion signifikant * = $p < 0,01$ tolerant vs. normal, Schock. # = $p < 0,01$ normal, Schock vs. kein Schock. Ungepaarter T-Test)

6.2.4 Zytokinproduktion anderer Kompartimente

In der Literatur wird eine Suprimierung der Zytokinsynthese des Blutes nach hämorrhagischem Schock oder Trauma beschrieben. Andere Kompartimente wie z.B. die Milzzellen oder die Knochenmarkszellen, welche einen großen Pool von potentiell Zytokin-produzierender Zellen darstellen, wurden bisher nur in

begrenztem Umfang untersucht. Aus diesem Grund untersuchten wir in einem weiteren Experiment die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion von Blut, Milzzellen und Knochenmarkszellen 24 Stunden nach einem sublethalem hämorrhagischen Schock. Da in den vorangegangenen Versuchen nicht endotoxintolerante Ratten meist in den ersten 24 Stunden nach Schock verstarben war es nötig, das zuvor verwendete Zeitschema des hämorrhagischen Schocks derart zu verändern, dass eine 100%ige Überlebensrate erreicht werden konnte. Wir fanden heraus, dass dieses durch eine Verkürzung der Hämorrhagie von 3 h auf 40 min die erwünschte Verbesserung der Überlebensrate von 20% auf 100% erreicht werden konnte. Die Höhe des eingestellten arteriellen Mitteldrucks von 35 ± 5 mmHg wurde wie bei den anderen Untersuchungen beibehalten.

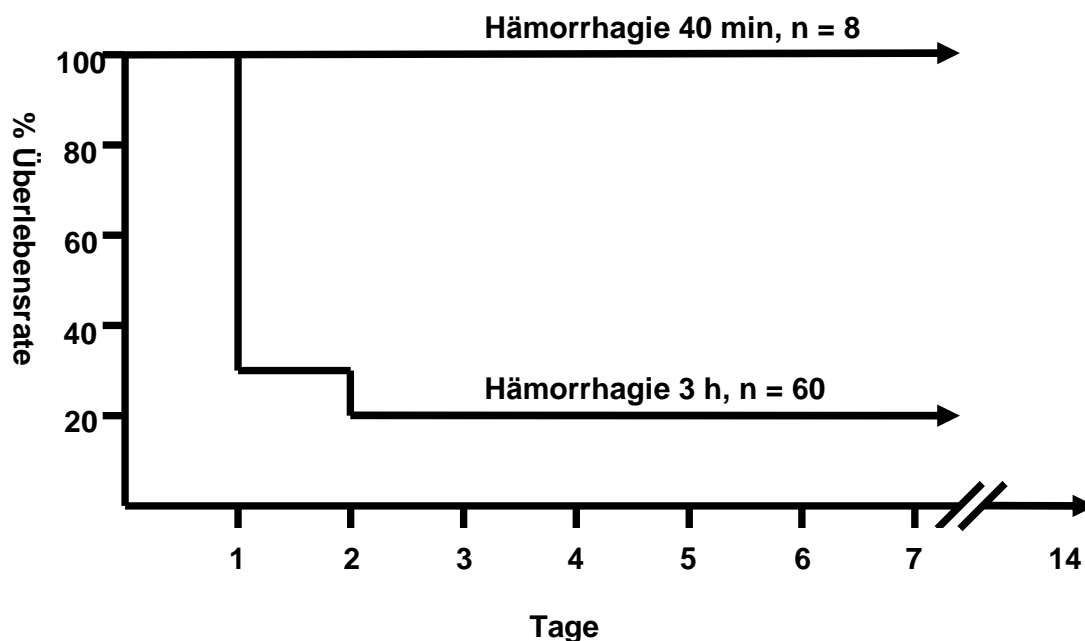


Abb. 21: Überlebensraten nach hämorrhagischem Schock. Hämorrhagie von 40 min (MAP 34 ± 5 mmHg) ergibt eine Überlebensrate von 100%, von 3 Stunden 20%.

Um die Fähigkeit des Blutes, von Milzzellen und von Knochenmarkszellen, Zytokine zu bilden zu überprüfen, wurden sie 24 nach dem oben beschriebenen hämorrhagischen Schock entnommen und mit verschiedenen LPS-Mengen stimuliert. Nach 16 Stunden Inkubation wurde die Konzentration von $\text{TNF}\alpha$ im Kulturüberstand gemessen. In Abb. 22 - 24 Ist die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion von LPS-

stimuliertem Vollblut, Milzzellen und Knochenmarkzellen 24 Stunden nach hämorrhagischem Schock im Vergleich zur TNF α -Produktion normaler Vollblut, Milz- und Knochenmarkzellen dargestellt. Man sieht in allen Abbildungen, dass die TNF α -Produktionsfähigkeit nach Hämorrhagie signifikant erniedrigt ist und auch durch hohe LPS-Zugabe nicht gesteigert wird.

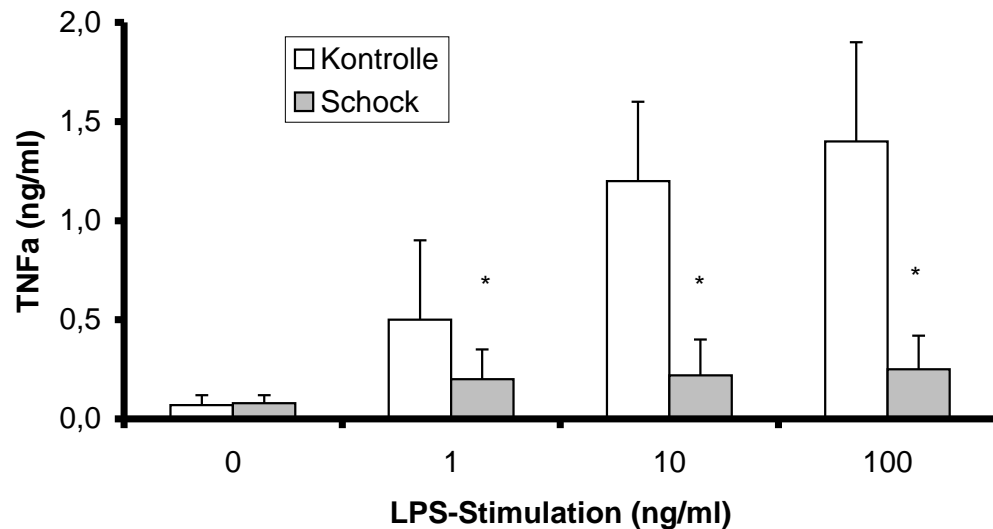


Abb. 22: LPS- stimulierte (S. fr., 6h) TNF α -Produktion des Blutes von 8 Ratten 2h nach hämorrhagischem Schock. Die Produktionskapazität für TNF α ist signifikant reduziert (* = $p < 0,01$, ungepaarter T-Test)

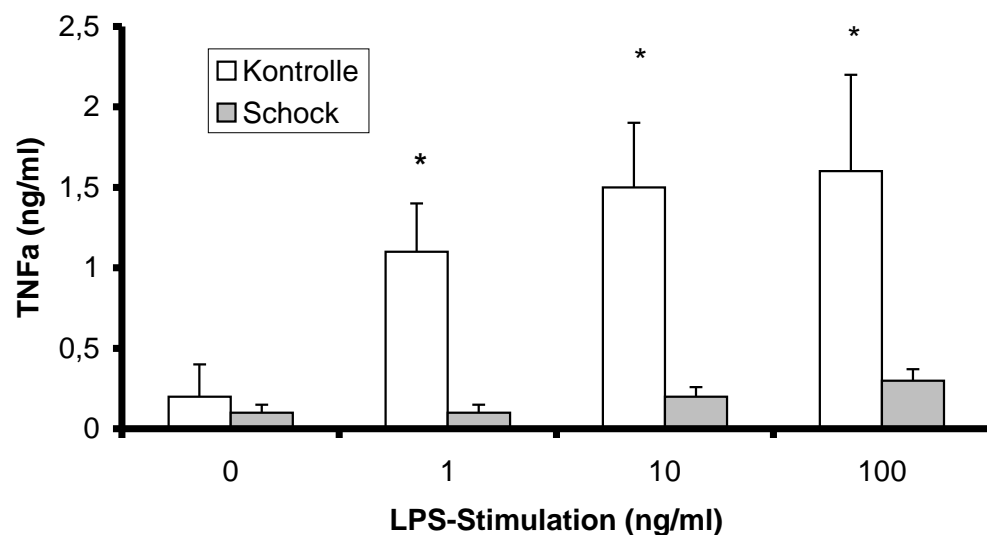


Abb. 23: : LPS- stimulierte (S. friedenaus, 6h) TNF α -Produktion von Milzzellen, 24 h nach hämorrhagischem Schock. Die Produktionskapazität für TNF α ist signifikant reduziert (* = $p < 0,01$, T-Test)

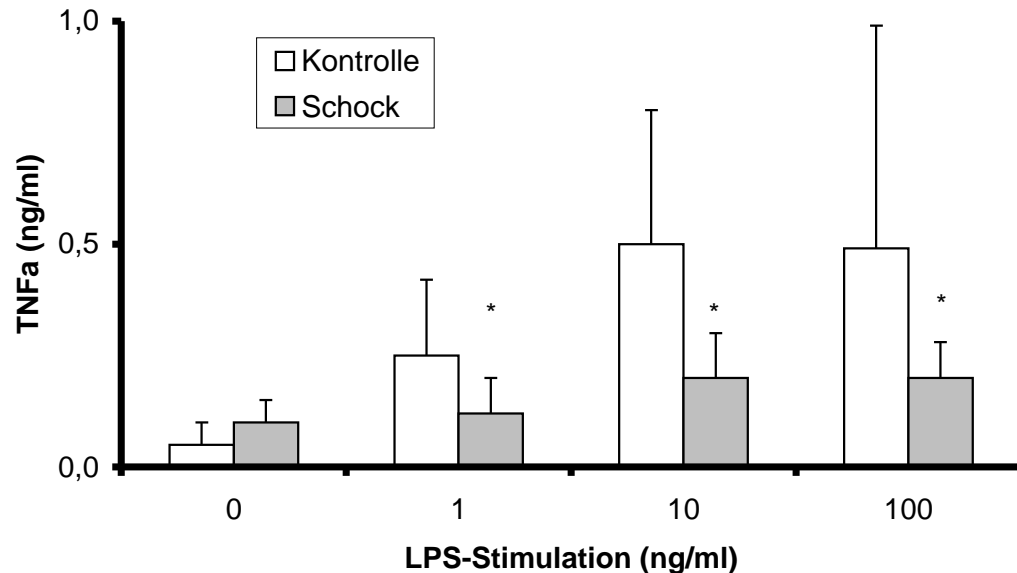


Abb. 24: LPS- stimulierte (*S. friedenaui*, 6h) TNF α -Produktion von Knochenmarkszellen, 24 h nach hämorrhagischem Schock. Die Produktionskapazität für TNF α ist signifikant reduziert (* = $p < 0,01$, T-Test)

6.3 Plasmatransfusion

Bereits 1960 hat Freedman gezeigt, dass Endotoxintoleranz vom frühen Typ durch Transfusion von Serum von einem endotoxintoleranten in ein normales Versuchstier übertragbar ist⁴³. Auch diese übertragene Endotoxintoleranz vermittelt einen Schutz gegen die letalen Wirkungen des LPS. Nachdem wir gezeigt hatten, dass Endotoxintoleranz vor hämorrhagischem Schock schützt, überprüften wir in einem weiteren Experiment, ob auch dieser Schutz durch Übertragung von Plasma übertragbar ist. Von besonderem Interesse war die Frage, ob die Transfusion des Plasmas nach stattgefundener Hämorrhagie noch Einfluss auf die Überlebensrate hat, da dies einem therapeutischen Ansatz nach starkem Blutverlust nahe kommt. Viele Studien haben in der Vergangenheit eine Suppression der Zytokinsynthese nach Trauma, Schock oder Hämorrhagie gezeigt und diskutiert, dass diese mit einer schlechten Prognose verbunden sei. Daraufhin wurden therapeutische Versuche unternommen diese Suppression mit Immunstimulantien wie GM-CSF zu überwinden. In diesem Zusammenhang war

die Frage, welche Auswirkungen die von uns gezeigte $\text{TNF}\alpha$ -inhibitorische Aktivität im Plasma nach dessen Transfusion entwickelt.

Abb. 25 veranschaulicht den Versuchsaufbau schematisch. Zur Induktion der Hämorrhagie wird den Ratten, analog zu den vorangegangenen Versuchen Blut entnommen. Das entnommene, heparinisierte Blut wird abzentrifugiert und das Plasma abgenommen. Anschließend wird die abgesehrten Zellen mit dem Plasma eines anderen Versuchstieres wieder aufgeschwemmt. Dieses Vollblutgemisch aus autologen Zellen und heterologem Plasma wird nun zur Reperfusion nach der Hämorrhagie verwendet. Durch dieses Procedere wird erreicht, dass, wie in Abb. 25 verdeutlicht, normale Ratten nach hämorrhagischem Schock mit Plasma endotoxintoleranter Ratten und umgekehrt reperfundiert werden. Als Kontrollgruppe dienen normale Ratten, die mit dem Plasma anderer normaler Ratten reperfundiert werden.

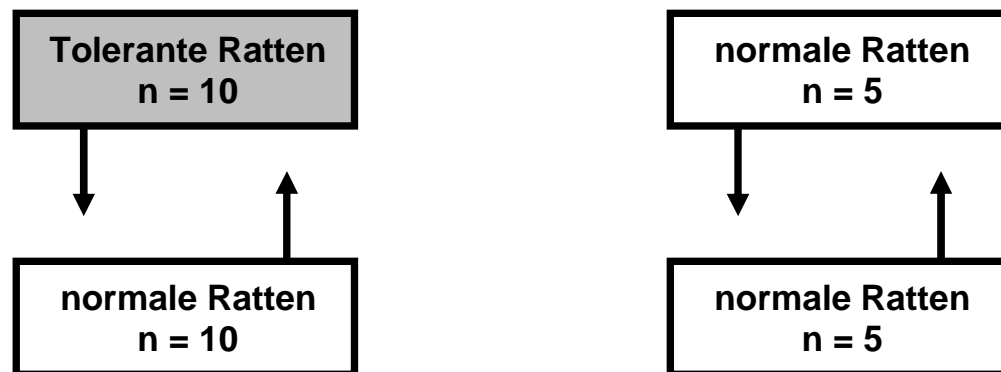


Abb. 25: Schematische Darstellung der Plasmatransfusion zwischen den Versuchsgruppen. Nach dem hämorrhagischen Schock wird das zur Schockinduktion entnommene und heparinisierte Blut zentrifugiert, und gegen das Plasma eines anderen Versuchstiers ausgetauscht. Zur Reperfusion wird folglich heterologes Plasma und autologe Zellen verwendet.

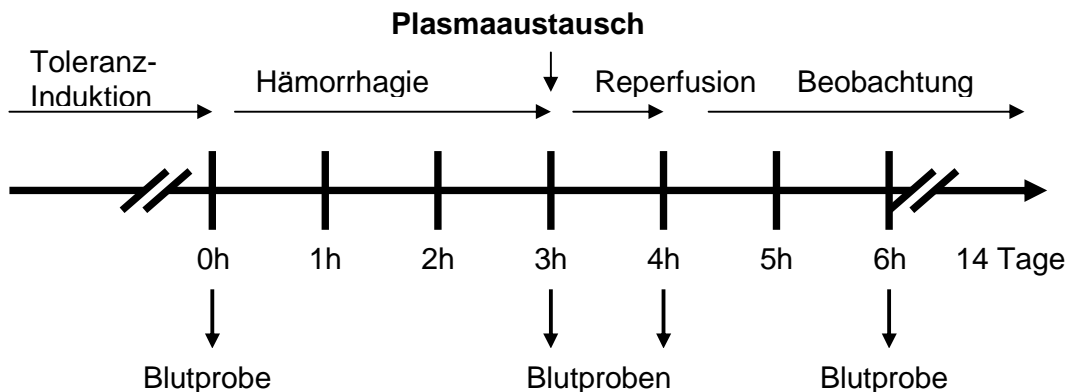


Abb. 26: Zeitlicher Ablauf des Versuchs „Plasmatransfusion“. Endotoxintolerante und normale Ratten wurden einer Hämorrhagie von 3 Stunden unterzogen. Nach dem Plasmaaustausch und der Reperfusion über 1 Stunde wurden sie 14 Tage beobachtet. Blutentnahmen erfolgten vor und nach der Hämorrhagie, sofort und 2 Stunden nach Reperfusion.

Abbildung 27 zeigt Überlebensraten nach von Ratten nach hämorrhagischem Schock. Die Transfusion von Plasma endotoxintoleranter Ratten auf normale Tiere verbessert die Überlebensrate nach hämorrhagischem Schock von 10% auf 50%. Die Transfusion von normalem Plasma in tolerante Ratten hat keinen Einfluss auf deren Überlebensrate nach Schock. Transfusion von heterologem, normalem Plasma beeinflusst die Überlebensrate normaler Ratten nicht signifikant.

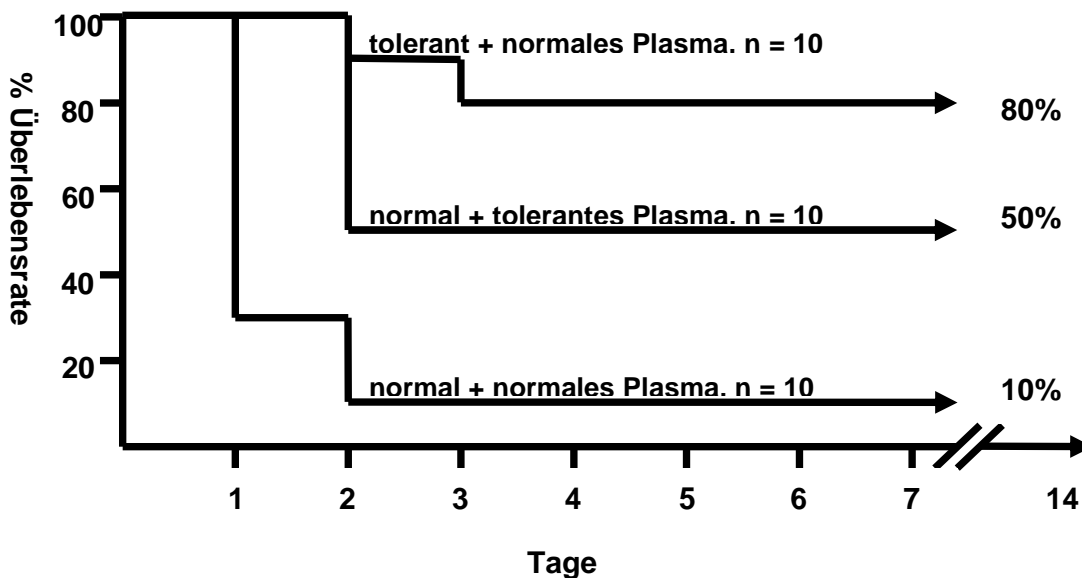


Abb. 27: Überlebenskurven von Ratten nach Hämorrhagie und Plasmatransfusion

Wie in den vorangegangenen Versuchen wurden den Ratten vor Schock, nach Schock, nach Reperfusion und 2 Stunden nach Reperfusion Blutproben entnommen. Aus diesen Proben wurde Serum entnommen und dieses auf das Vorhandensein einer Hemmaktivität untersucht. Wie aus den Vorversuchen bekannt war im Plasma endotoxintoleranter Ratten eine TNF α inhibierende Aktivität nachweisbar. Diese war auch nach der Reperfusion mit dem Plasma einer normalen Ratte weiter im gleichen Masse vorhanden. Wie in Abb. 28 gezeigt, konnte mit der Plasmatransfusion von einer toleranten Ratte in eine normale Ratte die inhibitorische Aktivität übertragen werden. Auch im Plasma dieser Tiere war nach Reperfusion eine inhibitorische Aktivität nachweisbar. In Abb. 28 wird noch ein weiteres Phänomen sichtbar, welches in den Vorversuchen ebenfalls schon nachgewiesen wurde. Auch im Serum normaler Ratten tritt in Folge der Hämorrhagie eine Aktivität auf, welche die TNF α -Produktion von Makrophagen hemmt.

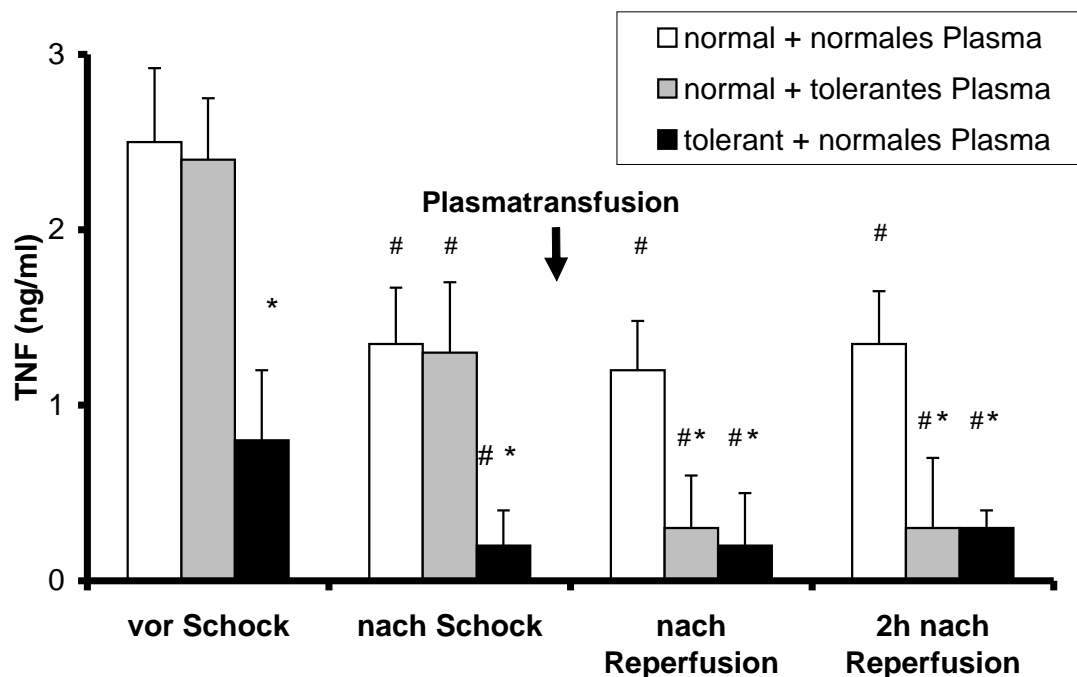


Abb. 28: LPS-stimulierte TNF α -Produktion von Makrophagen unter Hinzugabe von 5% Rattenserum. Mittelwert und Standardabweichung von 10 Ratten. * = $p < 0.01$ vs. gleicher Zeitpunkt, ungepaarter T-Test, # = $p < 0,01$ vs. Zeitpunkt vor Schock, gepaarter T-Test.

Aus den in Abbildung 27 und 28 dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass einerseits die Übertragung des durch Endotoxintoleranz erzielten Schutzes gegen

hämorrhagischen Schock durch Plasmatransfusion gelingt, und dass die andererseits die Überlebensrate nach Hämorrhagie verbessert wird. Die Tatsache, dass diese Plasmatransfusion erst nach dem hämorrhagischen Schock zur Reperfusion vorgenommen wurde, zeigt interessante therapeutische Möglichkeiten auf und ist ein weiterer Hinweis auf die Rolle der Reperfusion im Hinblick auf die Auslösung von Schädigungen

6.4 Präkonditionierung

Wie in Abb. 20 + 28 gezeigt, induziert ein hämorrhagischer Schock die Bildung einer $\text{TNF}\alpha$ - inhibitorischen Aktivität im Plasma, welche die durch Endotoxintoleranz bewirkte Hemmaktivität verstärkt. Nachdem gezeigt wurde, dass die Induktion einer solchen Aktivität durch Endotoxintoleranz zu einer Verbesserung der Überlebensrate nach hämorrhagischem Schock führt, überprüften wir, ob dieses auch durch einen subletalen Schock, der einen Tag vor der eigentlichen Hämorrhagie induziert wurde, zu erreichen ist. In der Literatur sind mehrere Studien veröffentlicht, die eine protektive Wirkung einer solchen ischämischen Präkonditionierung einzelner Organe beschreiben. Da man einen hämorrhagischen Schock als systemische Ischämie beschreiben kann, könnte erwartet werden, dass dieses Präkonditionieren durch Ischämie auch hier eine Protektion vor Hämorrhagie vermitteln.

Der schematische Ablauf des Versuchs ist in Abb. 29, dargestellt. Zur Präkonditionierung wurden die Ratten einem subletalen hämorrhagischen Schock von 60 min und anschließender Reperfusion von 30 min unterzogen. Nach einer Ruhezeit von 120 min erfolgte dann der hämorrhagische Schock unter den Bedingungen, die in den vorangegangenen Versuchen bei nicht vorbehandelten Ratten eine LD 80 induzierten. Wie in Abb 30 dargestellt überlebten 20% der unbehandelten Ratten den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen. Präkonditionierung verbesserte die Überlebensrate auf 70%.

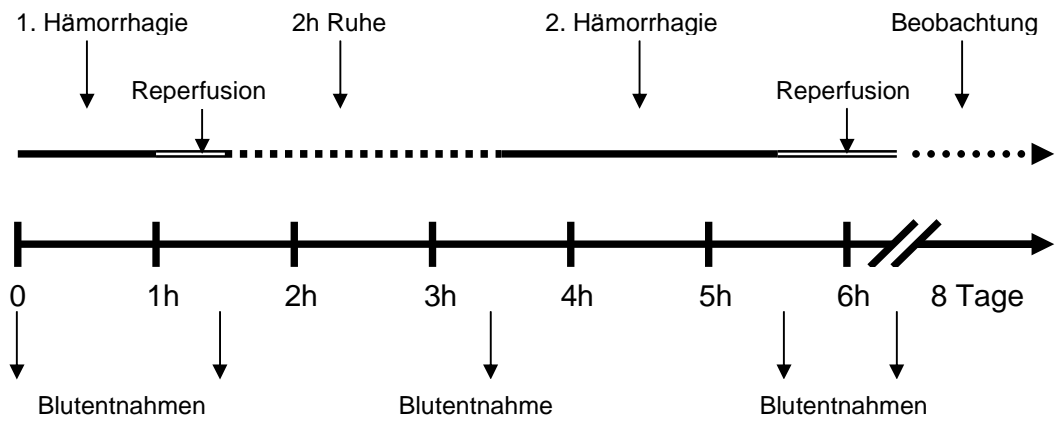


Abb. 29: Schematischer Zeitverlauf des Versuchs Präkonditionierung. Ratten werden durch einen subletalen Schock (MAP 35 ± 5 mmHg, 1h) präkonditioniert und 2 Stunden später einem hämorrhagischen Schock (MAP 35 ± 5 mmHg, 2h) ausgesetzt.

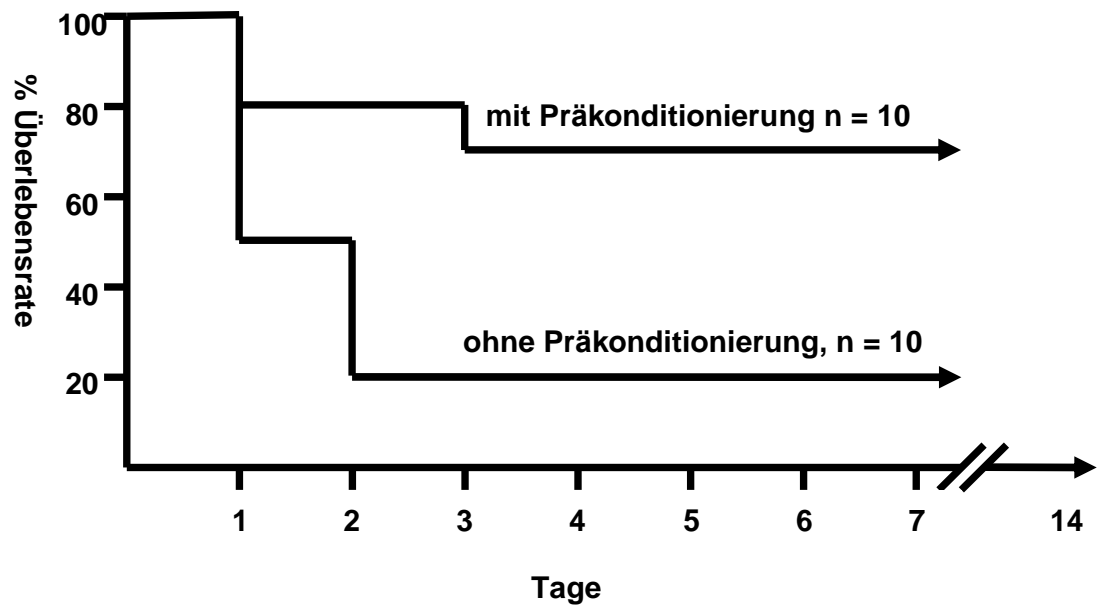


Abb. 30: Überlebensraten nach Hämorrhagischem Schock. Präkonditionierung durch kurzen subletalen Schock verbessert die Überlebensrate nach Hämorrhagie von 20% auf 70%

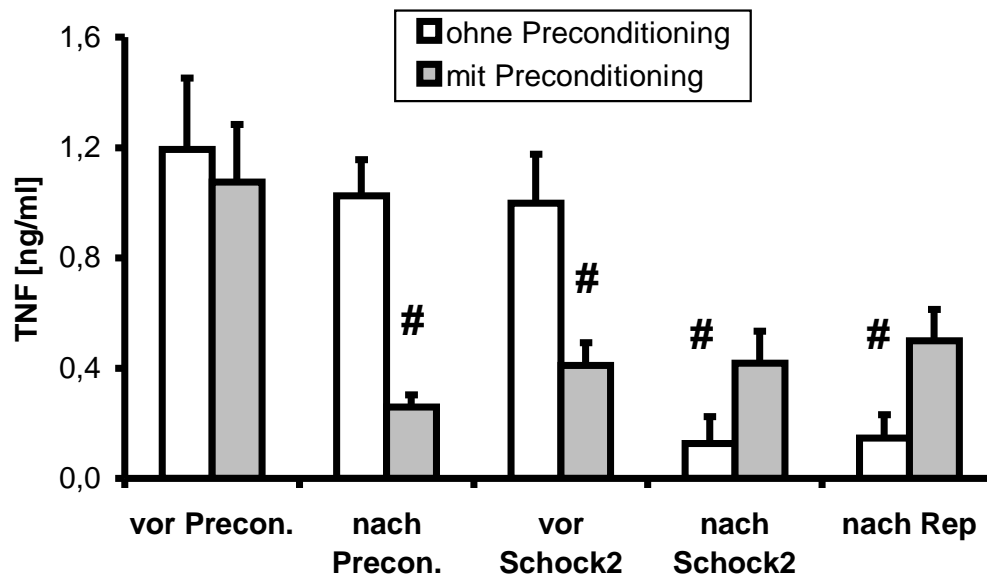


Abb. 31: Hemmtest auf RAW 264,7. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung von je 10 Ratten. (# = $p < 0,01$, T-Test)

Aus Abbildung 31 geht hervor, dass die Präkonditionierung sowie der hämorrhagische Schock eine Hemmaktivität der $\text{TNF}\alpha$ -Produktion induziert. In den präkonditionierten Ratten wird diese Hemmaktivität durch den zweiten Schock nicht verstärkt. Man erkennt, im Zusammenhang mit Abb 30, dass es gelingt die Ratten durch eine Präkonditionierung zu schützen. Hierbei könnte die $\text{TNF}\alpha$ inhibitorische Aktivität eine Rolle spielen.

6.5 Vergleich der Hemmaktivitäten

Wie bereits beschrieben, wurden in verschiedenen Versuchen mit unterschiedlichen Vorbehandlungen $\text{TNF}\alpha$ -Hemmaktivität im Plasma nachgewiesen. Es erscheint daher interessant, einen Vergleich der Seren aus endotoxintoleranten Ratten bzw. von Ratten nach hämorrhagischen Schock oder Präkonditionierung, bezüglich ihrer hemmenden Wirkung auf die $\text{TNF}\alpha$ -Synthese von Makrophagen, zu erstellen. Abbildung 32 vergleicht die hemmende Wirkung

verschiedener Plasmen auf die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion von Makrophagen. Man sieht, dass während der Endotoxintoleranz ein größeres Hemmpotential vorhanden ist als nach hämorrhagischem Schock oder Präkonditionierung. Das Ausmaß an Hemmaktivität nach Schock scheint nicht abhängig von der Länge der Hämorrhagie zu sein.

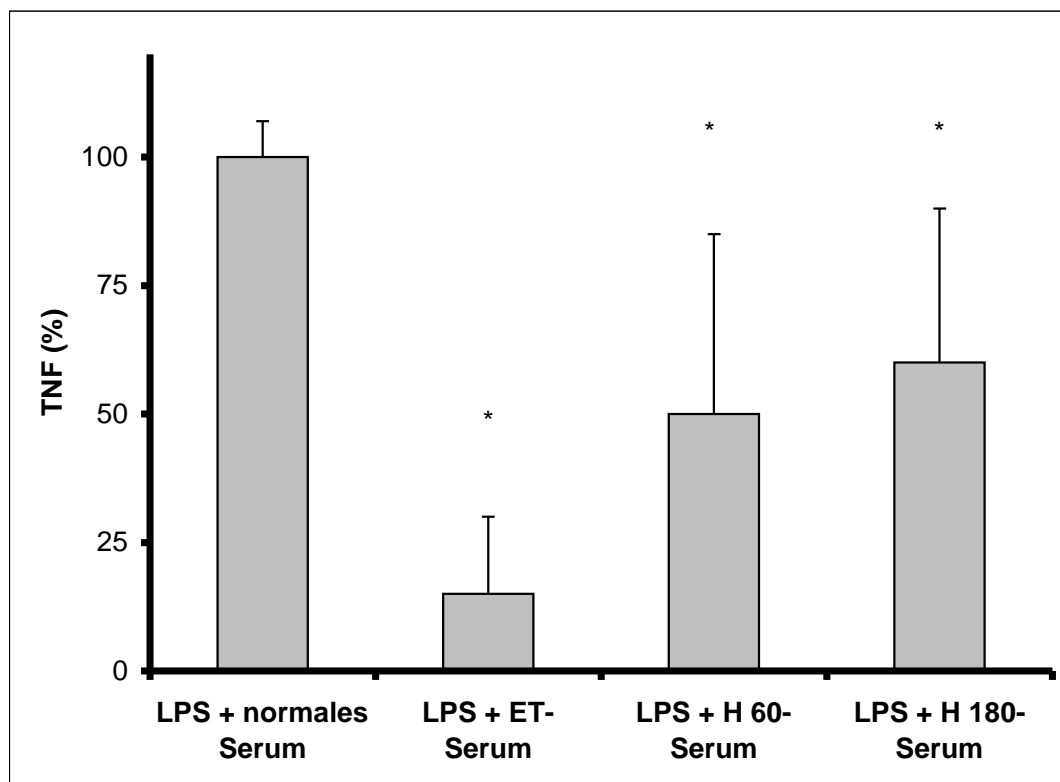


Abb. 32: $\text{TNF}\alpha$ -Produktion von Makrophagen nach LPS-Stimulation in Anwesenheit von Rattenserum in % der Produktion mit normalem Serum. ET-Serum = 5% Serum endotoxintoleranter Ratten, H60/H180 = 5% Rattenserum nach 60/180min Hämorrhagie Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von $n=10$ Tieren pro Gruppe. * = $p < 0,01$, ungepaarter T-Test. Kontrollansätze mit 5% der Seren ohne LPS-Stimulation ergaben keine signifikante $\text{TNF}\alpha$ Produktion von Makrophagen.

7 Diskussion

Zu Beginn meiner Dissertation wurden folgende Arbeitshypothesen formuliert:

„Endotoxintoleranz schützt vor hämorrhagischem Schock.“

„Dieser Schutz ist mit der Bildung eines TNF α - Inhibitors assoziiert und durch Plasmatransfusion übertragbar“

Folgende Befunde sind in diesem Zusammenhang in der Literatur schon beschrieben worden:

- Endotoxintoleranz schützt vor Endotoxin- Schock^{51;56;90}
- Eine reduzierte TNF α -Bildung in endotoxintoleranten Mäusen Ratten und Menschen^{40;65;89;103}.
- Serumtransfer von endotoxintoleranten auf normale Ratten schützt vor Endotoxin- Schock^{42;43}.
- Endotoxintoleranz ist mit der Bildung eines TNF α - Inhibitors assoziiert^{37;90-92}.
- TNF α spielt eine Schlüsselrolle im hämorrhagischen Schock^{7;70;109}.

Wie passen diese Befunde mit unseren Beobachtungen und den Verläufen der Zytokine zusammen?

7.1 Verbesserung der Überlebensrate

Wir konnten zeigen, dass Endotoxintoleranz die Überlebensrate nach hämorrhagischem Schock verbessert (Abb. 14). Die Endotoxintoleranz bedingt einen Schutz vor den schädigenden und letalen Wirkungen des Endotoxins. In der Literatur wird als Ursache für diesen Schutz die verminderte TNF α -Produktion angesehen^{13;40;89-91}. Auch wir konnten zeigen, dass die Synthese von TNF α während der Endotoxintoleranz im Blut (Abb. 9) und die Produktion von TNF α mRNA in der Leber endotoxintoleranter Ratten nach Reperfusion reduziert ist. Unsere These, dass diese Reduzierung der TNF α -Produktion die Ursache für die

protektive Wirkung ist, wird durch mehrere Untersuchungen gestützt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass $\text{TNF}\alpha$ eine zentrale Rolle im hämorrhagischen Schock spielt^{7;70;109} und $\text{TNF}\alpha$ -Antikörper verschiedene Organsysteme vor den Schädigungen während hämorrhagischem Schock schützen^{21;30;55;70}. Zum Anderen wurde beschrieben, dass nach dem Schock aus dem Darm transloziertes Endotoxin für die $\text{TNF}\alpha$ -Synthese in der Leber verantwortlich ist^{5-7;108}. In weiteren Studien wurde gezeigt, dass in der Leber gebildetes und in die Zirkulation gelangendes $\text{TNF}\alpha$ Schäden im gesamten Organismus hervorruft^{23-25;29;60;70;98}. Die Verbindung zwischen Endotoxin- Schock und hämorrhagischem Schock kann also durchaus hergestellt werden und vermag unsere Beobachtungen hinsichtlich der Überlebensrate zu erklären.

7.2 Natur der Endotoxintoleranz

Die Natur der Endotoxintoleranz ist noch weitgehend unklar und wird zum Teil kontrovers diskutiert. Allgemein anerkannt ist die Tatsache, dass die $\text{TNF}\alpha$ -Produktion von Monozyten/Makrophagen während Endotoxintoleranz gehemmt ist. Wie unter 6.1.2. dargestellt, konnten auch wir diese Hemmung in vitro und in vivo im Blut nachweisen. Neben der Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ wird durch LPS auch die Produktion von antiinflammatorischen Faktoren wie IL-10 oder Heat-Shock-Proteinen induziert. Diese antiinflammatorischen Substanzen wurden von einigen Autoren als Mediatoren der Endotoxintoleranz vermutet, da ihre Induktion mit der Ausbildung von Endotoxintoleranz einhergeht und möglicherweise vor den letalen Wirkungen des LPS schützt und diese Produkte die Bildung oder Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ hemmen können^{28;48;54;83}. Auch hier konnte gezeigt werden, dass nach Induktion der Endotoxintoleranz die Synthese von IL-10 mRNA in der Leber gesteigert ist, jedoch nach dem hämorrhagischen Schock keinen Unterschied hinsichtlich der $\text{TNF}\alpha$ -mRNA-Produktion zwischen toleranten und normalen Ratten vorkommt. Nach der Reperfusion kam es zwar in der Leber in beiden Versuchsgruppen zu einer Induktion von IL-10 mRNA, wobei die der Kontrollgruppe tendenziell höher war, jedoch zu einer starken Reduzierung der $\text{TNF}\alpha$ -mRNA-Produktion der

toleranten Ratten. Diese Ergebnisse deuten nicht auf eine Beteiligung von IL-10 bei der Endotoxintoleranz hin, vielmehr scheint eine Induktion von IL-10 Teil der physiologischen Reaktion des Organismus auf Schädigungen zu sein. Darüber hinaus ist gezeigt worden, dass in Tieren, auch nach Ausschaltung des IL-10-Gens, Endotoxintoleranz induzierbar ist⁹ und IL-10 in isolierten Makrophagen von endotoxintoleranten Versuchspersonen herunterreguliert ist³⁵.

Auch das HSP 70 konnte als Verursacher der Endotoxintoleranz in unseren Untersuchungen ausgeschlossen werden. Es ist nach der Toleranzinduktion nicht nachweisbar und wird im hämorrhagischen Schock und der Reperfusion in beiden Versuchsgruppen induziert. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass auch die HSP70-Produktion zur physiologischen Antwort des Organismus auf Ischämie/Reperfusion gehört und in unseren Versuchen eher als ein Marker für vermittelte Schädigungen gesehen werden könnte. Unterstützt wird diese These durch mehrere Arbeiten, in denen die Induktion von HSP70 in verschiedenen Organen durch verschiedenste Noxen oder nach Ischämie/Reperfusion beschrieben wurde^{39;75;78;102;104;111}.

Unklar bleibt weiterhin die Rolle des IL-6. Wir konnten zwar in der Leber endotoxintoleranter Ratten keine Synthese von IL-6 feststellen, jedoch war nach der Reperfusion die IL-6 mRNA-Produktion in toleranten Ratten signifikant erhöht und sank erst 2 Stunden danach unter den Level von normalen Ratten, deren IL-6-Expression eine steigende Tendenz aufwies. Im Gegensatz hierzu haben Flohé et al erhöhte IL-6 Spiegel im Blut von Ratten während der Induktion einer Endotoxintoleranz gezeigt. Sie stellten die These auf, dass IL-6 ein protektiver Mediator sei und an der frühen Endotoxintoleranz beteiligt sein könnte^{40;59}. In ihrer Diskussion bezogen sie sich auf Arbeiten von Aderka et al die beschrieben hatten, dass eine in vitro Vorinkubation von Monozyten über 24 Stunden mit IL-6 zu einer erniedrigten TNF α -Produktion nach LPS-Stimulation führte¹. Die Tatsachen, dass jedoch für die Ausbildung dieser Toleranz eine längere Vorinkubationszeit mit IL-6 nötig ist und die frühe Endotoxintoleranz sich schon wenige Stunden nach einer einzigen LPS-Gabe entwickelt, sprechen eher gegen diese These. Da eine IL-6-Bildung unter anderem durch TNF α gesteuert ist, könnten sich die von uns beobachteten, nach der Reperfusion erhöhten IL-6 mRNA-Spiegel in endotoxintoleranten Ratten durch eine aufgrund fehlender TNF α -Ausschüttung kompensatorischen Mehrproduktion von IL-6 erklären.

Beobachtungen, dass die Bildungsfähigkeit der Kupffer-Zellen für Zytokine (IL-1, IL-6, TNF α) nach Hämorrhagie und Reperfusion erhöht ist, sprechen für diese These und konnten durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden. Wichtig in diesem Zusammenhang ist die Tatsache, dass die höchsten mRNA-Level für Zytokine nicht unmittelbar nach dem hämorrhagischen Schock, sondern erst nach der Reperfusion von uns gefunden wurden. Diese Beobachtungen stehen im Gegensatz zu Studien anderer Autoren, die schon nach 30 min während einer Hämorrhagie TNF α nachweisen konnten²¹. Andere Autoren hingegen beschreiben, dass der Hauptauslöser, für eine Zytokinproduktion nach Ischämie/Reperfusion an isolierten Organen, die Reperfusion ist^{7;70;109}.

Als ursächlicher Faktor für die Endotoxintoleranz wurde in der Vergangenheit die Bildung eines nicht näher charakterisierten TNF α -Inhibitors beschrieben, der von Monozyten/Makrophagen gebildet und in das zirkulierende Blut abgegeben wird^{37;90-92}. Auch hier konnte ein solcher Inhibitor nachgewiesen werden. Frühere Beschreibungen anderer Autoren, die einen Einfluss bekannter antiinflammatorischer Faktoren ausschlossen, konnten - wie oben beschrieben - teilweise bestätigt werden. So wurde hier gezeigt, dass während Endotoxintoleranz im Plasma der Versuchstiere eine TNF α -inhibitorische Aktivität auftritt, die die TNF α -Produktion von Blut und Makrophagen um bis zu 90% hemmt. Diese inhibitorische Aktivität kann durch Transfusion von Plasma auf andere Versuchstiere übertragen werden. Dies resultiert in einer Verbesserung der Überlebensrate nach hämorrhagischem Schock. Ein ähnlicher Versuch ist in der Vergangenheit schon erfolgreich gewesen. Es gelang, den durch Endotoxintoleranz gegebenen Schutz vor LPS-Fieber durch Serumtransfusion zu übertragen⁴³. Während in diesen Experimenten die Serumtransfusion vor der Fieberinduktion vorgenommen wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit das Plasma endotoxintoleranter Ratten erst nach dem hämorrhagischen Schock in normale Versuchstiere infundiert und damit eine Übertragung der protektiven Wirkung erreicht. Diese Beobachtung wirft die Frage nach dem therapeutischen Nutzen einer solchen Behandlung auf und ihre Grundlagen müssen weiter erforscht werden. In diesem Zusammenhang erscheint die Beobachtung, dass die größte Zytokinexpression erst durch die Reperfusion induziert wird von besonderer Bedeutung. Es scheint sich zu bestätigen, dass die Hauptschädigung erst durch oder nach dieser Reperfusion vermittelt wird³⁸.

Kontrovers wird in der Literatur diskutiert, ob die TNF α -inhibitorische Wirkung allein für die protektive Wirkung der Endotoxintoleranz verantwortlich ist. In Tiermodellen gelang es zwar durch Gaben von TNF α -Antikörpern die Letalität nach Endotoxinschock oder Hämorrhagie zu senken. Klinische Studien mussten allerdings abgebrochen werden, da eine solche Behandlung mit einer Erhöhung der Mortalität bei Schock und Sepsis einherging.

7.3 Immunsuppression nach Hämorrhagie

Die hier dargestellten Untersuchungen über die Zytokinsynthese während und nach hämorrhagischem Schock erbrachten Ergebnisse, die auf den ersten Blick widersprüchlich zu sein scheinen. Auf der einen Seite konnte sofort nach der Hämorrhagie/Reperfusion eine Induktion proinflammatorischer Zytokine (IL-6, TNF α) in der Leber nachgewiesen werden, auf der anderen Seite konnte eine verminderte TNF α -Produktionskapazität sowohl des Blutes 2 Std. nach Reperfusion, als auch von Milzzellen und von Knochenmarkzellen 24 Std. nach hämorrhagischem Schock beobachtet werden. Des Weiteren konnte eine TNF α -inhibitorische Aktivität im Plasma der Versuchstiere nach Hämorrhagie festgestellt werden, die sofort nach dem Schock im Plasma detektierbar ist. Wie passen diese Beobachtungen mit früheren Untersuchungen in der Literatur zusammen? Das Vorhandensein einer reduzierten TNF α Produktionskapazität wurde nach verschiedenen klinischen und experimentellen Versuchsansätzen, die mit Schock und anderen Ursachen für Zellschädigung assoziiert waren, beschrieben. In Sepsispatienten korreliert die TNF α Bildungsstörung von zirkulierenden Monozyten mit einer schlechten Prognose⁷⁶. Auch in der frühen Phase nach schwerem Trauma^{36;67} und nach thoraxchirurgischen Eingriffen mit kardiopulmonalem Bypass¹⁵ wurde eine verminderte TNF α -Produktion des Blutes nach *ex vivo*- Stimulation mit LPS beobachtet. In Tiermodellen des hämorrhagischen Schocks zeigte sich eine Reduktion der LPS-stimulierten TNF α - und IL-1-Produktion der Milz oder Milzmakrophagen einen Tag nach Schock^{32;110}. Da TNF α essentiell für eine adäquate Immunantwort ist, erscheint es schlüssig, dass eine durch Hämorrhagie reduzierte TNF α -Bildungskapazität

mit einer höheren Empfindlichkeit gegenüber bakteriellen Infektionen und Sepsis verbunden ist⁹⁷.

Verschiedene antiinflammatorische Mediatoren wurden in der Vergangenheit mit diesem Phänomen in Verbindung gebracht. Da die Behandlung mit dem Cyclooxygenasehemmer Ibuprofen die Herunterregulierung von $\text{TNF}\alpha$ antagonisiert, wurde PGE_2 als ein möglicher Faktor angesehen³¹. Die Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 hemmen die $\text{TNF}\alpha$ -Synthese und können die Effekte eines hämorrhagischen Schocks auf das Immunsystem imitieren^{27;48;57}, sodass ihre Aktivität eine Erklärung für unserer Beobachtungen sein könnten.

Wie bereits erwähnt, konnte die Bildung einer $\text{TNF}\alpha$ -Produktion-inhibitorischen Aktivität im Plasma nach Schock nachwiesen werden. Da eine ähnliche Aktivität auch nach Induktion von Endotoxintoleranz auftritt, könnte es sich um ein ähnliches, wenn nicht sogar um das gleiche Phänomen handeln. Gegen diese Möglichkeit spricht jedoch die Tatsache, dass endotoxintolerante Versuchstiere unempfindlich gegen Endotoxin oder Bakteriämien reagieren, während Tiere oder Menschen nach hämorrhagischem Schock aufgrund der $\text{TNF}\alpha$ -Suppression besonders empfindlich gegenüber Bakterien sind und vermehrt eine Sepsis entwickeln^{36;67;68}. Auch die zeitlichen Abläufe sprechen gegen die Induktion von Endotoxintoleranz durch hämorrhagischen Schock. Während die $\text{TNF}\alpha$ -inhibitorische Aktivität schon 1 Std. nach Schock messbar ist, benötigt es für die Ausbildung von früher Endotoxintoleranz mehrere Stunden bis zu einem Tag. Dabei spielt es keine Rolle, ob die Endotoxintoleranz durch LPS-, IL-1- oder $\text{TNF}\alpha$ -Vorbehandlung induziert wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung durch subletale kurzzeitige Hämorrhagie die zuvor beschriebene Hemmaktivität induziert und die Überlebensrate nach einem nachfolgenden normalerweise letalen hämorrhagischen Schock verbessert. Dies könnte wiederum ein Hinweis auf Gemeinsamkeiten zwischen der Endotoxintoleranz und der Immunsuppression nach Hämorrhagie sein. In der Literatur finden sich Berichte über die Vorbehandlung, sogenanntem „Ischämischen Präkonditionieren“, verschiedener Organe wie Leber oder Herz mit kurzzeitiger Ischämie. Auch der gesamte Organismus wurde durch einen subletalen hämorrhagischen Schock präkonditioniert. Hierbei gelang es, die Schädigung der Organe durch verschiedene Noxen wie LPS oder Ischämie/Reperfusion nach einem solchen Präkonditionieren zu verringern.

Ratten zeigten nach Präkonditionierung durch Hämorrhagie eine supprimierte Zytokinsynthese. Ähnliche Effekte wurden nach Präkonditionierung mit Hitze, Kälte oder Zink beobachtet. Mehrere Studien machten für die protektive Wirkung dieser Vorbehandlungen die Induktion von intrazellulären Hitze-Schock-Proteinen wie HSP70 verantwortlich^{34;58;74;82;111}. Diese Proteine kontrollieren die Stabilität von Proteinen und gehören zur physiologischen Akute-Phase-Reaktion gegenüber unspezifischem Zell-Stress. Auch wir konnten die Bildung von HSP70 nach Hämorrhagie nachweisen. Hitze-Schock-Proteine entfalten ihre Wirkung intrazellulär und werden nicht ins Blut ausgeschüttet. Aus diesem Grund kann ihre Induktion keine Erklärung für das Auftreten der TNF α -inhibitorischen Aktivität im Plasma zu sein.

Die Tatsache, dass durch Hämorrhagie in der Leber die Bildung von IL-10 induziert wird, könnte aufgrund unserer Untersuchungen ein Hinweis darauf sein, dass IL-10, im Gegensatz zur Endotoxintoleranz, der verantwortliche Mediator bei der Immunsuppression nach Schock ist. Studien an polytraumatisierten Unfallopfern und Patienten nach kardiopulmonalem Bypass haben jedoch gezeigt, dass in diesen Ansätzen IL-10 keinen Einfluss auf die Hemmung der TNF α -Synthese hat^{15;36;68}.

Unterschiede zwischen Endotoxintoleranz und der Immunsuppression nach Schock erkennt man auch durch unsere Beobachtungen nach der Plasmatransfusion. Die Plasmatransfusion von endotoxintoleranten in normale Ratten macht diese ebenfalls endotoxintolerant. Beim hämorrhagischem Schock konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Übertragung von Seren endotoxintoleranter Tiere nach dem Schock ausreicht, um die Überlebensrate der Versuchstiere zu verbessern. Die protektive Wirkung des Präkonditionierens wird im Gegensatz dazu durch eine Vorbehandlung vermittelt. Die Transfusion von Plasma normaler Tiere nach Schock in nicht vorbehandelte Ratten nach Hämorrhagie hatte trotz der Gegenwart einer Hemmaktivität im übertragenen Plasma keine positiven Auswirkungen.

In vielen Studien wurde bisher die TNF α -Bildung von Blut nach Schock oder Sepsis untersucht. Nur wenig ist bisher in diesem Zusammenhang über die Rolle anderer Kompartimente bekannt. Die Milz, als ein wichtiger Zellpool für Leukozyten, wurde von Ertel et al untersucht³⁰. In ihr wurden gleichartige

Reaktionen nach hämorrhagischem Schock wie im zirkulierenden Blut gefunden. Diese Beobachtung konnte bestätigt werden.

Bisher gibt es keine Daten über das Verhalten von Knochenmarkzellen nach hämorrhagischem Schock. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die TNF α -Produktion von Knochenmarkzellen im gleichen Maße reduziert ist wie im Blut und in Milzzellen.

Die Leber stellt aufgrund ihrer anatomischen Lage wahrscheinlich das wichtigste Reservoir für Makrophagen im Hinblick auf hämorrhagischen Schock dar. Führt man sich vor Augen, dass 30% ihres Gesamtgewichts von Kupffer-Zellen stammt und dass nach Hämorrhagie aus dem Darm transloziertes Endotoxin über die Pfortader als erste Barriere auf die Leber trifft, wird klar, dass ihr eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung von weiteren Schädigungen des Organismus zukommen könnte. Unterstützt wird diese These durch Untersuchungen von Colletti et al, die gezeigt haben, dass es nach isolierter Ischämie/Reperfusion der Leber zu einer von TNF α vermittelten Schädigung der Lunge kommt^{23;25}. Die hier vorgelegten Untersuchungen haben gezeigt, dass es im Gegensatz zu Blut, Milz und Knochenmark in der Leber nach hämorrhagischem Schock nicht zu einer Supprimierung der TNF α -Synthese kommt, sondern dessen Bildung induziert wird. Diese Beobachtungen werden durch Studien bestätigt, die eine erhöhte Kapazität für die Bildung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 oder TNF α nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion beschreiben, im Blut oder in Peritonealmakrophagen jedoch eine supprimierte Zytokinsynthese feststellen. Eine Abnahme der Fähigkeit, Antigene zu präsentieren wurde im Gegensatz dazu in Kupffer-Zellen gleichermaßen wie in zirkulierenden Makrophagen festgestellt²¹. Zusammenfassend könnten diese Untersuchungen erklären, dass es einerseits durch die erhöhte Zytokinbildungskapazität der Leber nach hämorrhagischem Schock zu einer TNF α -vermittelten Schädigung des Organismus kommt und andererseits durch die Supprimierung des Blutes, der Milz und des Knochenmarks, sowie durch die verminderte Möglichkeit, Antigene zu präsentieren, zu erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Infektionen und Sepsis kommt.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass eine erniedrigte TNF α -Produktionsfähigkeit in der Endotoxintoleranz mit einer Protektion vor hämorrhagischem Schock verbunden ist. Des Weiteren konnten Literaturstellen

bestätigt werden, die zeigen, dass es auch nach hämorrhagischem Schock oder Polytrauma zu einer Abnahme der TNF α -Produktionskapazität kommt. Dieses führt bei schwerverletzten Patienten jedoch nach 1-3 Tagen zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber bakteriellen Infektionen und damit zu einer erhöhten Letalität durch Sepsis und Multiorganversagen. Während unserer Experimente konnten wir nach hämorrhagischem Schock keine Sepsis beobachten. Entweder starben die Tiere in den ersten 48 Stunden nach der Hämorrhagie oder erholten sich schnell und überlebten den Beobachtungszeitraum von 14 Tagen. Dies könnte an der von Natur aus erhöhten Resistenz der Ratten gegenüber bakteriellen Infektionen oder Endotoxin im Vergleich zu Menschen liegen, oder durch ein aggressiveres Keimspektrum auf Intensivstationen im Vergleich zu den Tierlabors hindeuten. Es erscheint sinnvoll, die hier begonnenen Untersuchungen an einem kombinierten Hämorrhagie – Sepsis Modell fortzuführen in 24 Stunden dem nach erfolgtem hämorrhagischem Schock eine Sepsis, z.B. durch Coecalpunktion, zu induzieren.

8 Zusammenfassung

In der hier vorgelegten Dissertation wurden Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse zur Klärung der Wirkungsmechanismen protektiver Eigenschaften der Endotoxintoleranz bezüglich hämorrhagischem Schock beitragen sollen. Besondere Aufmerksamkeit wurde hierbei der Rolle antiinflammatorischer bzw. TNF α -inhibitorischer Faktoren gewidmet.

Diese Versuche bedienten sich eines experimentellen Modells mit Ratten bei denen ein hämorrhagischer Schock ausgelöst wurde.

Die Induktion von Endotoxintoleranz führte in diesem Tiermodell zur Abschwächung der Letalität von 80% auf 20%. Dieser protektive Effekt geht mit dem Auftauchen einer TNF α -inhibitorischen Aktivität einher, die in vivo und in vitro nachgewiesen werden konnte. Während und nach hämorrhagischem Schock war die TNF α -Synthese von endotoxintoleranten Ratten signifikant erniedrigt, was anhand erniedrigter TNF α mRNA-Synthese in der Leber gezeigt wurde. Die Hemmaktivität ist nicht mit den antiinflammatorischen Faktoren IL-10 und HSP70 identisch. Beide Substanzen steigen während des hämorrhagischen Schocks bzw. bei der Reinfusion an. Es wurden jedoch keine Unterschiede zwischen normalen und endotoxintoleranten Tieren festgestellt. Unklar blieb die Rolle des IL-6, welchem möglicherweise eine protektive Funktion zukommen könnte und welches inhibitorisch auf die Synthese von TNF wirkt.

Ein guter Hinweis auf die möglicherweise entscheidende Rolle der TNF α -Hemmaktivität hinsichtlich der protektiven Wirkung der Endotoxintoleranz wurde durch folgendes Experiment erhalten: Nach hämorrhagischem Schock wurde normalen Ratten das Plasma endotoxintoleranter Ratten reperfundiert. Dadurch wurde die Überlebensrate von 10% auf 50% gesteigert. Die Reperfusion von endotoxintoleranten Ratten mit dem Plasma normaler Ratten hatte keinen Einfluss auf deren Überlebensrate von 80% nach Schock. Mit dem Plasma wurde die TNF inhibitorische Aktivität übertragen, wie sich in weiteren Versuchen zeigte. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass die Plasmatransfusion nach dem Schock vorgenommen wurde, welches möglicherweise für einen zukünftigen therapeutischen Ansatz von Bedeutung sein könnte.

Unabhängig vom Phänomen der Endotoxintoleranz konnte nach hämorrhagischem Schock eine TNF α -inhibitorische Aktivität im Serum der Ratten nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die TNF α -Produktion des Blutes, der Milzzellen und des Knochenmarks um bis zu 90% gehemmt war, während die Zytokinbildungsfähigkeit der Leber erheblich anstieg.

Es ist offen, ob die durch Endotoxintoleranz und die durch Hämorrhagie induzierbare TNF α -Hemmaktivität identisch ist. Es ergaben sich aber eher Hinweise für eine unterschiedliche Natur der dafür verantwortlichen Stoffe. Zwar konnte die Präkonditionierung durch einen leichten hämorrhagischen Schock die Überlebensrate nach schwerer Hämorrhagie von 10% auf 70% verbessern, es war jedoch nicht möglich, diesen Schutz durch Plasmatransfusion zu übertragen. Auch der unterschiedliche zeitliche Verlauf der Entwicklung der Hemmaktivität spricht gegen eine solche Identität.

9 Literatur

1. Aderka D, Maor Y, Novick D, Engelmann H, Kahn Y, Levo Y, Wallach D, Revel M: Interleukin-6 inhibits the proliferation of B-chronic lymphocytic leukemia cells that is induced by tumor necrosis factor-alpha or -beta. *Blood* 1993; 81: 2076-84
2. Atkins, E. Pathogenesis of fever. *Physiological Reviews* 40, 580-646. 1960.
3. Ayala A, Perrin MM, Meldrum DR, Ertel W, Chaudry IH: Hemorrhage induces an increase in serum TNF which is not associated with elevated levels of endotoxin. *Cytokine*. 1990; 2: 170-4
4. Bahrami, S., Redl, H., Leichtfried, G., Kober, C., Wilfing, C., and Schlag, G. Beneficial effects of anti-TNF monoclonal antibody in endotoxin-induced coagulation disorder in rats. *Circ.Shock* 34, 167. 1991.
5. Bahrami S, Redl H, Schlag G: [The intestine as the cause of infection and multiple organ failure]. *Wien.Klin.Wochenschr.Suppl.* 1998; 1: 2-10
6. Bahrami S, Schlag G, Yao YM, Redl H: Significance of translocation/endotoxin in the development of systemic sepsis following trauma and/or haemorrhage. *Prog.Clin.Biol.Res.* 1995; 392: 197-208
7. Bahrami S, Yao YM, Leichtfried G, Redl H, Marzi I, Schlag G: Significance of TNF in hemorrhage-related hemodynamic alterations, organ injury, and mortality in rats. *Am.J.Physiol.* 1997; 272: H2219-26
8. Bahrami S, Yao YM, Leichtfried G, Redl H, Schlag G, Di Padova FE: Monoclonal antibody to endotoxin attenuates hemorrhage-induced lung injury and mortality in rats. *Crit.Care Med.* 1997; 25: 1030-6
9. Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Menon S, Davidson N, Grunig G, Rennick D: Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J.Clin.Invest.* 1995; 96: 2339-47
10. Bertini R, Bianchi M, Ghezzi P: Adrenalectomy sensitizes mice to the lethal effects of interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J.Exp.Med.* 1988; 167: 1708-12
11. Beutler B, Cerami A: Cachectin (tumor necrosis factor): a macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. *Endocr.Rev.* 1988; 9: 57-66
12. Beutler B, Cerami A: Tumor necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator. *Annu.Rev.Biochem.* 1988; 57: 505-18
13. Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A: Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 1986; 232: 977-80
14. Beutler B, Milsark IW, Cerami AC: Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 1985; 229: 869-71
15. Börgermann, J., Friedrich, I., Feldt, T., Reidemeister, J. C., and Schade, F. U. Evidence of a circulating cytokine synthesis inhibitor during cardiopulmonary bypass. *Shock* 7, 403. 1997.
16. Brockhaus M, Schoenfeld HJ, Schlaeger EJ, Hunziker W, Lesslauer W, Loetscher H: Identification of two types of tumor necrosis factor receptors on human cell lines by monoclonal antibodies. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1990; 87: 3127-31

17. Brouckaert PG, Leroux-Roels GG, Guisez Y, Tavernier J, Fiers W: In vivo anti-tumour activity of recombinant human and murine TNF, alone and in combination with murine IFN-gamma, on a syngeneic murine melanoma. *Int.J.Cancer* 1986; 38: 763-9
18. Centanni, E. Untersuchungen über das Infektionsfieber - das Fiebergift der Bacterien. *Dtsch Med Wochenschr* 20, 148-150. 1894.
19. Centanni, E. Immunitätserscheinungen im experimentellen Fieber mit besonderer Berücksichtigung des pyrogenen Stoffes aus Typhusbakterien. *Klin Wochenschr* 21, 664-669. 1942.
20. Chapman, PB, Lester, TJ, and Cooper, ES. Clinical pharmacology of recombinant tumor necrosis factor in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 5, 1942-1965. 1987.
21. Chaudry IH, Ayala A, Ertel W, Stephan RN: Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects [editorial]. *Am.J.Physiol.* 1990; 259: R663-78
22. Chedid L, Parant M, Boyer F, Skarnes RC: Nonspecific host responses in tolerance to the letal effect of endotoxins., *Bacterial endotoxin*. Edited by Landy M, Braun W. New Brunswick, Rutgers University Press, 1964, pp 500-16
23. Colletti LM, Burtch GD, Remick DG, Kunkel SL, Strieter RM, Guice KS, Oldham KT, Campbell DA, Jr.: The production of tumor necrosis factor alpha and the development of a pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion. *Transplantation* 1990; 49: 268-72
24. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM: The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology* 1996; 23: 506-14
25. Colletti LM, Remick DG, Burtch GD, Kunkel SL, Strieter RM, Campbell DA, Jr.: Role of tumor necrosis factor-alpha in the pathophysiologic alterations after hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat. *J.Clin.Invest.* 1990; 85: 1936-43
26. Creasey AA, Stevens P, Kenney J, Allison AC, Warren K, Catlett R, Hinshaw L, Taylor FB, Jr.: Endotoxin and cytokine profile in plasma of baboons challenged with lethal and sublethal *Escherichia coli*. *Circ.Shock* 1991; 33: 84-91
27. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G: Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL- 13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J.Exp.Med.* 1995; 181: 537-46
28. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE: Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J.Exp.Med.* 1991; 174: 1209-20
29. Doi F, Goya T, Torisu M: Potential role of hepatic macrophages in neutrophil-mediated liver injury in rats with sepsis. *Hepatology* 1993; 17: 1086-94
30. Ertel W, Morrison MH, Ayala A, Chaudry IH: Biological significance of elevated TNF levels: in vivo administration of monoclonal antibody against tnf following haemorrhage shock increases the capacity of macrophages to release TNF while restoring immunoresponsiveness. *Cytokine.* 1994; 6: 624-32
31. Ertel W, Morrison MH, Meldrum DR, Ayala A, Chaudry IH: Ibuprofen restores cellular immunity and decreases susceptibility to sepsis following hemorrhage. *J.Surg.Res.* 1992; 53: 55-61

32. Ertel W, Morrison MH, Wang P, Ba ZF, Ayala A, Chaudry IH: The complex pattern of cytokines in sepsis. Association between prostaglandins, cachectin, and interleukins. *Ann.Surg.* 1991; 214: 141-8
33. Favorite, GO and Morgan, HR. Effects produced by the intravenous injection in man of a toxic antigenic material derived from *Eberthella Thyphosa*: Clinical, hematological, chemical and serological studies. *J Clin Invest* 21, 589-599. 1942.
34. Fincato G, Polentarutti N, Sica A, Mantovani A, Colotta F: Expression of a heat-inducible gene of the HSP70 family in human myelomonocytic cells: regulation by bacterial products and cytokines. *Blood* 1991; 77: 579-86
35. Flach, R., Flohe, S., Laschinski, M., Hofmann, K., Kreuzfelder, E., and Schade, F. U. Interleukin-10 is downregulated in mononuclear cells from endotoxin tolerant humans. *J.Endotox Res* 4, 189-195. 1997.
36. Flach R, Majetschak M, Heukamp T, Jennissen V, Flohe S, Borgermann J, Obertacke U, Schade FU: Relation of ex vivo stimulated blood cytokine synthesis to post- traumatic sepsis. *Cytokine.* 1999; 11: 173-8
37. Flach, R. and Schade, F. U. Peritoneal macrophages from endotoxin-tolerant mice produce an inhibitor of tumor necrosis factor synthesis and protect against endotoxin shock. *J.Endotox Res* , 241-250. 1997.
38. Flach R, Speidel N, Flohe S, Borgermann J, Dresen IG, Erhard J, Schade FU: Analysis of intragraft cytokine expression during early reperfusion after liver transplantation using semi-quantitative RT-PCR. *Cytokine.* 1998; 10: 445-51
39. Flohe S, Dominguez Fernandez E, Ackermann M, Hirsch T, Borgermann J, Schade FU: Endotoxin tolerance in rats: expression of TNF-alpha, IL-6, IL- 10, VCAM-1 AND HSP 70 in lung and liver during endotoxin shock. *Cytokine.* 1999; 11: 796-804
40. Flohe S, Heinrich PC, Schneider J, Wendel A, Flohe L: Time course of IL-6 and TNF alpha release during endotoxin- induced endotoxin tolerance in rats. *Biochem.Pharmacol.* 1991; 41: 1607-14
41. Fraker DL, Stovroff MC, Merino MJ, Norton JA: Tolerance to tumor necrosis factor in rats and the relationship to endotoxin tolerance and toxicity. *J.Exp.Med.* 1988; 168: 95-105
42. Freedman, H. H. Further studies on passive transfer of tolerance to pyrogenicity of bacterial endotoxin. *J.Exp.Med.* 112, 619-634. 1960.
43. Freedman, H. H. Passive transfer to pyrogenicity of bacterial endotoxin. *J.Exp.Med.* 111, 453-463. 1960.
44. Freudenberg MA, Galanos C: Bacterial lipopolysaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. *Int.Rev.Immunol.* 1990; 6: 207-21
45. Galanos C, Freudenberg M: Tumor necrosis factor mediates endotoxin shock: the protective effects of antibodies and cortisone., *Tumor necrosis factor: structure, mechanism, action, role in disease and therapie.* Edited by Bonavida B, Granger G. Basel, Karger, 1990, pp 187-93
46. Galanos C, Freudenberg M, Katschinski T, Salomoa R, Mossman H, Kumazawa Y: Tumor necrosis factor and host response to endotoxin, *Bacterial endotoxic lipopolysaccharides.* Edited by Ryan JL, Morrison DC. Boca Raton, CRC Press, 1992, pp 75-104
47. Geller, P, Merril, ER, and Jawetz, E. Effects of cortisone and antibiotics on the lethal action of endotoxins in mice. *Proc Soc Exp Biol* 86, 716-725. 1954.

48. Gerard C, Bruyns C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenabeele P, Delvaux A, Fiers W, Goldman M, Velu T: Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J.Exp.Med.* 1993; 177: 547-50
49. Goris RJ: Shock, sepsis, and multiple organ failure: the result of whole-body inflammation., *Pathophysiologie of shock, sepsis, and organ failure.* Edited by Schlag G, Redl H. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, HongKong, Barcelona, Budapest, Springer-Verlag, 1993, pp 7-24
50. Greisman SE, Hornick RB: Mechanisms of endotoxin tolerance with special reference to man. *J.Infect.Dis.* 1973; 128: Suppl:265-76
51. Greisman SE, Hornick RB: The nature of endotoxin tolerance. *Trans.Am.Clin.Climatol.Assoc.* 1975; 86: 43-50
52. Greisman SE, Young EJ, Carozza FA, Jr.: Mechanisms of endotoxin tolerance. V. Specificity of the early and late phases of pyrogenic tolerance. *J.Immunol.* 1969; 103: 1223-36
53. Greisman SE, Young EJ, Woodward WE: Mechanisms of endotoxin tolerance. IV. Specificity of the pyrogenic refractory state during continuous intravenous infusions of endotoxin. *J.Exp.Med.* 1966; 124: 983-1000
54. Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S: Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J.Exp.Med.* 1993; 177: 1205-8
55. Jesmok G, Lindsey C, Duerr M, Fournel M, Emerson T, Jr.: Efficacy of monoclonal antibody against human recombinant tumor necrosis factor in E. coli-challenged swine. *Am.J.Pathol.* 1992; 141: 1197-207
56. Johnston CA, Greisman SE: Mechanisms of endotoxin tolerance, *Handbook of Endotoxin Vol 2 Pathophysiology of Endotoxin.* Edited by Hinshaw LB. Amsterdam, Elsevier, 1985, pp 359-91
57. Kim C, Schinkel C, Fuchs D, Stadler J, Walz A, Zedler S, von Donnersmarck GH, Faist E: Interleukin-13 effectively down-regulates the monocyte inflammatory potential during traumatic stress. *Arch.Surg.* 1995; 130: 1330-6
58. Klosterhalfen B, Hauptmann S, Tietze L, Tons C, Winkeltau G, Kupper W, Kirkpatrick CJ: The influence of heat shock protein 70 induction on hemodynamic variables in a porcine model of recurrent endotoxemia. *Shock* 1997; 7: 358-63
59. Klosterhalfen B, Horstmann-Jungemann K, Vogel P, Flohe S, Offner F, Kirkpatrick CJ, Heinrich PC: Time course of various inflammatory mediators during recurrent endotoxemia. *Biochem.Pharmacol.* 1992; 43: 2103-9
60. Koo DJ, Chaudry IH, Wang P: Kupffer cells are responsible for producing inflammatory cytokines and hepatocellular dysfunction during early sepsis. *J.Surg.Res.* 1999; 83: 151-7
61. Larrik, J. and Wright, S. Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-alpha. *FASEB J.* 4, 3215-3223. 1990.
62. Lazar G, Jr., Lazar G, Agarwal MK: Modification of septic shock in mice by the antigluocorticoid RU 38486. *Circ.Shock* 1992; 36: 180-4
63. Lewis FR, Krupski WC, Trunkey DD: Management of the injured patient., *Current surgical diagnosis and treatment.* Edited by Way LW. San Mateo, Appleton and Lange, 1988, pp 187-209

64. Libert C, Van Bladel S, Brouckaert P, Shaw A, Fiers W: Involvement of the liver, but not of IL-6, in IL-1-induced desensitization to the lethal effects of tumor necrosis factor. *J.Immunol.* 1991; 146: 2625-32
65. Mackensen A, Galanos C, Wehr U, Engelhardt R: Endotoxin tolerance: regulation of cytokine production and cellular changes in response to endotoxin application in cancer patients. *Eur.Cytokine.Netw.* 1992; 3: 571-9
66. Mainous MR, Ertel W, Chaudry IH, Deitch EA: The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation? *Shock* 1995; 4: 193-9
67. Majetschak M, Flach R, Heukamp T, Jennissen V, Obertacke U, Neudeck F, Schmit-Neuerburg KP, Schade FU: Regulation of whole blood tumor necrosis factor production upon endotoxin stimulation after severe blunt trauma. *J.Trauma.* 1997; 43: 880-7
68. Majetschak M, Flach R, Kreuzfelder E, Jennissen V, Heukamp T, Neudeck F, Schmit-Neuerburg KP, Obertacke U, Schade FU: The extent of traumatic damage determines a graded depression of the endotoxin responsiveness of peripheral blood mononuclear cells from patients with blunt injuries. *Crit.Care Med.* 1999; 27: 313-8
69. Marshall J, Sweeney D: Microbial infection and the septic response in critical surgical illness. Sepsis, not infection, determines outcome. *Arch.Surg.* 1990; 125: 17-22; discussion 22-3
70. Marzi I, Bauer M, Secchi A, Bahrami S, Redi H, Schlag G: Effect of anti-tumor necrosis factor alpha on leukocyte adhesion in the liver after hemorrhagic shock: an intravital microscopic study in the rat. *Shock* 1995; 3: 27-33
71. Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ: Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J.Clin.Invest.* 1988; 81: 1925-37
72. McCord JM: Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N.Engl.J.Med.* 1985; 312: 159-63
73. Michie HR, Manogue KR, Spriggs DR, Revhaug A, O'Dwyer S, Dinarello CA, Cerami A, Wolff SM, Wilmore DW: Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N.Engl.J.Med.* 1988; 318: 1481-6
74. Mizushima Y, Wang P, Jarrar D, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH: Preinduction of heat shock proteins protects cardiac and hepatic functions following trauma and hemorrhage. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.* 2000.Feb;278(2):R352-R359. 2000; 278: R352-R359
75. Moseley PL: Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. *J.Appl.Physiol.* 1997; 83: 1413-7
76. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM: Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J.Clin.Invest.* 1991; 88: 1747-54
77. Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, Eichacker PQ, Hoffman WD, Kuo GC, Banks SM, MacVittie TJ, Parrillo JE: Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J.Exp.Med.* 1989; 169: 823-32
78. Nayeem MA, Elliott GT, Shah MR, Hastillo-Hess SL, Kukreja RC: Monophosphoryl lipid A protects adult rat cardiac myocytes with induction of the 72-kD heat shock protein: a cellular model of pharmacologic preconditioning. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1997; 29: 2305-10
79. Niehorster M, Tiegs G, Schade UF, Wendel A: In vivo evidence for protease-catalysed mechanism providing bioactive tumor necrosis factor alpha. *Biochem.Pharmacol.* 1990; 40: 1601-3

80. Pennica, D., Nedwin, G., Hayflick, J., Seeburg, P., Derynck, R., Palladino, M., Kohr, W., Aggarwal, B., and Goeddel, D. Human tumor necrosis factor: Precursor, structure and homology to lymphotoxin. *Nature* 312, 724-729. 1984.
81. Pfeiffer R. Untersuchungen über das Cholera Gift. *Z. Hyg* 11, 393-412. 1892.
82. Radford NB, Fina M, Benjamin IJ, Moreadith RW, Graves KH, Zhao P, Gavva S, Wiethoff A, Sherry AD, Malloy CR, Williams RS: Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996; 93: 2339-42
83. Randow F, Syrbe U, Meisel C, Krausch D, Zuckermann H, Platzer C, Volk HD: Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* 1995; 181: 1887-92
84. Redl H, Gasser H, Hallström S, Schlag G: Radical related cell injury, Pathophysiology of shock, sepsis, and organ failure. Edited by Schlag G, Redl H. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, HongKong, Barcelona, Budapest, Springer-Verlag, 1993, pp 92-110
85. Remick DG, Strieter RM, Lynch JP3, Nguyen D, Eskandari M, Kunkel SL: In vivo dynamics of murine tumor necrosis factor-alpha gene expression. Kinetics of dexamethasone-induced suppression. *Lab. Invest.* 1989; 60: 766-71
86. Rhee P, Waxman K, Clark L, Kaupke CJ, Vaziri ND, Tominaga G, Scannell G: Tumor necrosis factor and monocytes are released during hemorrhagic shock. *Resuscitation.* 1993; 25: 249-55
87. Rietschel ET: Chemical structure and biological activity of endotoxins (lipopolysaccharides) and lipid A. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1975; 287: 73-84
88. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Mamat U, Schmidt G, Loppnow H, Ulmer AJ, Zahringer U, Seydel U, Di Padova F: Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J.* 1994; 8: 217-25
89. Sanchez-Cantu L, Rode HN, Christou NV: Endotoxin tolerance is associated with reduced secretion of tumor necrosis factor. *Arch. Surg.* 1989; 124: 1432-5; discussion 1435-6
90. Schade FU, Flach R, Flohe S, Majetschak M, et al: Endotoxin tolerance, Endotoxin in Health and Disease. Edited by Brade H, Opal SM, Vogel SN, Morrison DC. New York, Marcel Dekker, 1999, pp 751-67
91. Schade FU, Franke C, Schlegel J, Rietschel ET: Formation of a TNF synthesis inhibitor in endotoxin tolerance. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1995; 392: 513-21
92. Schade, F. U., Schlegel, J., Hofmann, K., Brade, H., and Flach, R. Endotoxin tolerant mice produce an inhibitor of tumor necrosis factor-synthesis. *J. Endotox Res* 3, 455-462. 1996.
93. Schade UF: The role of prostacyclin in the protective effects of pentoxifylline and other xanthine derivatives in endotoxin action in mice. *Eicosanoids* 1989; 2: 183-8
94. Schade UF: Pentoxifylline increases survival in murine endotoxin shock and decreases formation of tumor necrosis factor. *Circ. Shock* 1990; 31: 171-81
95. Smith, R. and Baglioni, C. The active form of Tumor necrosis factor is a trimer. *J. Biol. Chem.* 262, 951-954. 1987.
Ref Type: Magazine Article
96. Snyder DS, Unanue ER: Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interleukin 1 production. *J. Immunol.* 1982; 129: 1803-5

97. Stephan RN, Kupper TS, Geha AS, Baue AE, Chaudry IH: Hemorrhage without tissue trauma produces immunosuppression and enhances susceptibility to sepsis. *Arch.Surg.* 1987; 122: 62-8
98. Tiegs G, Wolter M, Wendel A: Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. *Biochem.Pharmacol.* 1989; 38: 627-31
99. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ3, Zentella A, Albert JD: Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; 234: 470-4
100. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A: Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987; 330: 662-4
101. Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A: Cachectin/tumour necrosis factor. *Lancet* 1989; 1: 1122-6
102. Turner CP, Panter SS, Sharp FR: Anti-oxidants prevent focal rat brain injury as assessed by induction of heat shock proteins (HSP70, HO-1/HSP32, HSP47) following subarachnoid injections of lysed blood. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 1999; 65: 87-102
103. Urbaschek R, Urbaschek B: Tumor necrosis factor and interleukin 1 as mediators of endotoxin-induced beneficial effects. *Rev.Infect.Dis.* 1987; 9 Suppl 5: S607-15
104. Villar J, Ribeiro SP, Mullen JB, Kuliszewski M, Post M, Slutsky AS: Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. *Crit.Care Med.* 1994; 22: 914-21
105. Vogel SN, Kaufman EN, Tate MD, Neta R: Recombinant interleukin-1 alpha and recombinant tumor necrosis factor alpha synergize in vivo to induce early endotoxin tolerance and associated hematopoietic changes. *Infect.Immun.* 1988; 56: 2650-7
106. Waage A: Production and clearance of tumor necrosis factor in rats exposed to endotoxin and dexamethasone. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 1987; 45: 348-55
107. Wright SD: Multiple receptors for endotoxin. *Curr.Opin.Immunol.* 1991; 3: 83-90
108. Yao YM, Bahrami S, Leichtfried G, Redl H, Schlag G: Pathogenesis of hemorrhage-induced bacteria/endotoxin translocation in rats. Effects of recombinant bactericidal/permeability-increasing protein. *Ann.Surg.* 1995; 221: 398-405
109. Yao YM, Bahrami S, Redl H, Schlag G: Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha attenuates hemodynamic dysfunction secondary to intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Crit.Care Med.* 1996; 24: 1547-53
110. Zervos EE, Kramer AA, Salhab KF, Norman JG, Carey LC, Rosemurgy AS: Sublethal hemorrhage blunts the inflammatory cytokine response to endotoxin in a rat model. *J.Trauma.* 1999; 46: 145-9
111. Zhang YH, Takahashi K, Jiang GZ, Zhang XM, Kawai M, Fukada M, Yokochi T: In vivo production of heat shock protein in mouse peritoneal macrophages by administration of lipopolysaccharide. *Infect.Immun.* 1994; 62: 4140-4
112. Zuckerman SH, Qureshi N: In vivo inhibition of lipopolysaccharide-induced lethality and tumor necrosis factor synthesis by *Rhodobacter sphaeroides* diphosphoryl lipid A is dependent on corticosterone induction. *Infect.Immun.* 1992; 60: 2581-7

10 Danksagungen

- Vielen Dank an Dr. Martin Reuter, der mir Proben aus früheren Tierversuchen zur Verfügung gestellt, und mir das Arbeiten mit Versuchstieren ermöglicht und beigebracht hat.
- Größten Dank an Prof. Dr. rer nat F.U. Schade, der mir selbstständiges Arbeiten ermöglicht hat, und mir immer größte Unterstützung zukommen ließ.
- Einen ganz besonderen Dank an Dr. Sascha Flohé, dessen professioneller Sachverstand und Ideen entscheidende Impulse gaben und geben.
- Dankeschön an Karsten Hofmann für die „Grundausbildung“ im Labor.
- Vielen Dank an die MTAs Marion Laschinski, Heike Löffler und Anne Rösen für ihre Hilfe und größten Respekt vor der Ruhe mit der sie so manches „Chaos“ bewältigten.
- Ein großes Dankeschön an Senta Sabin und Heinz-Erik Neu für die exzellente Unterstützung bei der Probenaufbereitung und RNA-Isolierung.

- Allergrößten Dank an meine Eltern, meine Schwester und vor allem an meine liebe Frau, der diese Arbeit gewidmet ist.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Marcus Ackermann
Geburtsdatum/Ort	04.06.1971 in Cochem
Familienstand	verheiratet

Schulbildung

1977 - 1981	Margharethen- Grundschule Heimbach/Weis
1981 – 1990	Werner- Heisenberg- Gymnasiums, Neuwied
1990	Abitur

Zivildienst

1990 – 1992	DRK- Rettungsdienst, Neuwied
-------------	------------------------------

Berufstätigkeit

1992 – 1993	Rettungssanitäter, DRK- Rettungsdienst, Neuwied
-------------	--

Studium, Humanmedizin

1993 – 1995	Vorklinik, Martin - Luther - Universität Halle / Saale
1995 – 1999	Klinischer Studienabschnitt, Universität - Gesamthochschule - Essen
1999 - 2000	PJ, Evangelisches KRH, Oberhausen
Mai 2000	Drittes Staatsexamen

AiP

2000 – 2001	Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie am Universitätsklinikum Essen, Prof. Nast-Kolb
-------------	---

Promotion

1996 – 2001	Experimentelle Arbeiten zur Promotion in der Klinischen Forschergruppe Schock und Multiorganversagen, Prof.Dr.rer.Nat. F.U. Schade
-------------	---

