

# **Inflammation, SIRS und sepsis nach hepatobiliären Chirurgie: Ist Lipopolysaccharid bindenden Protein der Link?**

## **Hintergrund:**

LBP bindet an LPS und aktiviert eine entzündliche Kaskade. LBP ist ein Akut-Phase-Protein, dessen Stellenwert als Sepsismarker untersucht wird. LBP wird im Rahmen von Infektionskrankheiten hochreguliert, aber auch nach operativen Eingriffen.

Erweiterte Leberresektionen können durch die Entwicklung eines Leberversagens kompliziert werden. Leberversagen ist häufig verbunden mit der Translokation von Endotoxin und Bakterien, wodurch das Risiko für die Entwicklung eines systemischen inflammatorischen Syndroms bzw einer Sepsis deutlich erhöht wird. Wir haben in einer früheren Studie gezeigt, daß die Hochregulation von LBP mittels einer GCSF Vorbehandlung das Überleben im Modell der letalen 90% Leberresektion ermöglicht.

In der vorliegenden Studie möchten wir die Rolle von LBP für die Entwicklung einer post-operativen Entzündung, SIRS und Sepsis besser verstehen. Deswegen wurde ein neuer LBP-ELISA-Assay etabliert. Zum ersten haben wir das Expressionslevel von LBP nach hepatobiliären Operationen untersucht. Zum zweiten haben wir den Effekt einer Hochregulation von LBP in einem SIRS-Modell und zum dritten in einem Sepsis-Modell untersucht.

## **Methode:**

Der LBP-ELISA basiert auf der Bindung von LBP an immobilisiertem LPS.

1. An Leberproben und Seren von Tieren nach Leberresektionen unterschiedlichen Ausmaßes sowie nach warmer Ischämie und Lebertransplantation wurde die LBP-Expression, die Leberschädigung und die Expression der proinflammatorischen Zytokinen TNF $\alpha$  und IL6 untersucht. In einem Makrophagen-LPS-Stimulation Assay wurde das LBP aus dem Effluent kalt gelagerter Lebertransplantate mit und ohne Zugabe von inhibitorischem LBP-Blocking Peptid untersucht um die pro-inflammatorische Kapazität zu ermitteln.

2. Tiere mit LBP Hochregulation durch Vorbehandlung mit GCSF wurden einer nachfolgenden LPS-Challenge sowie einer 70% Leberresektion unterzogen. LBP hemmendes Peptid wurde verwendet, um die Interaktion zwischen LBP und LPS zu blockieren. Der Schweregrad der Entzündungsreaktion wurde anhand der Serum- und Leber-LBP Spiegel, der Leberschädigung (Enzyme, Morphologie) und der mRNA-Level der proinflammatorischen Zytokine ermittelt. Es wurde eine immunhistochemische Färbung für LPS durchgeführt, um die Kinetik der LPS-Bindung in der Leber zu untersuchen.

3. Die Rolle der GCSF-induzierten LBP-Hochregulation wurde im Modell der polymikrobiellen Sepsis in naiven Ratten untersucht und sowie das Ausmaß der Entzündungsreaktion untersucht.

## **Ergebnisse:**

1. Die Erhöhung von LBP nach Leberresektion korrelierte mit der Größe der Restleber und damit der synthetischen Kapazität nach Resektion. Sowohl nach warmer Ischämie als auch Transplantation kam es zur Translokation von LPS sowie zur Hochregulation von LBP in Assoziation mit der Induktion einer Entzündungsreaktion.

2. Die prä-operative Hochregulation von LBP mittels G-CSF verstärkte die entzündliche Antwort auf LPS erheblich, sensibilisierte also für die LPS-Challenge. Die Blockade von LBP mittels der gleichzeitigen Gabe des inhibitorischen Peptides machte diesen Effekt rückgängig.

3. Die prä-operative Hochregulation von LBP mittels G-CSF reduzierte die Letalität im Modell der polymikrobiellen Sepsis, was zu der Annahme verleitet, daß die Gabe des blockierenden Peptides die Sepsis verschlimmern würde.

## **Schlußfolgerung:**

Die Expression von LBP wurde durch die leberchirurgischen Eingriffe erhöht und die postoperative Entzündungsreaktion dadurch moduliert. Die Blockade von LBP durch das inhibitorische Peptid reduzierte die Entzündungsreaktion. Möglicherweise ist auf diesem Wege die Entzündungsreaktion beim Ischämie-Reperfusionsschaden einflußbar.

Die G-CSF induzierte LBP-Expression verschlechterte das klinische Ergebnis im SIRS, reduzierte aber die Letalität im Sepsis Modell. Diese augenscheinlich widersprüchlichen Ergebnisse weisen daraufhin, daß der Effekt von LBP von der Art des entzündlichen/infektiösen Geschehens bzw. der Phase der Erkrankung abhängt. Somit können unsere Ergebnisse dazu beitragen, den begrenzten Wert der postoperativen LBP-

Bestimmung als diagnostischem/prädiktiven Marker zu erklären. Hingegen lassen unsere Ergebnisse erwarten, daß die präoperative LBP-Bestimmung zu einer Risikoabschätzung vor einer definierten Intervention beitragen kann.

# **Inflammation, SIRS and Sepsis after hepatobiliary surgery: Is lipopolysaccharide binding protein the link?**

## **Background:**

LBP binds to LPS and activates an inflammatory cascade. LBP is an acute phase protein, which is currently investigated as marker of sepsis. LBP is upregulated by LPS and in infectious diseases, but also after major surgery.

Extended liver resection may be fatal due to the development of liver failure. Liver failure is associated with LPS and bacterial translocation. LPS as well as bacterial translocation represents a major risk for developing systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and sepsis after extended liver resection. We previously demonstrated that LBP-upregulation after G-CSF pretreatment improved the outcome in the lethal model of 90% PH using the mass ligation technique.

We want to understand the role of LBP in postoperative inflammation, SIRS and sepsis. We established a novel LBP-ELISA assay to first determine the expression level after hepatobiliary procedures. Second, we tested the effect of LBP upregulation in a SIRS and third in a Sepsis model.

## **Method:**

An LBP-ELISA assay was established based on the binding between LPS and LBP.

1. Liver samples and serums were obtained after different degrees of PH, WI/R and LTx to investigate LBP expression, liver injury and the expression of pro-inflammatory cytokines. LBP released into the effluent during CI was used in a macrophage-LPS-stimulation assay to investigate the role of LBP in vitro. Blocking experiments using an LBP-inhibitory peptide were performed to confirm the relevance of LPS/LBP for the induction of the inflammatory response.

2. After pretreatment with G-CSF to upregulate LBP-expression, rats were subjected to subsequent LPS challenge with or without 70% PH. LBP inhibitory peptide was used to block the interaction between LBP and LPS. Serum and hepatic LBP levels, mortality, hepatic injury (AST, histological evaluation), and inflammatory cytokines were used to assess the severity of inflammatory response. LPS IHC staining was performed to observe the time-dependent process of LPS-binding in the liver.

3. The role of G-CSF-induced LBP-upregulation was also investigated in poly-microbial sepsis in naïve rats. Mortality, hepatic injury (AST, histological evaluation), and inflammatory cytokines were used to assess the severity of inflammatory response.

## **Results:**

(1) LBP elevation was related to the size and thereby the synthetic capacity of the small remnant liver after liver resection. Translocation of LPS and upregulation of LBP occurred after LTx, but also after PH and WI/R and was associated with the postoperative inflammatory response after LTx.

(2) Pre-operative upregulation of LBP via G-CSF sensitized to a subsequent LPS challenge and enhanced the LPS-induced inflammatory response. In contrast, blocking the interaction between LBP and LPS attenuated the overt inflammatory response.

(3) Pretreatment with G-CSF attenuated the inflammation in the poly-microbial sepsis model. We speculated that LBP-blocking peptide would aggravate the outcome in sepsis.

## **Conclusion:**

Taken together, LBP was increased and modulated the inflammation after liver surgery. Blocking LBP using LBP-inhibitory peptide might represent a novel strategy to reduce the I/R-induced inflammatory response.

G-CSF induced LBP expression aggravated the clinical course in LPS-induced SIRS and but had a protective effect in poly-microbial sepsis. These seemingly contradictory results suggest, that

the effect of LBP is dependent on the type of inflammatory/infectious insult and the phase of disease. Our findings may help to explain the limited value of LBP-levels as diagnostic and predictive marker of SIRS and sepsis when determined after the insult. However, LBP levels may be potentially useful to assess the risk when measured prior to the defined insult.