

Aus der Klinik für Unfall- und Handchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Joachim Windolf

**Untersuchung zum Einfluss des Leukozyten-Inhibitions-Moduls
auf die posthämorrhagische Aktivierung von neutrophilen Granulozyten
im Tiermodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Annina Elfriede Marianne Ott

2010

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

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: Prof. Dr. Windolf
Korreferent: PD Dr. Ostendorf

FÜR MEINE ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
TABELLENVERZEICHNIS	IX
1 EINLEITUNG	10
1.1 ENTSTEHUNG EINES SCHOCKS.....	10
1.1.1 <i>Hämorrhagischer Schock</i>	11
1.1.2 <i>Physiologische Mechanismen beim Schock</i>	12
1.2 POSTTRAUMATISCHE SYSTEMISCHE REAKTIONEN.....	13
1.2.1 <i>Epidemiologie von SIRS und Sepsis als Schockfolge-erkrankungen</i>	13
1.2.2 <i>Definition von SIRS und Sepsis</i>	13
1.2.3 <i>Diagnosestellung von SIRS und Sepsis</i>	14
1.2.4 <i>Derzeitige Therapieoptionen bei SIRS und Sepsis</i>	15
1.3 DIE ROLLE NEUTROPHILER GRANULOZYTEN BEI DER ENTSTEHUNG DES SIRS	16
1.3.1 <i>Das „No-reflow-Phänomen“</i>	17
1.3.2 <i>Apoptoseresistenz der Neutrophilen als Ursache ihrer erhöhten Aktivität</i>	17
1.3.3 <i>Interaktion aktivierter Neutrophiler mit dem Endothel und transendotheliale Migration</i>	18
1.3.4 <i>Einfluss aktivierter Neutrophiler auf das adaptive Immunsystem</i>	20
1.4 FAS INDUZIERTER INAKTIVIERUNG VON NEUTROPHILEN	20
1.4.1 <i>Der Fas-Signalweg</i>	20
1.4.2 <i>Überwindung der Apoptoseresistenz durch Fas</i>	21
1.5 DAS LEUKOZYTEN-INHIBITIONS-MODUL (LIM).....	22
1.6 NEUTROPHILEN-INHIBIERUNG WÄHREND EXTRAKORPORALER ZIRKULATION IN DER HERZ-LUNGEN-MASCHINE.....	23
1.7 ZIELSETZUNG.....	23
2 MATERIAL UND METHODEN	25
2.1 VERSUCHSTIERE.....	25
2.1.1 <i>Haltungsbedingungen</i>	26
2.2 ABLAUF DER OPERATION	26
2.2.1 <i>Prämedikation und Narkoseeinleitung</i>	26
2.2.2 <i>Anästhesie</i>	27
2.2.3 <i>Katheterimplantation</i>	27
2.2.4 <i>Intraoperatives Monitoring und Katheterfunktion</i>	29
2.2.5 <i>Hämorrhagischer Schock</i>	30
2.2.6 <i>LIM-Phase</i>	30
2.2.7 <i>Zeitpunkte der Blutentnahmen für die funktionellen Tests</i>	31
2.2.8 <i>Aufbau des LIM</i>	32
2.2.9 <i>Ende der Operation</i>	34
2.2.10 <i>Nachbeobachtung</i>	35
2.2.11 <i>Präparation der Organe und Gewebeschnitte</i>	35
2.3 GEWEBEFIXIERUNG FÜR HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	36
2.3.1 <i>Paraffineinbettung</i>	36
2.3.2 <i>Chloracetatesterasefärbung</i>	36
2.4 FUNKTIONELLE TESTS	37
2.4.1 <i>Experimente zur semiquantitativen Bestimmung der chemo-taktischen Aktivität Neutrophiler</i>	37
2.4.2 <i>Zytokinmessung mittels ELISA</i>	39
2.5 EINSTELLUNG DES HÄMORRHAGISCHEN SCHOCKMODELLS	43

2.5.1	<i>Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck</i>	43
2.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	43
3	ERGEBNISSE	45
3.1	QUANTITATIVE MESSUNG DER EINZELNEN LEUKOZYTEN-POPULATIONEN IM DIFFERENTIALBLUTBILD.....	45
3.1.1	<i>Anzahl der Gesamtleukozyten</i>	45
3.1.2	<i>Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Differentialblutbild</i>	48
3.1.3	<i>Anzahl der Lymphozyten im Differentialblutbild</i>	50
3.1.4	<i>Anzahl der Monozyten im Differentialblutbild</i>	53
3.2	GEWEBEINFILTRATION DURCH NEUTROPHILE GRANULOZYTEN	55
3.2.1	<i>Chloracetatesterasegefärbte Gewebeschnitte 48 Stunden nach dem Schock</i> ..	55
3.2.2	<i>Elektronenmikroskopische Darstellung der Gewebeinfiltration durch Leukozyten</i>	56
3.3	BESTIMMUNG VON IL-1-BETA, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-ALPHA UND INTERFERON-GAMMA MITTELS ELISA.....	57
3.3.1	<i>IL-1-beta</i>	57
3.3.2	<i>IL-6</i>	58
3.3.3	<i>Interferon-gamma Bestimmung im Serum mittels ELISA</i>	59
3.3.4	<i>IL-8</i>	59
3.3.5	<i>IL-10</i>	60
3.3.6	<i>TNF-alpha</i>	61
3.4	CHEMOTAXIS.....	62
3.5	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	63
4	DISKUSSION.....	64
4.1	EXTRAKORPORALE IMMUNTHERAPIE MITTELS LIM ZUR PRÄVENTION VON POSTTRAUMATISCHEM SIRS	64
4.2	FAS-INDUZIERT ÜBERWINDUNG DER APOPTOSERESISTENZ DURCH DAS LIM	65
4.3	APOPTOSERESISTENZ DURCH VERMINDETE AKTIVIERUNG DES INTRINSISCHEN APOPTOSEWEGES	67
4.4	VERMINDERUNG DER ZIRKULIERENDEN GRANULOZYTEN DURCH DAS LIM	68
4.4.1	<i>Das LIM vermindert die Gewebeinfiltration durch Neutrophile</i>	70
4.4.2	<i>Fas-vermittelte verminderte Chemotaxis der Neutrophilen</i>	70
4.5	EINFLUSS DES LIM AUF DIE EINZELNEN POPULATIONEN DER LEUKOZYTEN	71
4.5.1	<i>Reduktion der Monozytenzahlen durch das LIM</i>	72
4.6	DIE ROLLE DER ZYTOKINE BEI SIRS UND SEPSIS.....	72
4.7	WEITERE EINSATZMÖGLICHKEITEN DES LIM-VERFAHRENS	74
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	76
6	REFERENZEN	78
7	CURRICULUM VITAE	91
8	DANKSAGUNG	93
9	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	94

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillatum
APC	Antigen präsentierende Zellen
Bcl	B-Zell-Lymphoma
BGA	Blutgasanalyse
CO ₂	Kohlendioxid
CD	Cluster of differentiation
DHR	DH-Rhodamine
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-associated protein with death domain
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
GM-CSF	Granulozyte Monozyte Colony Stimulating Factor
HES	Hydroxy Ethyl Stärke
HF	Herzfrequenz
HZV	Herzzeitvolumen
ICAM	Inter-Cellular adhesion molecule
IE	Internationale Einheiten
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IFN	Interferon
LIM	Leukozyten-Inhibitions-Modul
Lsg.	Lösung
M	Mol
MAP	Mittlerer Arterieller Druck
MHC	Major Histocompatibility Complex
µl	Mikroliter
mm Hg	Millimeter Quecksilbersäule

Abkürzungsverzeichnis

MODS	Multiples Organ Dysfunktions Syndrom
MOV	Multiples Organversagen
MPAP	Mittlerer Pulmonalarterieller Druck
MPO	Myeloperoxidase
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
n.b.	nicht bestimmt
N-HCL	Stickstoff-Hydrochlorid
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAF	Platelet activating factor
PcO ₂	Sauerstoffpartialdruck
pg	Pikogramm
PBS	Phosphatgepufferte Lösung mit Magnesium und Calcium
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
PMNE	Polymorphkernige Neutrophilen Elastase
PS	Phosphatidylserin
Rpm	Rounds per minute
RR	Blutdruck nach Riva Rocci
RT	Raumtemperatur
SIRS	Systemic Inflammatory response syndrome
SMC	Standard medical care
SEM	Standard error of the mean
Std	Stunde
SvO ₂	Sauerstoffsättigung
TNF	Tumornekrosefaktor
TVA	Tierversuchsanlage
VCAM	vascular cell adhesion molecule
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Extrakorporaler Kreislauf mit eingeschaltetem LIM, modifiziert nach Loegters et al, Journal of Inflammation, 2010 [70].</i>	32
<i>Abbildung 2: Extrakorporaler Kreislauf am Schwein mit Kathetern, Dialysepumpe und Beatmungsgerät.</i>	33
<i>Abbildung 3: Das LIM im Detail.</i>	34
<i>Abbildung 4: Die unterschiedlichen Zellpopulationen getrennt nach dem Dichtegradienten.</i>	38
<i>Abbildung 5: Anzahl der Leukozyten: Vergleich der SMC-Gruppe mit der LIM-Gruppe modifiziert nach Loegters et al, Journal of Inflammation, 2010 [70].</i>	45
<i>Abbildung 6: Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Differentialblutbild modifiziert nach Loegters et al, Journal of Inflammation, 2010 [70].</i>	48
<i>Abbildung 7: Anzahl der Lymphozyten bei SMC-Gruppe und LIM-Gruppe modifiziert nach Loegters et al, Journal of Inflammation, 2010 [70].</i>	50
<i>Abbildung 8: Anzahl der Monozyten in der SMC-Gruppe und in der LIM-Gruppe modifiziert nach Loegters et al, Journal of Inflammation, 2010 [70].</i>	53
<i>Abbildung 9: Chloracetatesterasefärbung der Gewebeschnitte, modifiziert nach Loegters et al, Journal of Inflammation, 2010 [70].</i>	55
<i>Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Darstellung des Lungen- und Herzmuskelgewebes.</i>	56
<i>Abbildung 11: Chemotaxis.</i>	62

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: modifiziert nach Gutierrez et al; Clinical review Hemorrhagic shock [51]</i>	12
<i>Tabelle 2: Blutentnahmezeitpunkte</i>	32
<i>Tabelle 3 Materialien</i>	42
<i>Tabelle 4 Geräte</i>	43
<i>Tabelle 5 IL-1-beta-Konzentration in beiden Gruppen</i>	57
<i>Tabelle 6 IL-6-Konzentration im Serum</i>	58
<i>Tabelle 7 IL-8-Konzentration im Serum</i>	59
<i>Tabelle 8 Konzentration von IL-10 im Serum</i>	60
<i>Tabelle 9 TNF-alpha-Konzentration im Serum</i>	61

1 Einleitung

Der hämorrhagische Schock gehört zu den häufigsten Todesursachen in Folge von schweren Unfällen und Traumata und wird von schweren Komplikationen begleitet [80], zum Beispiel wird er für die Entstehung von SIRS, MODS, und MOV verantwortlich gemacht [11]. Auch die Entstehung einer Sepsis wird begünstigt. Bisher ist der genaue pathophysiologische Vorgang, der Entstehung dieser Komplikationen, trotz intensiver Forschung, nicht im Detail geklärt.

Neutrophile Granulozyten spielen gewöhnlich eine tragende Rolle in der Abwehr bakterieller Infektionen. Bekannt ist, dass aktivierte Leukozyten, insbesondere Neutrophile, durch Akkumulation im Gewebe und Ausschüttung von Mediatoren eine bedeutende Funktion in der Entstehung von MODS haben [14, 16, 35, 54, 66, 100, 110, 118-119]. Zu den am häufigsten betroffenen Geweben zählen Lunge, Leber und Herz [71, 78, 93, 109, 120]. Somit sind Neutrophile paradoxerweise sowohl in der Bekämpfung, als auch in der Entstehung und Eskalation einer Inflammation involviert.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Prävention von MODS, MOV und SIRS durch die Inaktivierung der Neutrophilen durch eine immunmodulierende Therapie.

1.1 Entstehung eines Schocks

Ein Schockzustand ist gekennzeichnet durch ein Missverhältnis zwischen der Gewebepfusion und dem Sauerstoffbedarf des Gewebes. Durch eine Zentralisation des Kreislaufs werden periphere Organe minderperfundiert. Bedingt durch diese Minderperfusion entsteht eine Ischämie, eine Sauerstoffmangelversorgung der Gewebe, die im schlimmsten Fall zum Absterben des Gewebes und damit zu einem irreversiblen Funktionsverlust führen kann [6]. Dies ist insbesondere bei metabolisch aktiven Geweben, wie der Lunge, der Niere oder dem Herz rasch der Fall. In der heutigen medizinischen Praxis wird ein hämorrhagischer Schock durch Gabe von Volumen in Form von kristalloider oder kolloidaler Lösung behandelt. Das

minderperfundierte Gewebe wird nun wieder durchblutet. Durch mikrovaskuläre und parenchymale Dysfunktion kann jedoch ein Gewebeschaden ausgelöst werden. Sowohl Sauerstoffradikale als auch Neutrophile gelten als Auslöser. Die Sauerstoffradikale sorgen für die Lipidperoxidation und aktivieren Neutrophile, welche wiederum das Gewebe durch Endothelzellmigration schädigen [45, 121].

Ein Schock kann kardiogener, distributiver und hypovolämischer Natur sein. Der kardiogene Schock entsteht durch eine Verminderung des Herzzeitvolumens. Ein Infarkt der zu einer Ischämie der Herzmuskulatur führt, kann beispielsweise Auslöser sein. Infolgedessen ist das Herz nicht mehr in der Lage, das benötigte Volumen auszuwerfen. Der distributive Schock wird durch das Vorliegen einer Sepsis ausgelöst [51].

Dem hypovolämischen Schock schließlich kann eine Dehydratation durch Vomitus oder Diarrhoe, starker Flüssigkeitsverlust über die Haut, z.B. bei starker Hitze, oder ein schneller und hoher Blutverlust (hämorrhagischer Schock) zugrunde liegen.

1.1.1 Hämorrhagischer Schock

Das durchschnittliche Blutvolumen eines Erwachsenen beträgt ca. 7% des Körpergewichtes [59]. Ein 70 kg schwerer Erwachsener hat somit ein Blutvolumen von ungefähr 5l. Verliert ein Mensch z.B. bedingt durch ein Trauma Blut, so können 4 Stadien des Blutverlustes unterschieden werden.

Stadium	I	II	III	IV
Parameter				
Blutverlust (in ml)	<750	750-1500	1500-2000	>2000
Blutverlust in %	<15%	15-30%	30-40%	>40%
Herzfrequenz (Schläge/Minute)	<100	100-120	120-140	>140
Blutdruck	Normal	Erniedrigt	Erniedrigt	Erniedrigt
Atemfrequenz	14-20	20-30	30-35	>35
Urin-Ausscheidung (ml/Std)	>30	20-30	5-15	Anurie
ZNS-Symptome	Normal	Ängstlich	Verwirrt	Lethargisch

Tabelle 1: modifiziert nach Gutierrez et al; Clinical review Hemorrhagic shock [51].

1.1.2 Physiologische Mechanismen beim Schock

Bei einem hämorrhagischen Schock kommt es durch den hohen Blutverlust zu einer Abnahme des zirkulierenden Blutvolumens. Dies führt zu einer Abnahme des Herzzeitvolumens (HZV) infolge einer Verminderung des venösen Blutrückstroms aus der Peripherie. Auch der Blutdruck sinkt konsekutiv, sowohl als Folge des verminderten Volumens, als auch, um die Herzarbeit, bei Minderperfusion der Herzmuskulatur, zu diminuieren. Die Abnahme des Volumens und des Blutdrucks wird an den Barorezeptoren der Gefäße registriert und führt zur Sympathikusaktivierung. Es kommt zu einer kompensatorischen Tachykardie und zu Mikrozirkulationsstörungen und damit zur Hypoxie im Gewebe. Eine metabolische Azidose entsteht. Diese versucht der Körper durch Erhöhung der Atemfrequenz respiratorisch auszugleichen. Je stärker der Blutverlust, desto stärker ist die Ausprägung der Schocksymptome. Die Urinausscheidung sinkt, bis es zur Anurie aus Volumenmangel und letztlich zu einem akuten Nierenversagen kommt. Auch die zentralnervösen Symptome, wie Somnolenz, sind durch eine Hypoxie im zentralen Nervengewebe bedingt und bei längerer Persistenz irreversibel [51].

Bisher hat in der Therapie des hypovolämischen Schocks die Stabilisierung des Kreislaufs oberste Priorität, um ein Überleben des Patienten zu gewährleisten. Der Volumenmangel wird durch die Infusion von kristalloiden oder kolloidalen Lösungen ausgeglichen, auch abhängig von der Ätiologie des Volumenmangels. Handelt es sich um eine Blutung, so muss diese schnellstmöglich zum Stillstand gebracht werden.

Zum einen löst die Ischämie eine Kaskade von pathologischen Ereignissen aus zum anderen kann jedoch auch die Reperfusion, wie oben beschrieben, Zellschädigungen hervorrufen.

1.2 Posttraumatische systemische Reaktionen

Nach einem schweren Trauma, ob hämorrhagischer Schock, Polytrauma oder Verbrennung, hat zunächst das Überleben des Patienten höchste Priorität bei der sofortigen präklinischen und klinischen Versorgung. Akute Blutungen werden gestillt, Wunden und Frakturen werden versorgt.

Doch sind es häufig die verzögert eintretenden Komplikationen, die mit einer erhöhten Letalität einhergehen. Dazu zählen lokale Komplikationen, wie Wundinfektionen, aber auch systemische, wie SIRS und Sepsis.

1.2.1 Epidemiologie von SIRS und Sepsis als Schockfolgeerkrankungen

Jährlich sterben etwa 60.000 Menschen in Deutschland an einer septischen Erkrankung, damit ist dies die dritthäufigste Todesursache. Etwa 75.000 Einwohner erkranken pro Jahr an einer schweren Sepsis bzw. einem septischen Schock, 79.000 erkranken an einer Sepsis.

Die Kosten für die intensivmedizinische Behandlung belaufen sich auf etwa 1,77 Milliarden Euro [5].

1.2.2 Definition von SIRS und Sepsis

Bei dem Krankheitsbild der Sepsis, umgangssprachlich als Blutvergiftung bezeichnet handelt es sich um eine komplexe systemische Wirtsreaktion auf eine Infektion. Dabei wirken schwere Allgemeinerkrankungen, Langzeitbeatmung, Katheter, Wunden sowie eine Beeinträchtigung des

Immunsystems als prädisponierende Faktoren, weshalb die Sepsis häufig auf Intensivstationen auftritt. Die Diagnose der Sepsis erfolgt über eine Kombination mehrerer Parameter, über Vitalparameter, Laborwerte, hämodynamische Daten und Organfunktionen (Kap. 1.2.3). Eine Bakteriämie liegt nicht in allen Fällen vor. Ein weiterer Parameter, der für Diagnose und Prognose der Sepsis wichtig ist, ist das Procalcitonin. Die Patienten, die ein MODS oder eine Sepsis entwickeln zeigen häufig erhöhte Procalcitonin-Plasmalevel [52].

Der Begriff des SIRS wurde auf der Konsensus Konferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) im Jahre 1992 erstmalig festgelegt [67]. Er beschreibt eine systemische Aktivierung des angeborenen Immunsystems, ohne eine zugrunde liegende Infektion. Ausgelöst werden kann ein SIRS durch einen hypovolämischen Schock, durch Verbrennungen, sterile inflammatorische Prozesse wie z.B. eine Pankreatitis oder durch ein Polytrauma.

Zur Zeit der Festlegung des Begriffes SIRS war der zugrunde liegende Pathomechanismus noch völlig ungeklärt. Mittlerweile wird die Aktivierung der neutrophilen Granulozyten als histopathologisches Schlüsselereignis des SIRS angesehen [79].

1.2.3 Diagnosestellung von SIRS und Sepsis

Ein SIRS liegt vor, wenn mindestens zwei der folgenden Kriterien erfüllt werden [5]:

- Körpertemperatur $>38^{\circ}\text{C}$ oder $<36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz > 90 Schläge/Minute
- Hyperventilation: Atemfrequenz > 20 /Minute oder CO_2 -Partialdruck <32 mm Hg
- Leukozytose: > 12.000 Zellen/ μl oder Leukopenie: < 4000 Zellen/ μl

Das SIRS zählt zu den septischen Syndromen.

Eine Sepsis ist definiert als SIRS mit zusätzlicher Infektion durch einen bakteriellen oder viralen Erreger [5]. Der Erregernachweis erfolgt mittels

Blutkulturen. Eine Sepsis kann sich zur schweren Sepsis entwickeln. Eine schwere Sepsis liegt vor, wenn zusätzlich mindestens ein Organ geschädigt ist, eine Minderperfusion der Gewebe und eine Hypotension vorliegt. Bei der Organschädigung kann es sich um eine akute Enzephalopathie, eine relative oder absolute Thrombozytopenie, eine arterielle Hypoxämie, eine renale Dysfunktion oder eine metabolische Azidose handeln [5]. Das schwerste Krankheitsbild in diesem Verlauf ist der septische Schock. Trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution ist hierbei eine arterielle Hypotension nicht aufzuhalten. Zu den diagnostischen Kriterien für den septischen Schock gehören zusätzlich zu den Kriterien der Sepsis ein systolischer Blutdruck von < 90 mm Hg bzw. ein MAP von < 65 mm Hg oder ein notwendiger Vasopressoreneinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck über 90 mm Hg zu halten. Die Hypotonie darf nicht durch andere Ursachen zu erklären sein.

1.2.4 Derzeitige Therapieoptionen bei SIRS und Sepsis

Sobald die Diagnose einer Sepsis gestellt wurde, sollte eine kalkulierte, intravenöse Antibiotikatherapie begonnen werden, die sich sowohl nach dem individuellen Risikoprofil des Patienten, als auch nach dem spezifischen Resistenzmuster der Intensivstation richtet [117]. Die Behandlung sollte sobald als möglich und nach Abnahme von Blutkulturen beginnen und gegebenenfalls nach Antibioogramm verändert oder erweitert werden. Des Weiteren ist die hämodynamische Stabilisierung wichtig und die Beatmung muss überwacht werden.

Weitere medikamentöse Maßnahmen bestehen in dem Verabreichen von Hydrokortison in niedriger Dosierung zur Therapie im septischen Schock, allerdings nicht länger als 7 Tage [7]. Diese Therapie basiert auf der Erkenntnis einer relativen Nebenniereninsuffizienz bei Sepsis. Rekombinantes aktiviertes Protein C (rhAPC) hat zu einer statistisch signifikanten Senkung der Gesamtmortalität bei schwerer Sepsis geführt, sollte aber nur bei dieser eingesetzt werden, denn es kann auch zu vermehrten Blutungskomplikationen führen. Zudem ist es sehr teuer [26].

Eine weitere medikamentöse Therapieoption bietet Rolipram, ein selektiver Phosphodiesterase Typ 4-Inhibitor, der die Neutrophilen inaktiviert und somit zu einer geringeren Retention Neutrophiler in der Lunge geführt hat [94].

Bei erhöhtem Risiko zur Entwicklung einer tiefen Venenthrombose wird auch eine Thromboseprophylaxe mit unfraktioniertem oder niedermolekularem Heparin empfohlen [18].

Des Weiteren steht die Fokussanierung im Vordergrund. Diese beinhaltet die Behandlung einer beatmungs-assoziierten Pneumonie, das Entfernen von Kathetern oder Fremdkörpern [69], die Behandlung chirurgischer Infektionen und intraabdomineller Infektionen und die Therapie invasiver Candidainfektionen. Auch die Prophylaxe Sepsis auslösender Erkrankungen spielt eine zentrale Rolle. Hierbei gilt es, die Patienten so früh wie möglich von der Beatmung zu entwöhnen, sowie sie in halb aufrechter Körperposition von 45 ° zu lagern [30, 86]. Um einer septischen Erkrankung vorzubeugen, ist eine frühe orale oder enterale Ernährung, die auch immunmodulierende Sondennahrung beinhaltet, wichtig [10]. Eine intensivierete Insulintherapie, die auf normoglykämie Werte abzielt, reduziert signifikant das Risiko einer Sepsis [25]. Ferner ist eine Stressulkus-Prophylaxe wichtig [25]. Bei Auftreten eines Nierenversagens sollte ein Nierenersatzverfahren eingeleitet werden [60].

Trotz kalkulierter Antibiotikatherapie und der anderen oben genannten Therapiestrategien sind Sepsis und SIRS häufig noch immer tödlich.

1.3 Die Rolle neutrophiler Granulozyten bei der Entstehung des SIRS

Neutrophile sind die Zellen des Immunsystems, die bei inflammatorischen Geschehen zuerst rekrutiert werden [79]. Im Schock werden durch die Ischämie Zytokine und Chemokine ausgeschüttet, welche die Neutrophilen aktivieren. Aktivierte Neutrophile adhären an der Gefäßwand und es kommt zur Migration in das hypoxische Gewebe. Durch das große Ausmaß an Stress, dem der Körper im hämorrhagischen Schock ausgesetzt ist, kommt es

zu einer überschießenden Aktivierung von Neutrophilen. Je mehr Neutrophile in das Gewebe einwandern, desto größer ist der oxidative Streß, dem das Gewebe ausgesetzt wird. Des Weiteren kommt es durch Erhöhung der Anzahl an Zellen zu Gewebeveränderungen und somit zu Mikrozirkulationsstörungen. Das ohnehin schon hypoxische Gewebe wird noch weniger durchblutet und es folgt eine Schädigung des Organs.

1.3.1 Das „No-reflow-Phänomen“

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Entstehung eines SIRS ist auch das Ischämie-Reperfusion-Syndrom. Nicht nur die Ischämie der Gewebe führt zur Schädigung des Organs, auch die Reperfusion geht mit einer Schädigung einher. Insbesondere das sogenannte „no-reflow-Phänomen“ spielt hierbei eine große Rolle. Bei diesem handelt es sich um eine Mikrozirkulationsstörung die postischämisch auftreten kann. Häufig wird dieses Phänomen beim Myokardinfarkt beobachtet. Die endotheliale Dysfunktion ist durch eine Veränderung in den Endothelzellen selbst begründet, die die Integrität und Schrankenfunktion betrifft. Zytokine und Adhäsionsmoleküle werden ausgeschüttet und der Gefäßtonus erhöht. Die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid, einem wichtigen Vasodilatator, ist vermindert, welches auch eine verminderte Vasodilatation der Arteriolen nach sich zieht [102]. Es kommt zur Verstopfung der Arteriolen, Kapillaren, und Venolen mit Neutrophilen [112] und damit zu einer Ischämie, die letztendlich durch die Reperfusion ausgelöst wurde (Ischämie-Reperfusion-Syndrom).

1.3.2 Apoptoseresistenz der Neutrophilen als Ursache ihrer erhöhten Aktivität

Die normale durchschnittliche Lebensdauer von Neutrophilen im Blut beträgt 8-10 Stunden. Im Gewebe kann sie bis zu 4 Tage betragen. Auffallend ist eine prolongierte Lebenszeit der Neutrophilen nach schwerem Trauma, die bis zu 3 Wochen betragen kann [74, 108].

Neben der überschießenden Aktivierung der Neutrophilen im Schock spielt ihre Apoptoseresistenz eine wichtige Rolle.

Werden beim SIRS Apoptosemechanismen aktiviert, so können diese die Neutrophilen nicht abtöten [58].

Das LIM soll durch Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges über Fas die Apoptoresistenz der Neutrophilen überwinden und damit die verlängerte Lebenszeit hyperaktivierter Neutrophiler reduzieren. Erwünscht ist, die durch Neutrophile vermittelte Gewebeschädigung zu verhindern und somit der Gefahr der Entwicklung eines SIRS, MOV und MODS entgegenzuwirken.

1.3.3 Interaktion aktivierter Neutrophiler mit dem Endothel und transendotheliale Migration

Die Migration der Neutrophilen durch das Endothel ist in einem 3-Stufen-Modell beschrieben worden [17, 46, 48, 96].

- 1) Die Neutrophilen rollen sich mit Hilfe von Adhäsions-Glykoproteinen, den Selektinen an der Gefäßwand entlang. Es kommt zu einer lockeren Anhaftung an die Endothelzellen.
- 2) An den Endothelzellen kommen die Leukozyten mit Chemokinen (z.B: Leukotrien B₄, PAF, C5a) in Kontakt [57, 96]. Diese binden an Rezeptoren auf der Leukozytenoberfläche und führen zu einer G-Protein-vermittelten Aktivierung von beta-2-Integrinen.
- 3) Die beta-2-Integrine (CD11/CD18) der Leukozyten binden an ihre Rezeptoren auf der Endothelzelloberfläche, ICAM-1,-2,-3, oder VCAM, (Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie). Diese Bindung führt zur festen Bindung der Leukozyten an die Gefäßwand und schließlich zur Diapedese der Neutrophilen in das Gewebe [6].

Die Endotheladhärenz findet vor allem in den postkapillären Venolen statt. Die Neutrophilen schwimmen im Blutstrom und haben Kontakt zur Gefäßwand. Dadurch verlangsamen sie ihre Bewegung und rollen am Endothel entlang. E-Selektin (CD62E) und P-Selektin (CD62P) werden nach Aktivierung durch Zytokine auf den Endothelzellen exprimiert, wohingegen L-Selektin (CD62L) auf den meisten Leukozyten vorhanden ist [6]. Jedes Selektin erkennt spezifische Kohlenhydratsequenzen auf den Leukozyten oder auf dem Endothel. Dadurch, dass die Selektine lang ausgestreckt sind, ist das „Einfangen“ der Leukozyten möglich. Eine vorübergehende lockere Anhaftung

ist notwendig, um die Diapedese, eine Einwanderung in das Gewebe, zu gewährleisten. Dem 3-Stufen-Modell zur Folge sind die Selektine für die initiale lockere Haftung am Endothel verantwortlich, die Integrine für eine feste, stabile Haftung [43]. Die Leukozyten suchen das Endothel ab. Liegt eine Aktivierung vor, so haften die Leukozyten in einem zweiten Schritt fest an das Endothel und wandern danach in das Gewebe ein. Liegt keine Aktivierung vor, so wird die lockere Bindung gelöst und die Leukozyten schwimmen weiter, ohne weitere Neutrophile zu rekrutieren.

Die feste Adhäsion wird durch zusätzliche Adhäsionsmoleküle induziert, wie L-Selektine und sLe (eine für das L-Selektin spezifische Kohlenhydratsequenz auf dem Endothel). Die Expression dieser Adhäsionsmoleküle wird durch Integrine vermittelt, die sich auf den zirkulierenden Leukozyten befinden. Diese sind die β -2-Integrine LFA-1 (CD LFA/CD18) und MAC-1 (CD11B/CD18) und das β -1-Integrin VLA-4. Sie binden an ICAM-1 oder ICAM-2 der Endothelzellen. Diese Integrine binden nur dann gut an Endothelzellen, wenn ihre Bindungsaktivität durch Aktivierung erhöht wird. Diese Aktivierung wiederum erfolgt durch Chemokine, die von Endothelzellen ausgeschüttet werden, wie IL-8, MCP 1, MIP 1 und Rantes.

Nach Adhäsion wandern die Neutrophilen unter Aktivierung durch weitere chemotaktische Faktoren in das Gewebe. Diese sind C5a des Komplementsystems und Leukotrien B₄. Lokal gebildete Entzündungsmediatoren wie TNF- α und IL-1 verstärken die Bildung interzellulärer Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM) auf Endothelzellen, um mehr Leukozyten aus dem Blutstrom zu rekrutieren. Sobald die Neutrophilen in das Gewebe eingewandert sind, können sie mit ihren Pseudopodien Fremdkörper aufnehmen und diese durch Phagosomenbildung und weitere Prozesse zerstören. Während dieses Prozesses steigt der nicht-mitochondriale Sauerstoffverbrauch in den Granulozyten auf das Hundertfache an. Es kommt zum sogenannten „Respiratory burst“.

1.3.4 Einfluss aktivierter Neutrophiler auf das adaptive Immunsystem

Aus anderen Studien wird ersichtlich, dass die oben genannten Mechanismen nicht die einzigen sind, die zur Entwicklung eines SIRS nach einem Trauma durch Neutrophile beitragen. Als Teil des angeborenen Immunsystems können Neutrophile in das adaptive Immunsystem eingreifen. Unter In-vitro-Bedingungen gehen Neutrophile nach einigen Stunden in Apoptose, CD16 (ein Oberflächenprotein, welches als Differenzierungsantigen fungiert) verschwindet von der Oberfläche und die phagozytische Aktivität der Neutrophilen lässt nach [31, 95, 113]. Andererseits erhält beispielsweise die Anwesenheit von Zytokinen, insbesondere $\text{INF-}\gamma$ die CD16-Expression aufrecht und somit die phagozytotische Aktivität und die Lebensspanne Neutrophiler [12, 23, 62, 65]. Auch CD64 und MHC-Klasse-II-Antigene werden hochreguliert [41, 44, 113,]. MHC-Klasse-II-Expression findet normalerweise in APCs, z.B. dendritischen Zellen, B-Zellen, Monozyten oder Makrophagen statt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass MHC-Expression durch bestimmte Zytokine, wie $\text{INF-}\gamma$, GM-CSF oder IL-3 auch in Neutrophilen induziert werden kann und somit Neutrophile selbst als Antigenpräsentierende Zellen auftreten können [90]. MHC-Klasse-II-positive Neutrophile sind in der Lage antigenspezifische T-Gedächtniszellen zu aktivieren [91]. Des Weiteren konnten Radsak et al [90] zeigen, dass mit Interferon- γ In-vitro-kultivierte Neutrophile nicht nur MHC-Klasse-II-Antigene entwickelten, sondern auch CD80 und CD86, welche wichtige Ko-Stimulatoren für den T-Zell-Signalweg darstellen [90].

Somit ist durch Überwindung der Apoptoseresistenz der Neutrophilen auch ein Eingreifen in die T-Zell-Aktivierung möglich und ein neuer Angriffspunkt zur Therapie beispielsweise viraler Erkrankungen, wie HIV, oder bestimmter Autoimmunerkrankungen, z.B. Morbus Wegener, gegeben.

1.4 Fas induzierte Inaktivierung von Neutrophilen

1.4.1 Der Fas-Signalweg

FasL ist ein Oberflächenprotein, welches zur TNF-Superfamilie der Membranrezeptoren gehört. Hierbei handelt es sich um ein extrinsisches Apoptosesignal in so genannten Typ-1-Zellen. In Typ-2-Zellen wird die

Apoptose intrinsisch, also mitochondrial induziert. Des Weiteren kann die Apoptose durch das Endoplasmatische Retikulum oder durch Streß induziert werden.

Apoptose bezeichnet den so genannten programmierten Zelltod. Im Immunsystem sorgen bestimmte Mediatoren für die Apoptose-Induktion. Diese Induktoren sind Steroide, Zytokine wie TNF- α , IL-1, IL-6, Fas-Ligand (FasL), Hitzeschockproteine, freie Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid und zytotoxische T-Lymphozyten, welche FasL auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Fas wird sowohl von Neutrophilen, als auch von Thymozyten, aktivierten B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und Makrophagen exprimiert. Bindet nun dieses Fas an seinen Liganden (FasL), so wird der Apoptosevorgang in Gang gebracht.

FasL, auch bekannt als CD95L, bindet an das auf der Zelloberfläche befindliche CD95 oder Fas [50]. Durch eine dadurch induzierte Trimerisation oder Oligomerisation des CD95-Rezeptors bindet FADD (Fas-associated Protein with death domain) an die Todes-Domäne des Rezeptors [13, 21, 85]. FADD wiederum bindet an Caspase 8 [13, 85], welche eine Protease-Domäne beinhaltet. Caspase 8 ist letztendlich für eine Aktivierung der anderen zellulären Proteine verantwortlich.

Eines der Signale, die zur Weiterleitung der Todeskaskade notwendig sind, ist Bid, ein Protein der bcl-2-Familie. Dieses sorgt für die Weiterleitung des Signals ins Mitochondrium, von dem aus letztendlich über Cytochrom C die Aktivierung der Caspase 3 erfolgt.

1.4.2 Überwindung der Apoptoseresistenz durch Fas

Cinatl et al [22] konnten im Jahre 2000 bereits zeigen, dass Fas auch unabhängig von Apoptose zu einer raschen Inaktivierung von Neutrophilen führen kann. Dies ist der Mechanismus den sich das LIM (Leukozyten-Inhibitions-Modul) zu Nutze macht, so dass die Neutrophilen früher inaktiviert werden können, bevor Apoptose in Gang gebracht wurde.

Eine wesentliche Ursache für erhöhte Neutrophilenaktivität im Schock ist die sogenannte Apoptoseresistenz.

Unterschiedliche Expression der Proteine der Bcl-2-Familie, sowie Caspase-regulierte Aktivierung der Proteinkinase C δ , wurden als Modulatoren der Neutrophilenapoptose diskutiert [89, 103]. Die Bcl-2 Familie kann unterteilt werden in antiapoptotische Proteine (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1 und A1/Bfl-1) und proapoptotische Proteine (Bak, Bax, Bad und Bid). Der Anteil pro- und antiapoptotischer Moleküle, deren Lokalisation, Konformation und Phosphorylierung kann die Funktion dieser Proteine beeinflussen und zur Entscheidung zwischen Apoptose und Überleben beitragen [49]. Diese Proteine sind mit der mitochondrialen Membran verbunden, wo sie um proapoptotische Faktoren, wie Cytochrom C konkurrieren. Cytochrom C verbindet sich im Cytosol mit Apaf-1 und Procaspase 9, welche wiederum durch proteolytische Spaltung Caspase 3 aktivieren [83].

GM-CSF, sowie IL-2, IL-1 oder IL-8 beispielsweise sind Stimuli, die die Apoptose in Neutrophilen verzögern können und damit indirekt für erhöhte Neutrophilenaktivität sorgen. GM-CSF ist bei schwer Verletzten erhöht und sorgt für beeinträchtigte Fas-induzierte Apoptose [63, 68,]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass GM-CSF in Neutrophilen in vitro MCL-1 erhöht [32, 82]. Um diese Apoptoseresistenz zu überwinden, ist der Ansatzpunkt dieser Arbeit durch Fas in den Apoptoseweg einzugreifen und die Neutrophilenaktivierung zu vermindern.

In der Herstellung des LIM (Leukozyten-Inhibitions-Modul) wird ein agonistischer monoklonaler (mouse-anti-human) anti-Fas IgM verwendet, der mit einer besonderen Schutzschicht stabilisiert wird, und der auch im Blutfluss funktional bleibt. Bevor sie in Apoptose gehen, wird die chemotaktische Aktivität der Granulozyten herabgesetzt. Die dann durch Makrophagen und die Milz eliminierten Granulozyten sind nicht mehr in der Lage das Gewebe zu infiltrieren.

1.5 Das Leukozyten-Inhibitions-Modul (LIM)

Das Leukozyten-Inhibitions-Modul besteht aus einem Plastikgehäuse, welches ein Volumen von 70 ml fasst, mit einem offenporigen

Polyurethanschaum gefüllt ist und einen Blutstrom ohne nennenswerten Widerstand erlaubt. Es gibt einen Ein- und einen Ausflusstutzen, sodass das Blut mittels Dialysepumpe aus der Vene heraus in das LIM hineingeleitet wird. Dann durchfließt es das LIM und wird durch den Ausflusstutzen wieder in den Körperkreislauf zurückgeleitet. Innen ist es mit einem agonistischen Anti-Fas-IgM-Antikörper beschichtet.

Vorangegangene Studien haben einen positiven Effekt auf die Aktivierung der Neutrophilen in verschiedenen Bereichen gezeigt [13, 21, 26, 94]. Das LIM wurde bereits bei Patienten getestet, die sich einem kardiochirurgischen Eingriff unterziehen mussten. Es wurde in den Kreislauf der Herz-Lungen-Maschine geschaltet und es zeigte sich eine deutlich reduzierte Aktivierung der Neutrophilen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne LIM. Des Weiteren verhinderte es eine überschießende Immunantwort und verbesserte die hämodynamische Funktion der Patienten [1, 98].

1.6 Neutrophilen-Inhibierung während extrakorporaler Zirkulation in der Herz-Lungen-Maschine

In vorangegangenen Studien konnte ein positiver Effekt des LIM-Einsatzes in unterschiedlichen Fällen von Neutrophilen-Aktivierung gezeigt werden. Bei Einsatz der Herz-Lungen-Maschine mit LIM beim Patienten konnte bereits ein positiver Effekt des LIM auf Neutrophilen-Hyperaktivierung und überschießende Immunreaktionen gezeigt werden [98]. Auch die hämodynamische Funktion verbesserte sich unter LIM-Einsatz. Das Ziel der dieser Arbeit zugrunde liegenden Studie war es, die Effektivität des LIM bei der Prävention eines SIRS nach hämorrhagischem Schock zu prüfen.

1.7 Zielsetzung

Ziel 1: Etablierung und Standardisierung des Tiermodells

Wegen der Größe und der anatomischen Ähnlichkeit zum Menschen wurden für das hämorrhagische Schockmodell Schweine als Versuchstiere gewählt. Zur Bearbeitung der verschiedenen Fragestellungen wurde eine Arbeitsgruppe, bestehend aus 5 Doktoranden (Alberto Schek, Ingo Witte,

Jessica Baltes, Sarah Sadek und Annina Ott) gegründet. An der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf war dies das erste tierexperimentelle Forschungsprojekt zur posthämorrhagischen Inflammation und deren Prävention. Die Etablierung sowie Standardisierung des Tiermodells (Festlegung aller operativen und experimentellen Abläufe) sollte von allen Doktoranden unserer Arbeitsgruppe gleichberechtigt etabliert werden. Die Ergebnisse zur Etablierung und Standardisierung des Tiermodells, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben sind, sind daher als Gemeinschaftsarbeit an den entsprechenden Textstellen deklariert.

Zum Erreichen der folgenden Ziele wurden nachfolgend genannte Untersuchungen von mir persönlich durchgeführt.

Schwerpunkte meiner Untersuchungen waren:

Ziel 2: Darstellung der posthämorrhagischen Inflammation

- a) Bestimmung der posthämorrhagischen Leukozytenzahlen
- b) Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine im Blut
- c) histologische Bestimmung der posthämorrhagischen Gewebeeinfiltration

Ziel 3: Darstellung des Einflusses des Leukozyten-Inhibitions-Moduls (LIM) im extrakorporalen Kreislauf auf die posthämorrhagische Inflammation mittels

- a) Bestimmung der posthämorrhagischen Leukozytenzahlen
- b) Bestimmung der proinflammatorischen Zytokine im Blut
- c) histologische Bestimmung der posthämorrhagischen Gewebeeinfiltration

2 Material und Methoden

Die vorliegende Studie wurde gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes von der zuständigen Kommission der Bezirksregierung Düsseldorf genehmigt. Die Tierversuche wurden im Zeitraum von September 2005 bis März 2007 in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf von den Doktoranden der Arbeitsgruppe bestehend aus Alberto Schek, Ingo Witte, Jessica Baltes, Sarah Sadek, und Annina Ott unter Betreuung durch Dr. med. Tim Loegters und Leitung von Prof. Dr. phil. nat. Martin Scholz durchgeführt.

Die Themen der anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe sind im Einzelnen:

- Untersuchungen zum Einfluss des Leukozyten-Inhibitions-Moduls auf die posthämorrhagische Inflammation und Gewebehypoxie im Tiermodell (Gen- und Proteinexpression von HIF-1- α und HO-1, Konzentration von MDA), Alberto Schek
- Einfluss des Leukozyten-Inhibitions-Moduls auf die Hämodynamik im Tiermodell (Auswertung der Vitalparameter und BGAs), Ingo Witte
- Einfluss des Leukozyten-Inhibitions-Moduls auf die posthämorrhagische Apoptose im Gewebe (Bax, Bcl-2), Jessica Baltes
- Einfluss des Leukozyten-Inhibitions-Moduls auf die posthämorrhagische Gewebeschädigung (Serumparameter, Histologie im Hinblick auf Gewebeschädigung), Sarah Sadek

2.1 Versuchstiere

In die Studie wurden 24 Münchner-Miniaturschweine (TROLL Schweine) aufgenommen. Sie stammen aus einer Kreuzung des Hanford-Minischweins mit dem kolumbianischen Portionsschwein.

Die Tiere waren beiderlei Geschlechts (pro Gruppe jeweils 4 weibliche und 8 männliche Tiere) und wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf gezüchtet und gehalten. Insgesamt wurden 33 Tiere operiert, von denen allerdings nur 24 Tiere aufgrund der zuvor festgelegten Einschlusskriterien mit in die Studie eingeschlossen wurden. Als solche galten beispielsweise der Ziel MAP, sowie ausreichende Kreislaufstabilität während der Versuche und während der postoperativen Nachbeobachtungstage.

Um Standardwerte von gesunden Tieren zum Vergleich zu haben, wurden fünf Tiere, die zu keiner der beiden Versuchsgruppen gehörten, ohne jegliche Intervention euthanasiert und die Gewebeproben aufbereitet, sowie vor dem Tode Blutproben entnommen (Kontrollgruppe). Diese 5 Tiere werden nicht zu den in die Studie aufgenommenen 24 Tieren gezählt.

Alle Tiere waren klinisch gesund und wurden zwei Gruppen (jeweils n=12) zugeordnet. Die erste Gruppe bestand aus den Tieren bei denen zunächst ein hämorrhagischer Schock induziert wurde und danach ein extrakorporaler Kreislauf mit Einschaltung des LIM etabliert wurde (LIM-Gruppe). Die zweite Gruppe bildeten die Tiere bei denen lediglich der hämorrhagische Schock durchgeführt wurde (Standard Medical Care: SMC-Gruppe). Ein extrakorporaler Kreislauf wurde bei dieser Gruppe nicht etabliert.

Die Tiere hatten ein Körpergewicht von 30,3 +/- 3,3 kg.

2.1.1 Haltungsbedingungen

Die Tiere waren in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf in einem gekachelten, klimatisierten Raum mit Fenster untergebracht. Die künstliche Beleuchtung erfolgte im 12-Stunden-Rhythmus, um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen und Streß zu vermeiden. Wasser und Futter erhielten die Tiere ad libitum, nach der Operation zusätzlich eine Rotlichtlampe als Wärmequelle nach der Narkose.

2.2 Ablauf der Operation

2.2.1 Prämedikation und Narkoseeinleitung

Die Tiere standen 24 Stunden vor der Operation unter Nahrungskarenz und bekamen nur Wasser ad libitum. Im Vorraum des Stalls wurden die Tiere für den Transport in den Operationssaal mit einer intramuskulären Injektion von Ketamin (20 mg/ kg KG) sediert und anschließend unter Spontanatmung in den OP-Vorraum gebracht.

Die Narkoseeinleitung erfolgte nach Legen eines periphervenösen Zuganges in eine Ohrtrandvene mittels Stresnil (Azaperon, 2 mg/ kg KG) einem Neuroleptikum für Schweine, Atropin und Trapanal (Thiopental 3-5 mg/ kg KG).

Anschließend wurden die Tiere in Rückenlage unter laryngoskopischer Kontrolle orotracheal mit einem Endotrachealtubus aus Kautschuk (Durchmesser 6-7 mm) intubiert, anschließend wurde die richtige Lage des Tubus kontrolliert. Der Tubus wurde mittels Mullbinden und Pflaster fixiert, und ein Beißschutz aus Holz zwischen die Zähne eingelegt.

Um aseptische Operationsbedingungen zu haben und nach der Operation einen guten Halt der Pflaster zu gewährleisten, wurden die Schweine im ventralen Halsbereich und am Bauch großzügig geschoren.

Im Operationssaal wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Thermomatte auf dem OP-Tisch mit Mullbinden fixiert. Eine Rolle aus Zellstoff diente im Nacken zur Stütze und erleichterte die Operation. Es wurden Klammer-Elektroden zur Ableitung eines EKGs angebracht. Eine Ableitung wurde auf einem Monitor dargestellt. Am Ohr wurde ein Pulsoxymeter angebracht.

2.2.2 Anästhesie

Die Narkose wurde durch eine inhalative Anästhesie aufrechterhalten. Die Beatmung erfolgte mit Sauerstoff (21-30 %), Lachgas (60-70%) und Isoflurane (zwischen 1,0 und 2,5 %) als Inhalationsanästhetikum mittels eines Narkosebeatmungsgerätes (Fa. Dräger) und einer Einstellung des Atemzugvolumens auf 300-500 ml und einer Atemfrequenz von ca. 12/min.

Während der Operation bekamen die Tiere zur Basisvolumenssubstitution 500 ml einer 5-prozentigen Glukose-Infusion mit 10 ml Inzolen. Des Weiteren bekamen die Tiere, je nach intraoperativem Bedarf, 1 ml Dipidolor (7,5 mg Piritramid) und Fentanyl die intravenös verabreicht wurden.

Eine ausreichende Ventilation wurde mittels Kapnografie gewährleistet, die kontinuierlich auf einen Wert zwischen 36 und 44 mm Hg eingestellt wurde.

2.2.3 Katheterimplantation

Nach Fixierung auf dem Operationstisch, dreimaliger Desinfektion des Operationsgebietes mit jodhaltigem Desinfektionsmittel und steriler Abdeckung mit OP-Tüchern und OP-Folie (Opsite Folie) wurde mit der Operation begonnen.

2.2.3.1 Blasenkatheter

Zunächst wurde durch eine mediane Laparotomie, mit einem Schnitt von circa 5 cm Länge, die Harnblase freipräpariert. An der Harnblase wurde eine Tabaksbeutelnaht angelegt und in der Mitte mittels eines Blasenpunktionssets (Zystofix) mit der Punktionsnadel die Harnblase punktiert. Der Katheter blieb in der Blase, die Punktionsnadel wurde entfernt und der Katheter mittels Tabaksbeutelnaht fixiert. Ein Auffangbeutel für den Urin wurde angeschlossen. Es folgten Fascienverschluss, Subkutannaht und schließlich eine Hautnaht.

2.2.3.2 Implantation von arteriellem Katheter, Shaldon- und Swan-Ganz-Katheter

Anschließend wurde eine mediane Cervikotomie durchgeführt mit einem Hautschnitt von ca. 10-15 cm Länge und vorsichtig in die Tiefe präpariert. Eine Arteria Carotis interna und beide Venae Jugulares externae wurden freipräpariert und mit Vessel-Loops angeschlungen.

In die Arteria Carotis interna wurde ein arterieller Katheter nach Punktion der Arterie mittels Seldinger-Technik eingeführt. Die Durchgängigkeit des Katheters wurde überprüft und der Katheter mittels Naht am subkutanen Fettgewebe fixiert. Über diesen Katheter fand die arterielle Druckmessung statt.

In eine Vena Jugularis externa wurde ein 3-lumiger Shaldon-Katheter mithilfe der Seldinger-Technik implantiert und auf Durchgängigkeit überprüft. Über diesen Katheter erfolgte die „Entblutung“ der Tiere zur Simulation des Schocks.

In die andere Vena Jugularis externa wurde ein Pulmonalkatheter (Swan-Ganz-Katheter) eingeführt. Dieser Katheter wird über die V. jugularis und das venöse System mit Hilfe eines Ballons an der Katheterspitze mit dem Blutfluss durch das rechte Herz bis in einen Ast der Arteria Pulmonalis mit dem Blutfluss „eingeschwemmt.“ Der Katheter wird hierzu mit Hilfe eines speziellen Einführungsbesteckes in die Vene eingeführt. Sobald er die

Einführschiene verlassen hat, kann er aufgeblasen werden und so mit dem Blutstrom bis in die Arteria Pulmonalis gelangen.

Die richtige Lage des Katheters lässt sich anhand der Druckkurven ermitteln, die auf dem Monitor dargestellt werden. Zunächst erscheint eine Vorhof-, dann die typische Ventrikeldruckkurve. Wenn der Katheter in die Arteria Pulmonalis gelangt, kommt es zu einem „Drucksprung,“ eine charakteristische Veränderung der Druckkurve, welche die richtige Lage des Katheters kennzeichnet.

2.2.4 Intraoperatives Monitoring und Katheterfunktion

Der in der Arteria Carotis liegende arterielle Katheter wurde an einen Druckdom angeschlossen, sodass eine kontinuierliche Messung des arteriellen Blutdruckes möglich war. Des Weiteren wurden in Abständen von 10 Minuten über diesen Katheter Blutproben für arterielle Blutgasanalysen (ABL 800 Flex BGA-Gerät) entnommen.

Über den Shaldon-Katheter wurde zu den in der Tabelle gezeigten definierten Zeitpunkten Blut entnommen. Hierbei handelte es sich jeweils um EDTA-Blut für das Differentialblutbild, welches sofort vor Ort bestimmt wurde. Außerdem wurde Serum für andere Parameter aus dem Zentrallabor (z.B. Kreatinin, Kreatinkinase, Troponin etc. (Sadek, 2010)) und für ELISAs entnommen, sowie Citrat-Blut zur Bestimmung der Gerinnung und Na-Heparin-Blut für die funktionellen Tests (Chemotaxis etc.). Das Differentialblutbild wurde mit einem speziell für Schweine zugelassenen Gerät gemessen (VET-abc). Des Weiteren wurde der hämorrhagische Schock über diesen Katheter eingeleitet.

Mit dem Pulmonalkatheter wurde das Herzminutenvolumen, der Druck in der Pulmonalarterie, der so genannte pulmonal-kapilläre-Verschlussdruck (**pulmo-capillary wedge pressure=pcwp**, kurz Wedge-Druck) und der zentrale Venendruck bestimmt. Außerdem wurde darüber die gemischt-venöse-Sauerstoffsättigung gemessen. Zur Kalibrierung dieses Gerätes wurde eine gemischt-venöse BGA aus dem gelben Schenkel des Swan-Ganz-Katheters entnommen und die notwendigen Werte in das Gerät eingegeben (Vigilance

Monitor, Siemens SC 9000). Auch dieser Katheter wurde an den Druckdom angeschlossen.

Mit allen angeschlossenen Geräten konnten nun alle fünf Minuten folgende Parameter bestimmt werden: HF, RR, MAP, ZVD, Temperatur, HZV, SvO₂, MPAP, PCWP, PcO₂, FiO₂ und die Atemfrequenz (Witte 2010). Alle 10 Minuten wurde eine BGA erstellt, um einen kontinuierlichen Verlauf der Blutgase darstellen zu können.

2.2.5 Hämorrhagischer Schock

Nach einer statischen Phase von 15 Minuten nach Implantation aller Katheter und Anschluss der Messgeräte wurde der hämorrhagische Schock eingeleitet. Unter sterilen Kautelen wurde mit einer 50 ml Spritze innerhalb von 15 Minuten über den Shaldonkatheter soviel Blut entnommen, dass der MAP auf 35 +/- 5 mm Hg sank. Hierzu mußten 300-600 ml Blut entnommen werden. Dieser MAP wurde nun durch intermittierende Blutentnahmen über eine 50 ml Spritze für weitere 45 Minuten konstant (40 +/- 5 mm Hg) gehalten, so dass die Schockphase genau eine Stunde dauerte. Insgesamt betrug die Menge an entnommenem Blut während Schockeinleitung und –aufrechterhaltung 400-900 ml.

Direkt im Anschluss begann die Reperfusion mit Ringerlösung. In den 15 Minuten der Reperusionsphase wurde den Schweinen ca. 1 Liter der Lösung infundiert. Diese Infusion lief im Verlauf der Operation weiter sodass am Ende der Operation die 3-fache Menge des entnommenen Volumens substituiert war.

2.2.6 LIM-Phase

Das LIM ist ein thermoplastisches Modul, welches einen Polyurethanschaum enthält, der mit CD 95 beschichtet ist. Dieser Schaum erlaubt durch seinen spezifischen dreidimensionalen Aufbau einen Blutfluss von 300 ml/min durch das LIM. Insgesamt fasst das LIM ein Volumen von ca. 70 ml.

Nach der 15-minütigen Reperusionsphase folgte in der LIM-Gruppe der Anschluss des LIM über einen Zeitraum von drei Stunden. Durch einen Schenkel des Shaldon-Katheters wurde das venöse Blut mithilfe einer

Dialysepumpe (Flussgeschwindigkeit ca. 300ml/ min) durch das LIM hindurch geleitet. Nachdem das Blut durch das LIM zirkuliert war, wurde es wieder über den venösen Katheter in den Kreislauf des Schweins zurückgeleitet. Die SMC-Gruppe wurde lediglich über denselben Zeitraum narkotisiert gelassen und beobachtet. Ein extrakorporaler Kreislauf wurde in der SMC-Gruppe nicht etabliert.

2.2.7 Zeitpunkte der Blutentnahmen für die funktionellen Tests

Vor Beginn der Versuche wurden durch die Arbeitsgruppe gemeinsam die Zeitpunkte festgelegt, zu denen Blutentnahmen erfolgen sollten. Zu jedem Zeitpunkt wurden sowohl die Differentialblutbilder direkt in der TVA gemessen, als auch die anderen Proben für die später erfolgten Tests asserviert. Für diese Arbeit waren dies die Proben für ELISA und Chemotaxis.

Prä Schock	Abnahme zu Beginn der Narkose, bevor die Tiere in den Schock versetzt wurden, nach Anlage aller Katheter
Ende der Entblutung	Nach den ersten 15 Minuten Schock, in denen die größte Menge Blut entnommen wurde
Ende Schock	Nach 60 Minuten Schock, vor Beginn der Reperfusion
15 Minuten nach Ende Schock	LIM-Gruppe: vor Anschluss des LIM
25 Minuten nach Ende Schock	LIM-Gruppe: 10 Minuten nach Anschluss des LIM SMC-Gruppe: nach 10 Minuten Beobachtung ohne extrakorporalen Kreislauf
45 Minuten nach Ende Schock	LIM-Gruppe: 30 Minuten nach Anschluss des LIM SMC-Gruppe: nach 30 Minuten Beobachtung ohne extrakorporalen Kreislauf
75 Minuten nach Ende Schock	LIM-Gruppe: 60 Minuten nach Anschluss des LIM SMC-Gruppe: nach 60 Minuten Beobachtung ohne extrakorporalen Kreislauf
135 Minuten nach Ende Schock	LIM-Gruppe: 120 Minuten nach Anschluss des LIM SMC-Gruppe: nach 120 Minuten Beobachtung ohne extrakorporalen Kreislauf
195 Minuten nach Ende Schock	LIM-Gruppe: 180 Minuten nach Anschluss des LIM SMC-Gruppe: nach 180 Minuten Beobachtung ohne

	extrakorporalen Kreislauf
24 Stunden	8 Uhr Erster Tag nach Schock
36 Stunden	20 Uhr Erster Tag nach Schock
48 Stunden	8 Uhr Zweiter Tag nach Schock
60 Stunden	20 Uhr Zweiter Tag nach Schock (12 Schweine)
72 Stunden	8 Uhr Dritter Tag nach Schock (12 Schweine)

Tabelle 2: Blutentnahmezeitpunkte

2.2.8 Aufbau des LIM

Vereinfacht dargestellt ist der extrakorporale Kreislauf mit LIM (Leukocare, München) als Schema. Mithilfe der Dialysepumpe wird das Blut über den Shaldonkatheter, aus dem Blutkreislauf des Tieres heraus, durch das LIM hindurchgeleitet. Hierbei kommen die Neutrophilen in Kontakt mit dem mit agonistischem Anti-Fas-IgM-Antikörper beschichteten Polyurethanschaum, werden jedoch nicht herausgefiltert. Das LIM fasst ein Volumen von ca. 70 ml. Nachdem das Blut durch das LIM hindurchgeleitet wurde, wird es über den Shaldonkatheter wieder zurück in die Vene geleitet.

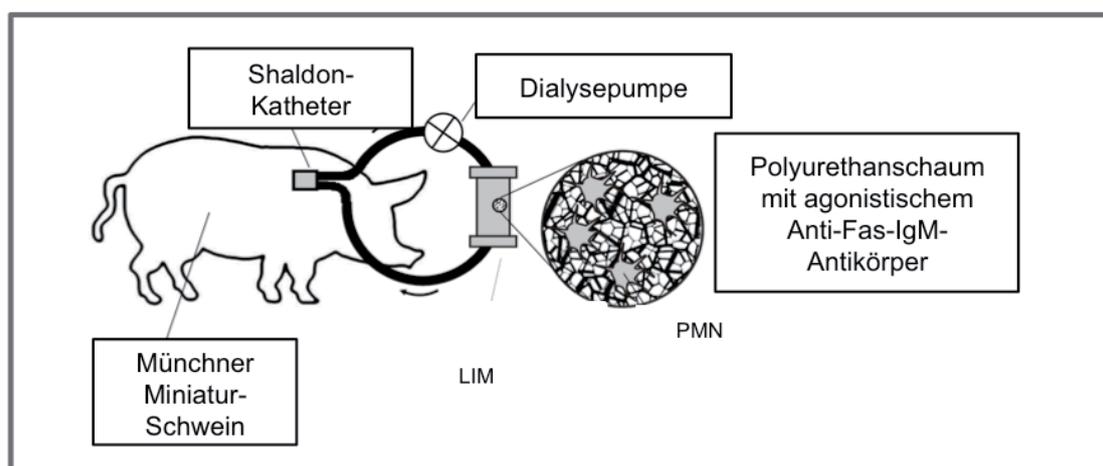


Abbildung 1: Extrakorporaler Kreislauf mit eingeschaltetem LIM, modifiziert nach Loegters et al, Journal of Inflammation, 2010 [70].

Der extrakorporale Kreislauf mit Shaldonkatheter, Dialysepumpe, LIM und Beatmungsgerät wird im Folgenden nochmals anhand von Bildern aus der Tierversuchsanlage gezeigt.

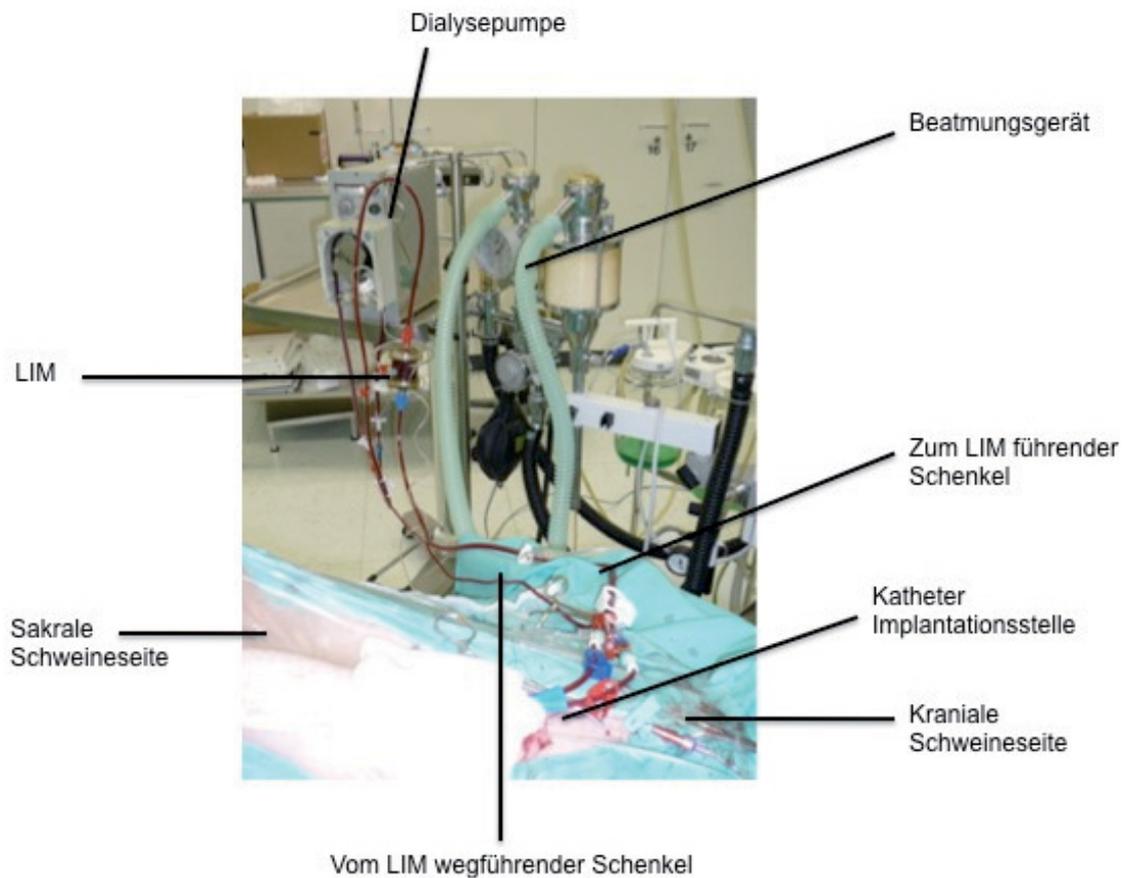


Abbildung 2: Extrakorporaler Kreislauf am Schwein mit Kathetern, Dialysepumpe und Beatmungsgerät

Einen Detailausschnitt zeigt das folgende Bild, auf dem das Plastikgehäuse des LIM abgebildet ist mit Ein- und Ausflusstutzen, gefüllt mit Blut während des extrakorporalen Kreislaufes.

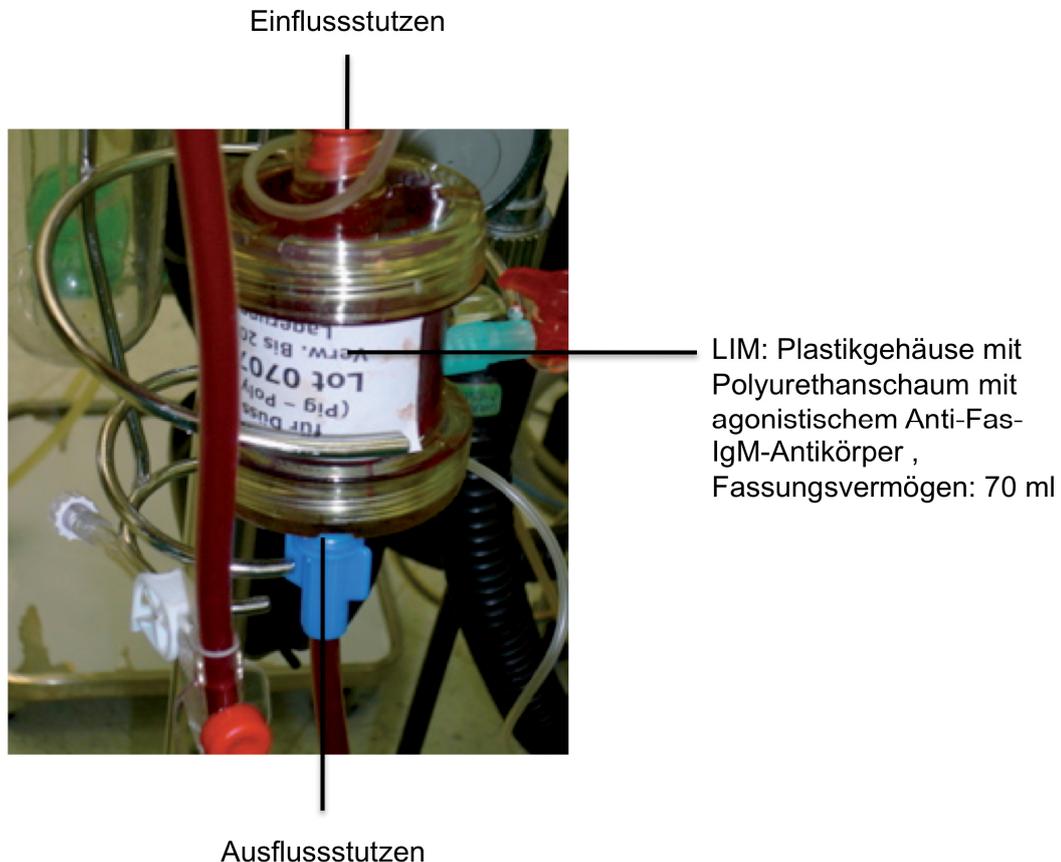


Abbildung 3: Das LIM im Detail

2.2.9 Ende der Operation

Nach Beendigung des Versuches wurde das LIM mit einer Heparinlösung gespült und diese Spülflüssigkeit in den Kreislauf des Tieres geleitet, damit durch das LIM kein größerer Blutverlust entstand. Insgesamt bekam damit jedes Tier über den Zeitraum der Operation 5000 IE Heparin. Ebenso in der SMC-Gruppe.

Auch die anderen Katheter wurden mit Heparinlösung gespült, verschlossen und unter der Haut vernäht. Ein Schenkel des venösen Shaldon-Katheters wurde durch die Hautnaht nach außen geleitet, damit die Blutentnahmen beim wachen Tier durchgeführt werden konnten. Die Wunden wurden genäht und mit einem Pflaster verschlossen. Auch der suprapubische Blasen Katheter

verblieb am Tier, so dass an den postoperativen Tagen auch Urinproben entnommen werden konnten.

Die Narkose wurde ausgeleitet. Bei ausreichender Spontanatmung und Schutzreflexen wurden die Tiere extubiert und wieder in den Stall zurückgebracht. Eine Wärmelampe diente zur Behandlung des postoperativen „Shiverings“. Sobald die Tiere wieder bei Bewusstsein waren, wurden sie aus der Beobachtung entlassen.

2.2.10 Nachbeobachtung

An den folgenden Tagen wurde jeweils morgens um 8 Uhr und abends um 20 Uhr der Urinbeutel entleert, sowie aus dem ausgeleiteten Schenkel des Shaldon-Katheters Blut zur Bestimmung der Gerinnung, des Differentialblutbildes, Serum und einer BGA entnommen. Wenn notwendig, wurden die Tiere dazu durch eine Person der Arbeitsgruppe fixiert. Je nach Nachbeobachtungszeitraum überlebten die Tiere 2 (48 Stunden) oder 3 Tage (72 Stunden).

Am jeweiligen letzten Tag wurden die Tiere wie am ersten Versuchstag narkotisiert und alle Katheter wurden wieder an die Monitore angeschlossen. Nach einer statischen Phase von 10 Minuten wurden über 15 Minuten die hämodynamischen Parameter, sowie BGA und Differentialblutbild bestimmt. Im Anschluss wurden die Tiere mit einem Barbiturat, in diesem Fall Eutha 77, euthanasiert.

2.2.11 Präparation der Organe und Gewebeschnitte

Nachdem der Tod der Tiere durch Asystolie im EKG und Weitstellung der Pupille bestätigt war, wurden die Tiere in den Sektionsraum gebracht. Dort wurde durch einen großen Bauchschnitt und Entlastungsschnitte an den Vorderbeinen die Entnahme der Organe vorbereitet. Es wurden Schnitte aus dem linken Ventrikel des Herzens, hilusnahe sowie periphere Anteile der Lunge, aus dem terminalen Ileum, aus der Milz, der Leber und der Niere entnommen. Pro Organ wurden insgesamt 3 Proben entnommen und jeweils in Formaldehyd (4%), Glutaraldehyd (25%) und in flüssigem Stickstoff fixiert.

Um einen Vergleich zu haben, wurde – zusätzlich zu der LIM- und SMC-Gruppe - von fünf Kontrolltieren Blut und die Organe zur histologischen Untersuchung entnommen.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden mit Chloracetatesterase gefärbten Schnitte, wurden aus den in Formaldehyd (4%) fixierten Schnitten angefertigt.

Die Präparate wurden auf dafür vorgesehene Kassetten zugeschnitten.

Die in Glutaraldehyd fixierten Schnitte wurden durch Professor Cinatl vom Institut für Medizinische Virologie in Frankfurt am Main weiterverarbeitet geschnitten und fotografiert.

Die Asservierung der Gewebeproben und deren Fixierung wurden durch die gesamte Arbeitsgruppe durchgeführt. Die Schnitte, Färbung und Auswertung für die Chloracetatesterasefärbung erfolgte von mir persönlich.

2.3 Gewebefixierung für histologische Untersuchungen

2.3.1 Paraffineinbettung

Die Verarbeitung der Gewebeschnitte erfolgte nach Anleitung aus „Romeis-Mikroskopische Technik“ von Maria Mulisch und Ulrich Welsch.

Zunächst wurde das Formaldehyd (4%-ig) aus dem Gewebe ausgewaschen und dann mit einer aufsteigenden Alkoholreihe stufenweise entwässert. Der Alkohol wurde mittels Xylol aus dem Gewebe entfernt und das Gewebe in heißem Paraffinwachs getränkt. Es folgte das Schneiden mit dem Schlittenmikrotom, danach wurden die Schnitte getrocknet, mit Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt.

2.3.2 Chloracetatesterasefärbung

Da in der Chloracetatesterasefärbung die Neutrophilen einfacher zu detektieren sind wurde diese Färbung zur Bestimmung der Gewebeeinfiltration durch Neutrophile gewählt.

Zunächst wurde Hexazonium hergestellt. 50 mg basisches Fuchsin wurden in 3 ml 1 N-HCL vollständig gelöst und anschließend 0,5 ml 1 M Nantitrit (0,69 g auf 10 ml A. dest) zugegeben. Dieses Gemisch wurde 5 Minuten bei RT stehengelassen und 1 ml Aliquot eingefroren.

2.3.2.1 Färbung

100 ml PBS, 1 ml Hexazonium und 35 mg Naphtol AS-D-Chloracetat wurden in 2 ml DMSO gelöst. Anschließend wurden sie gut gemischt und filtriert, bei 60°C über eine Stunde inkubiert und anschließend unter heißem Wasser abgespült. Es folgte die Gegenfärbung mit Hämalaun 1:2 mit A. dest verdünnt, „Bläuung“ für 3 Minuten unter fließendem Wasser. Dann Eindeckung mit Aquamont. Die Zählung erfolgte mit einem Mikroskop bei 10-facher Vergrößerung in 10 unterschiedlichen Hochleistungsfeldern pro Schnitt. Mittelwerte von jedem Organ und Tier wurden zu vorher definierten Mengenbereichen (Zählung/ mm²) zugeordnet (0-5, 6-10, 11-20, 21-50, 51-100, 101-500).

2.4 Funktionelle Tests

Zur Messung der funktionellen Aktivität Neutrophiler wurde nachfolgend genannter Test durchgeführt.

2.4.1 Experimente zur semiquantitativen Bestimmung der chemotaktischen Aktivität Neutrophiler

2.4.1.1 Zellisolierung

Die Experimente wurden mit Vollblut aus Na-Heparin-Röhrchen durchgeführt. Zunächst wurden aus dem Blut mittels Polymorphprep Granulozyten isoliert. 5 ml Polymorphprep wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und mit 5 ml Blut (Na-Heparin) überschichtet. Die Proben wurden daraufhin für 30 min bei 450-500 g (1600 rpm) und RT ohne Bremse abzentrifugiert. Danach waren die einzelnen Komponenten nach dem Dichtegradienten verteilt. Am Boden befanden sich die Erythrozyten, es folgten die Neutrophilen und die mononukleären Zellen.

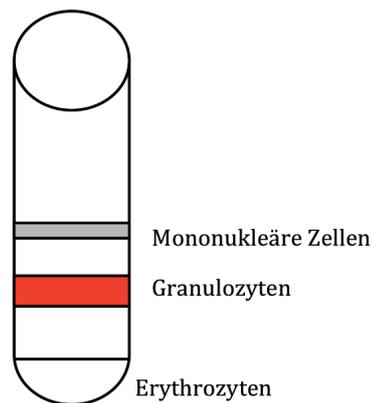


Abbildung 4: Die unterschiedlichen Zellpopulationen getrennt nach dem Dichtegradienten

Der Überstand wurde mit Hilfe einer Pasteur-Pipette, bis zur Schicht der Granulozyten verworfen. Diese wurden in ein frisches Falcon-Röhrchen überführt. Das Falcon-Röhrchen wurde mit PBS aufgefüllt und bei 1600 rpm und 4°C für eine Dauer von 10 Minuten gewaschen. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde anschließend in PBS, Zellkulturmedium (500ml RPMI-Medium, 10% FCS (50ml), 1% Pen-Strep (5ml)) oder 1 ml Trizol aufgenommen.

2.4.1.2 Boyden-Kammer-Technik

Das Pellet wurde in ca. 5 ml Medium resuspendiert. Danach wurden die Zellen mit Trypanblau angefärbt und in der Neubauerkammer gezählt. Anhand dieses Ergebnisses wurde die Zellzahl auf $0,5 \times 10^6$ /ml eingestellt.

In jedes untere Well einer 12-Well-Platte mit Siebeinsatz wurde 1 ml Medium mit IL-8 (Aliquots bei -20°C, Konzentration 10 µg/ml wird mit Zellkultur-Medium verdünnt. 100 ng/ml werden im Test benötigt, d.h. 1:100 Verdünnung) pipettiert. In 3 Wells wurde zur Kontrolle Medium ohne IL-8 gegeben.

Anschließend wurde auf das Zellsieb 0,5 ml verdünnte Zellsuspension ($0,5 \times 10^6$ /ml) pipettiert. Die Platten wurden über einen Zeitraum von einer Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Siebeinsätze mit einer Pinzette entfernt und verworfen.

In jeweils eines der drei Wells wurden 0,5 ml Fixierlösung (1% Glutaraldehyd in RPMI-Medium ohne Zusätze) pipettiert, fünf Minuten bei RT inkubiert und

danach verworfen. Danach wurden Zellkern und Zytoplasma mittels Diff-Quick Färbeset (Fa. Medion Diagnostics) nach Anleitung angefärbt, um die gewanderten Granulozyten besser differenzieren zu können. Dies wurde wie folgt durchgeführt:

1. In drei unterschiedlichen Eintauchbehältern wurden drei Diff-Quick-Lösungen bereitgestellt
2. Der Objektträger mit der zuvor aufgetragenen und nun getrockneten Suspension wurde für jeweils 5 Sekunden mit einer Pinzette zuerst in die Fixierlösung, dann in Färbelösung 1 und danach in Färbelösung 2 getaucht. Zwischen den einzelnen Eintauchbehältern wurde überschüssige Farbe abgetropft.
3. Der Objektträger wurde mit A. dest. von beiden Seiten gespült und dann luftgetrocknet.

Zusammensetzung der Lösungen:

- Fixierlösung: Fast-green in Methanol
- Färbelösung 1: Eosin Y in Phosphatpuffer, Natriumazid
- Färbelösung 2: Thiazin-Farbstoff in Phosphatpuffer

Pro Well wurden 5 Blickfelder mit Rastereinsatz mikroskopisch unter 40-facher Vergrößerung ausgezählt.

2.4.2 Zytokinmessung mittels ELISA

Zur Bestimmung von IL-1-beta, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alpha und Interferon-gamma wurde ein ELISA – Enzyme linked Immunosorbant Assay – durchgeführt. Hierbei handelt es sich um den sogenannten quantitativen Sandwich-Assay. Der Antikörper für das zu bestimmende Antigen ist an eine 96-Well-Mikrotiterplatte gekoppelt. In diesem Fall handelt es sich um einen monoklonalen Maus Antikörper, der für porcine IL-1-beta, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alpha und Interferon-gamma spezifisch ist. Wird nun das korrespondierende Antigen der Probe hinzugegeben bindet es an den primären Antikörper. In einem zweiten Schritt wird ein enzym-markierter Zweitantikörper hinzugegeben, der den primären Antikörper unter Bildung eines „Sandwich“ (Antigen-Antikörper-Komplex) bindet. Nun kann in einer photometrischen Messung die Menge des gebundenen Antigens gemessen

werden. Es wird eine Standardkurve erstellt. Die Höhe der Antigenkonzentration des Standards korreliert mit der Menge des gebundenen Antigens. Es wurden fertige Kits der Firma R&D Systems für porkines Serum verwendet.

Die für die ELISAs verwendeten Blutproben waren zu den zuvor definierten Zeitpunkten aus dem Serum gewonnen worden und bis zur Messung der ELISAs eingefroren worden bei -20°C .

2.4.2.1 Durchführung

Zunächst wurden $50\ \mu\text{l}$ Verdünnungslösung in jede Vertiefung der 96-Well-Platte aufgebracht. Dann wurde $100\ \mu\text{l}$ Standard-Lösung, Kontroll-Lösung oder zu messende Probe in vorher markierte Vertiefungen pipettiert. Die Platte wurde mit Folie abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur unter Bewegung auf einem Schüttler inkubiert.

Danach wurden die Lösungen entfernt und jedes Well fünf Mal gewaschen. Daraufhin wurden $200\ \mu\text{l}$ Konjugat-Lösung zu jedem Well hinzugefügt. Die Platten wurden erneut abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Es folgte eine erneute fünfmalige Waschung mit Waschpuffer.

Im Anschluss daran erfolgte ein Auftragen von $200\ \mu\text{l}$ porkinem Streptavidin-HRP in jedes Well. Die Platte wurde erneut mit Folie abgedeckt und für 30 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach erfolgte eine erneute fünfmalige Waschung. Anschließend wurde $120\ \mu\text{l}$ Substrat-Lösung in jedes Well hinzugefügt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation ohne Bewegung im Dunkeln bei RT. Hiernach wurden $120\ \mu\text{l}$ Stop-Lösung in jedes Well hinzugefügt. Es erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei einer OD von 450 nm.

Aquamont	Fa. Dako, Hamburg, Deutschland
Arterieller Katheter 5 Fr	Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
Atropinsulfat 0,5 mg/ ml	Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
Azaperon (Stresnil)	Fa. Janssen Pharmaceutica Beerse,

Material und Methoden

	Belgien
Costar Stripetten in 5,0ml und 10,0ml	Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Combitips Plus 10 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cystofix Blasenkatheeter	Fa. Braun, Melsungen, Deutschland
Diff-Quick-Färbeset	Medion Diagnostics
Dispenser Multipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
DH-Rhodamine 123 2 mg DHR + 5 ml Dimethylformamid	Fa. Sigma, Deutschland
DMSO	Fa. Sigma, Deutschland
DPBS mit Ca und Mg	Pan Biotech
EDTA 0,04g in 1 .A.-dest	Fa. Sigma
Einführungsschleuse 8 Fr	Fa. Edwards Lifesciences, Irvine, California
Eutha 77 (Phenobarbital)	Fa. Veterinaria AG, Zürich, Schweiz
Falcon-Tubes 50 ml	Becton & Dickinson, Heidelberg,
FCS-Gold	PAA
Fentanyl 50µg/ml	Fa. Ratiopharm, Ulm, Deutschland
Filter Tips	Star Lab
Formaldehyd (4%)	Fa. Sigma, Deutschland
Fuchsin basisch	Fa. Serva 21911601
Glutaraldehyd 25%, 1%	Fa. Merck, Deutschland
Hämalaun	Fa. Sigma, Deutschland
Isoflurane (1%)	Fa. Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Ketamin	Fa. Veterinaria AG, Zürich, Schweiz
Mehrkanalpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nanitrit	Fa. Sigma, Deutschland
Naphtol	Sigma N 0758
NH ₄ CL 8,29g	Fa. Sigma, Deutschland
Pasteur-Pipette	Greiner bio-one, Deutschland
PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Pen-Strep	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Pipetten Research und Reference jeweils in den Größen 0,5-10µl/10-	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Material und Methoden

100µl/100-1000µl	
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland STARLAB, Ahrensburg, Deutschland
Polymorph-Prep	Axis-Shield, Norway
Polypropylen-Röhrchen Falcon 15ml	Greiner, Deutschland
Quantikine Porcine IL-10	Fa. R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Quantikine Porcine IL-1-beta	Fa. R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Quantikine Porcine IL-8	Fa. R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Quantikine Porcine TNF-alpha	Fa. R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Quantikine Porcine IL-6	Fa. R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Quantikine Porcine Interferon-gamma	Fa. R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Reaktionsgefäße safe-lock 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
rhIL-8 recomb. Human (E.coli-derived)	Fa. R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Ringerlösung	Fa. Deltaselect, Köln, Deutschland
RPMI-1640-Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Shaldonkatheter 8 Fr, 3-lumig	Arrow/Teleflex Medical, Westmeath, Ireland
Swan- Ganz- Katheter	Fa. Edwards Lifesciences, Irvine, California
Trizol	Fa. Sigma, Deutschland
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Vacutainer-Li-Heparin 6ml	Becton Dickinson, Heidelberg,
Waschpuffer	Fa. R&D Systems, Wiesbaden,
12-Well-Platte	Greiner bio-one, Deutschland
5-50 ml Spritzen	Fa. B. Braun Melsungen AG
Xylol	Fa. Sigma, Deutschland

Tabelle 3 Materialien

Accujet pro	Brand, Wertheim, Deutschland
ABL 800 Flex BGA-Gerät	Fa. Radiometer GmbH, Willich, Deutschland
Axioskop 40	Zeiss
Hera Cell 150 Inkubator	Thermo, Dreieich, Deutschland
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Schüttler KS250	VWR
SC 9000 Monitor	Fa. Siemens, Erlangen, Deutschland
VET-abc	Fa. Scil Animal Care Company, Viernheim
Vigilance Monitor	Fa. Edwards Lifesciences, Irvine, California
Vortex Reaxtop	Heidolph, Schwabach, Deutschland

Tabelle 4 Geräte

2.5 Einstellung des hämorrhagischen Schockmodells

2.5.1 Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck

Die Messung der Herzfrequenz erfolgte mittels EKG-Ableitung, wie zuvor beschrieben, und Aufzeichnung an einem Monitor. Alle 5 Minuten wurden die Daten manuell in eine Tabelle eingetragen. Die Blutdruckmessung erfolgte wie zuvor erklärt über einen arteriellen Katheter, auch diese Daten wurden manuell in einer Tabelle festgehalten und später ausgewertet.

Das hier beschriebene Schockmodell wurde anhand empirischer Daten zu Schockzuständen erstellt. Der MAP während des Schocks war so eingestellt, dass die Tiere unter Stress gestellt wurden, jedoch nicht starben. In beiden Gruppen stieg mit Absinken des MAP die HF an - ein physiologischer Mechanismus im Schock. Nach Substitution von Volumen in Form von NaCl stabilisierten sich MAP und HF etwas, erreichten aber nicht wieder ihren Ausgangswert.

2.6 Statistische Auswertung

Für den Vergleich der Leukozytenzahlen im peripheren Blut zwischen LIM- und SMC-Gruppe wurden zwei Tests auf 95 % Wahrscheinlichkeit benutzt.

Den Wilcoxon- und den „Van der Werden-Exact-Test.“ $p < 0,05$ wird in dieser Arbeit als signifikant erachtet. Die Daten sind als Mittelwert \pm SEM (Standardfehler) dargestellt. Die histologischen Ergebnisse, ebenso wie Chemotaxis und die ELISAs wurden nicht statistisch ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Quantitative Messung der einzelnen Leukozytenpopulationen im Differentialblutbild

Die Messung des Differentialblutbildes fand an einem speziell für Schweine zugelassenen Gerät, direkt in der TVA statt (VET-abc, Fa. Scil Animal Care Company, Viernheim).

3.1.1 Anzahl der Gesamtleukozyten

Dargestellt sind jeweils die Messungen zu den zuvor festgelegten Zeitpunkten während des ersten Versuchstages (Kap. 2.2.7, Tab. 2).

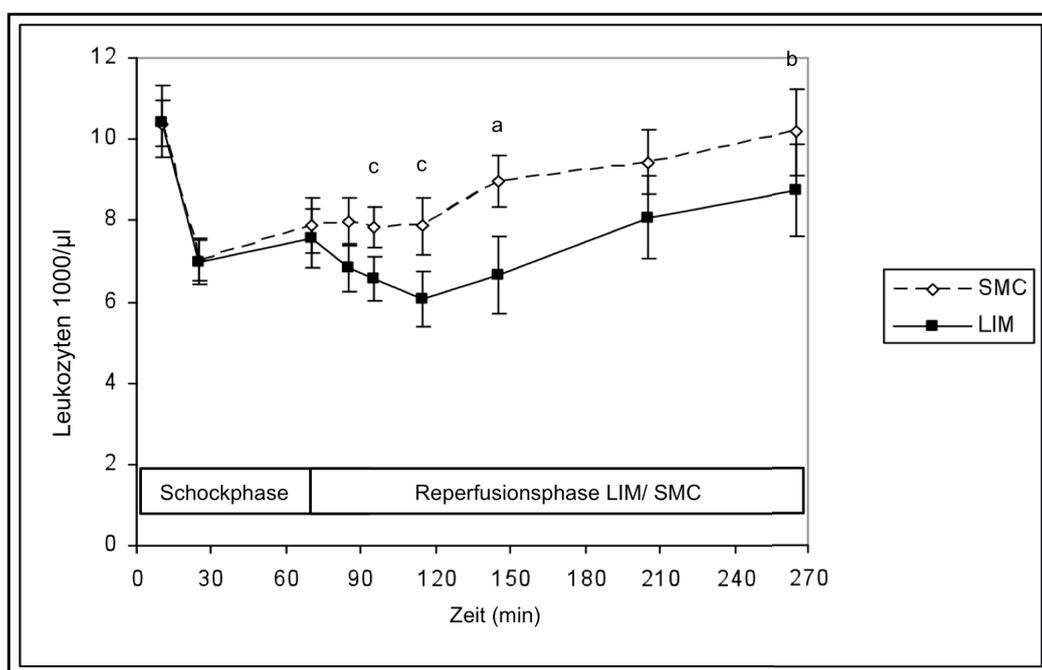


Abbildung 5: Anzahl der Leukozyten: Vergleich der SMC-Gruppe mit der LIM-Gruppe modifiziert nach Loegers et al, Journal of Inflammation, 2010 [70].

Dargestellt sind $MW \pm SEM$ der absoluten Leukozytenzahlen in $1000/mm^3$ aller Schweine einer Gruppe zu definierten Zeitpunkten aus dem Differentialblutbild $n=12$ pro Gruppe.

- Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen SMC- und LIM- Gruppe: a
- Statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied, verglichen mit den Werten bei Ende des Schocks (70 min) in der SMC-Gruppe: b
- Statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied, verglichen mit den Werten bei Ende des Schocks (70 min) in der LIM-Gruppe: c

Die Messungen an den darauffolgenden Tagen wurden nicht grafisch dargestellt, finden aber im Text Erwähnung. Die Referenzwerte für Schweine liegen zwischen $3,5$ und $10 \times 1000/\text{mm}^3$. Im Mittel betrug die Zahl der Leukozyten insgesamt bei den unbehandelten Kontrolltieren $9,35 \times 1000/\text{mm}^3$.

In der Abbildung 5 ist die durchschnittliche Anzahl der Leukozyten im Differentialblutbild dargestellt – jeweils für die SMC-Gruppe und die LIM-Gruppe.

Vor Einleitung der Entblutung (Schockeinleitung) war die Anzahl der Leukozyten in der LIM-Gruppe im Vergleich zur SMC-Gruppe nahezu identisch (SMC-Gruppe: $10,39 \pm 0,57 \times 1000/\text{mm}^3$; LIM-Gruppe: $10,43 \pm 0,9 \times 1000/\text{mm}^3$). Nach der Entblutung, also zu Beginn des Schocks, war die Anzahl der Leukozyten in der SMC-Gruppe etwas höher als in der LIM-Gruppe (SMC-Gruppe: $7,03 \pm 0,51 \times 1000/\text{mm}^3$; LIM-Gruppe: $6,97 \pm 0,53 \times 1000/\text{mm}^3$). Bei Schockende war die Anzahl der Leukozyten in der LIM-Gruppe weiterhin geringer als in der SMC-Gruppe (SMC-Gruppe: $7,87 \pm 0,67 \times 1000/\text{mm}^3$; LIM-Gruppe: $7,56 \pm 0,74 \times 1000/\text{mm}^3$).

Sobald das LIM in der LIM-Gruppe eingesetzt wurde, zeigte sich ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Die Anzahl der Leukozyten in der LIM-Gruppe sank, sobald das Blut durch das LIM zirkulierte. In der SMC-Gruppe hingegen stieg die Anzahl der Leukozyten stetig an. 25 Minuten nach Anschluss des LIM befanden sich im Blut der SMC-Gruppe $7,99 \pm 0,54 \times 1000/\text{mm}^3$ im Blut der LIM-Gruppe waren es $6,83 \pm 0,57 \times 1000/\text{mm}^3$ Leukozyten. In der LIM-Gruppe zeigte sich hiermit ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Anzahl am Ende des Schocks, ebenso weitere 20 Minuten später. SMC-Gruppe: $7,86 \pm 0,7$, LIM-Gruppe: $6,07 \pm 0,67$. Nachdem das LIM 75 Minuten lang angeschlossen war, wies die SMC-Gruppe durchschnittlich $8,96 \pm 0,64 \times 1000/\text{mm}^3$, die LIM-Gruppe dagegen nur $6,66 \pm 0,96 \times 1000/\text{mm}^3$ Leukozyten auf. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der SMC- und der LIM-Gruppe. 135 Minuten nach Beginn der Behandlung mit dem LIM bzw. der Nachbeobachtung bei den

Ergebnisse

Kontrolltieren waren es in der SMC-Gruppe $9,43 \pm 0,8 \times 1000/\text{mm}^3$, in der LIM-Gruppe hingegen nur $8,08 \pm 1,03 \times 1000/\text{mm}^3$.

Kurz vor Beendigung der Operation und damit dem Ende der Behandlung mit dem LIM war weiterhin die Anzahl der Leukozyten in der LIM-Gruppe im Gegensatz zur SMC-Gruppe erniedrigt, so, wie es auch während des Anschlusses des LIM der Fall war. In der SMC-Gruppe waren es durchschnittlich $10,17 \pm 1,08 \times 1000/\text{mm}^3$ Leukozyten, in der LIM-Gruppe $8,75 \pm 1,13 \times 1000/\text{mm}^3$ Leukozyten. Die SMC-Gruppe zeigte hiermit einen signifikanten Unterschied im Vergleich mit der Anzahl bei Ende des Schocks.

Während des Nachbeobachtungszeitraums (nicht grafisch dargestellt) ohne LIM war die Anzahl der Leukozyten in der LIM-Gruppe geringfügig höher als in der SMC-Gruppe. Nach 48 Stunden war die Anzahl nahezu gleich, nach 72 Stunden zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen: Die Anzahl der Leukozyten war in der LIM-Gruppe wesentlich höher (nach 24 Std: SMC-Gruppe: $12,65 \pm 0,71 \times 1000/\text{mm}^3$; LIM-Gruppe: $12,9 \pm 0,98 \times 1000/\text{mm}^3$; nach 48 Std: SMC-Gruppe: $13,2 \pm 0,75 \times 1000/\text{mm}^3$, LIM-Gruppe: $13,16 \pm 0,9 \times 1000/\text{mm}^3$; nach 72 Std: SMC-Gruppe: $12,44 \pm 1,53 \times 1000/\text{mm}^3$, LIM-Gruppe: $14,53 \pm 1,31 \times 1000/\text{mm}^3$).

3.1.2 Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Differentialblutbild

Die zu den zuvor definierten Zeitpunkten (Kap. 2.2.7, Tab. 2) gemessene Anzahl Neutrophiler wird im Folgenden dargestellt und erläutert.

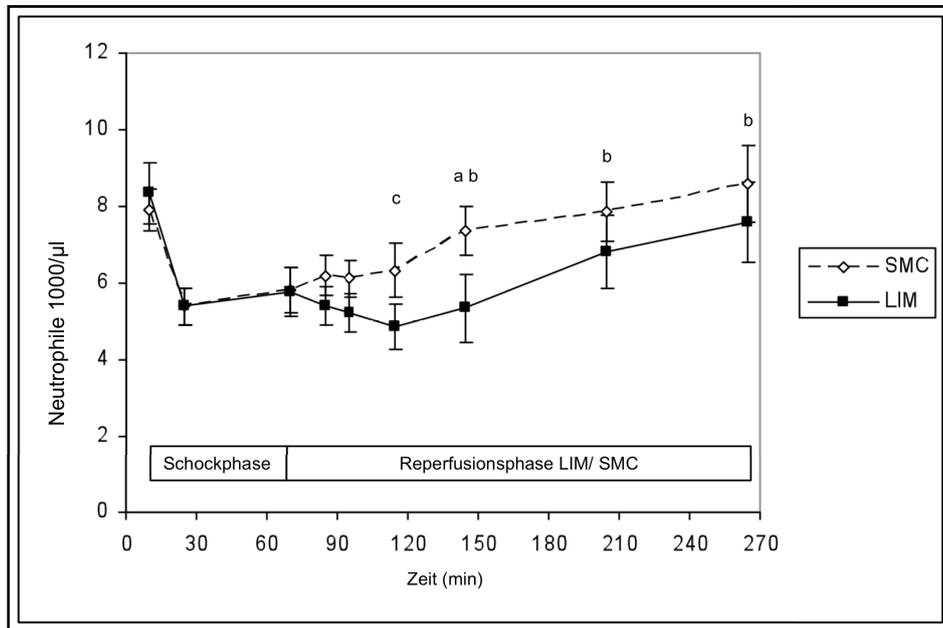


Abbildung 6: Anzahl der neutrophilen Granulozyten im Differentialblutbild modifiziert nach Loegters et al, Journal of Inflammation, 2010 [70].

Dargestellt sind die MW \pm SEM der absoluten Anzahl neutrophiler Granulozyten der Kontrollgruppe und der LIM-Gruppe im Vergleich

- Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen SMC- und LIM- Gruppe: a
- Statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied, verglichen mit den Werten bei Ende des Schocks (70 min) in der SMC-Gruppe: b
- Statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied, verglichen mit den Werten bei Ende des Schocks (70 min) in der LIM-Gruppe: c

Die Referenzwerte für die Anzahl Neutrophiler bei Schweinen liegen zwischen $1,2$ und $6,8 \times 1000/\text{mm}^3$. Der Mittelwert bei den unbehandelten Kontrolltieren lag bei $6,075 \times 1000/\text{mm}^3$.

Im Vergleich der Neutrophilen untereinander fiel auf, dass die LIM-Gruppe initial durchschnittlich etwas höhere Werte aufwies als die SMC-Gruppe (SMC-Gruppe: $7,91 \pm 0,56 \times 1000/\text{mm}^3$, LIM-Gruppe: $8,34 \pm 0,82 \times 1000/\text{mm}^3$). Nach der Entblutungsphase waren die Absolutwerte gesunken (SMC-Gruppe: $5,39 \pm 0,46 \times 1000/\text{mm}^3$, LIM-Gruppe: $5,39 \pm 0,48 \times 1000/\text{mm}^3$), die

Anzahl der Neutrophilen war in der LIM-Gruppe genauso hoch wie in der SMC-Gruppe. Zum Ende des Schocks war kein Unterschied mehr zu verzeichnen (SMC-Gruppe: $5,83 \pm 0,6 \times 1000/\text{mm}^3$, LIM-Gruppe: $5,78 \pm 0,66 \times 1000/\text{mm}^3$).

25 Minuten nach Anschluss des LIM sanken die Neutrophilen in der LIM-Gruppe, in der SMC-Gruppe hingegen stiegen sie an. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war zu diesem Zeitpunkt deutlich erkennbar (SMC-Gruppe: $6,20 \pm 0,5 \times 1000/\text{mm}^3$, LIM-Gruppe: $5,41 \pm 0,49 \times 1000/\text{mm}^3$).

Diese Tendenz blieb zunächst bestehen. Weitere 20 Minuten später waren in der SMC-Gruppe $6,32 \pm 0,7 \times 1000/\text{mm}^3$, in der LIM-Gruppe $4,85 \pm 0,6 \times 1000/\text{mm}^3$ Neutrophile im Blut nachweisbar, ein signifikanter Unterschied in der LIM-Gruppe verglichen mit der Anzahl zum Ende des Schocks.

Nach 75 Minuten mit dem LIM wies jedoch die SMC-Gruppe $7,37 \pm 0,62 \times 1000/\text{mm}^3$, die LIM-Gruppe nur noch $5,35 \pm 0,87 \times 1000/\text{mm}^3$ Neutrophile auf. Hiermit zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Gruppen untereinander, als auch ein signifikanter Unterschied in der SMC-Gruppe verglichen mit der Anzahl zum Ende des Schocks. 135 Minuten nach dem Beginn der LIM-Zirkulation stieg die Zahl der Neutrophilen, insbesondere in der LIM-Gruppe, wieder an. In der SMC-Gruppe waren es $7,86 \pm 0,77 \times 1000/\text{mm}^3$, in der LIM-Gruppe $6,83 \pm 0,96 \times 1000/\text{mm}^3$. In der SMC-Gruppe war der Unterschied signifikant im Vergleich mit der Anzahl bei Ende des Schocks, ebenso kurz vor Beendigung der Behandlung mit LIM.

Bei Beendigung des LIM nach 195 Minuten betrug die Anzahl der Neutrophilen in der SMC-Gruppe $8,59 \pm 1,02 \times 1000/\text{mm}^3$ und in der LIM-Gruppe $7,6 \pm 1,06 \times 1000/\text{mm}^3$. Die Anzahl der zirkulierenden Neutrophilen war während des Schocks in der SMC-Gruppe gestiegen, in der LIM-Gruppe hingegen gesunken.

An den Nachbeobachtungstagen (nicht grafisch abgebildet) war ein weiterer Anstieg der Neutrophilen zu verzeichnen und es war weiterhin ein Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar. Einen Tag nach der Operation betrug die Anzahl der Neutrophilen in der SMC-Gruppe $10,93 \pm 0,64 \times$

1000/mm³, in der LIM-Gruppe hingegen $11,48 \pm 0,9 \times 1000/\text{mm}^3$. Auch nach 48 Stunden war die Anzahl im Blut der LIM-Gruppe weiter im Vergleich zur SMC-Gruppe erhöht. $9,56 \pm 0,49 \times 1000/\text{mm}^3$ Neutrophile waren es durchschnittlich in der SMC-Gruppe, $10,14 \pm 0,77 \times 1000/\text{mm}^3$ in der LIM-Gruppe. Zwischen den Gruppen gab es nach 72 Stunden eine deutliche Diskrepanz. In der SMC-Gruppe waren es nach 72 Stunden $7,94 \pm 0,99 \times 1000/\text{mm}^3$, in der LIM-Gruppe $11,17 \pm 0,91 \times 1000/\text{mm}^3$ neutrophile Granulozyten.

3.1.3 Anzahl der Lymphozyten im Differentialblutbild

Die zu den zuvor definierten Zeitpunkten (Kap. 2.2.7, Tab.2) gemessene Anzahl der Lymphozyten wird im Folgenden dargestellt und erläutert.

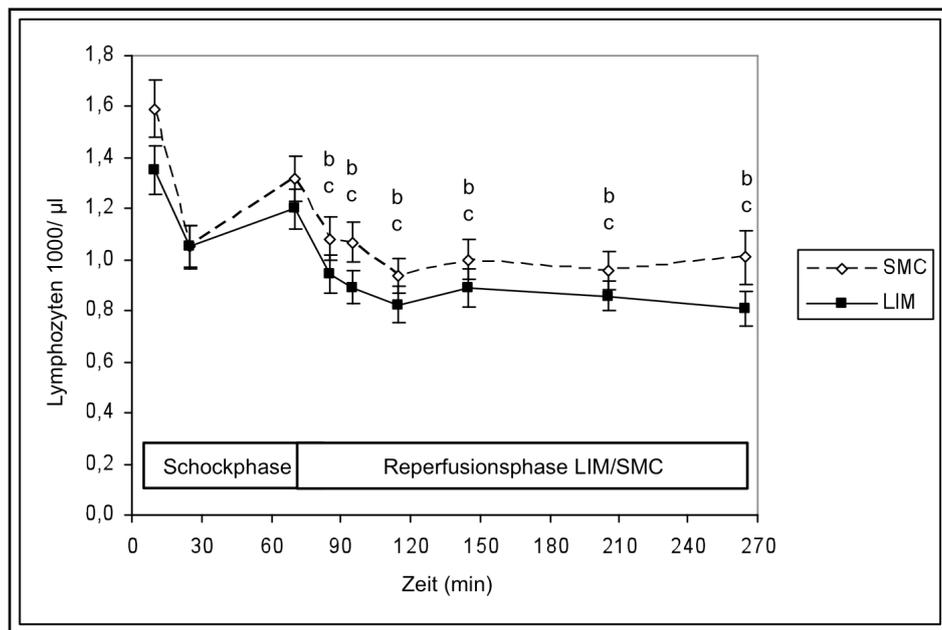


Abbildung 7: Anzahl der Lymphozyten bei SMC-Gruppe und LIM-Gruppe modifiziert nach Loegers et al, Journal of Inflammation, 2010 [70].

Dargestellt sind die $MW \pm SEM$ der absoluten Lymphozytenzahlen in $1000/\text{mm}^3$ aller Schweine einer Gruppe zu definierten Zeitpunkten

- Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen SMC- und LIM- Gruppe: a
- Statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied, verglichen mit den Werten bei Ende des Schocks (70 min) in der SMC-Gruppe: b
- Statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied, verglichen mit den Werten bei Ende des Schocks (70 min) in der LIM-Gruppe: c

Die Referenzwerte für Schweine liegen zwischen 1,2 bis 3,2 x 1000/mm³. Im Mittel betragen die Gesamtlumphozyten bei den unbehandelten Kontrolltieren 2,25 x 1000/mm³.

In Abbildung 7 ist die absolute Anzahl der Lymphozyten in der SMC-Gruppe und in der LIM-Gruppe dargestellt. Vor dem hämorrhagischen Schock war die Anzahl in der LIM-Gruppe etwas niedriger als in der SMC-Gruppe (SMC-Gruppe: 1,59 ± 0,11 x 1000/mm³; LIM-Gruppe: 1,35 ± 0,09 x 1000/mm³). Mit dem Ende der Entblutungsphase waren die Lymphozyten in beiden Gruppen vermindert, wobei die Anzahl in der LIM-Gruppe weiterhin geringer war als in der SMC-Gruppe. Die Anzahl in der SMC-Gruppe war im Gegensatz zur LIM-Gruppe stärker gesunken. (SMC-Gruppe: 1,05 ± 0,08 x 1000/mm³; LIM-Gruppe: 1,05 ± 0,08 x 1000/mm³). Allerdings war der Unterschied zu diesem Zeitpunkt geringer als zu Beginn des Schocks. Zum Ende des Schocks war die Anzahl der Lymphozyten in beiden Gruppen wieder gestiegen, die Anzahl in der LIM-Gruppe war weiterhin im Gegensatz zur SMC-Gruppe vermindert (SMC-Gruppe: 1,32 ± 0,09 x 1000/mm³; LIM-Gruppe: 1,2 ± 0,08 x 1000/mm³).

In der Phase, in der in der LIM-Gruppe das LIM angeschlossen war und die SMC-Gruppe ohne LIM reperfundiert wurde, war in beiden Gruppen ein Abfall der Lymphozyten zu verzeichnen. Während der gesamten Zeit vom Beginn der Reperfusionphase bis zum Ende des Versuches nach 270 Minuten zeigten die Lymphozytenzahlen, sowohl in der SMC- als auch in der LIM-Gruppe einen signifikanten Unterschied verglichen mit der Anzahl am Ende des Schocks. Nach 25 Minuten war die Anzahl in der SMC-Gruppe weiterhin gegenüber der LIM-Gruppe erhöht (SMC-Gruppe: 1,07 ± 0,08 x 1000/mm³; LIM-Gruppe: 0,89 ± 0,06 x 1000/mm³). Dieses Verhältnis änderte sich während der gesamten LIM-Phase kaum. Weitere 20 Minuten später betrug die Anzahl an Lymphozyten in der SMC-Gruppe: 0,94 ± 0,07 x 1000/mm³ in der LIM-Gruppe: 0,83 ± 0,07 x 1000/mm³. Nach 75 Minuten Beobachtung mit und ohne LIM, war die Anzahl der Lymphozyten in der SMC-Gruppe weiterhin höher als in der LIM-Gruppe, sie hatte sich jedoch zum jeweils vorigen Wert kaum verändert (SMC-Gruppe: 1 ± 0,08 x 1000/mm³; LIM-Gruppe: 0,89 ± 0,07 x 1000/mm³). In den letzten 2 Stunden unter LIM-Therapie

beziehungsweise unter Beobachtung, war das Verhältnis der beiden Gruppen zueinander weiter unverändert. Nach 135 Minuten betrug die Anzahl in der SMC-Gruppe $0,96 \pm 0,08 \times 1000/\text{mm}^3$; in der LIM-Gruppe $0,86 \pm 0,06 \times 1000/\text{mm}^3$. Damit war die Zahl in beiden Gruppen innerhalb von einer Stunde leicht gesunken.

Am Ende der Operation und damit des LIM betrug die Anzahl der Lymphozyten in der SMC-Gruppe $1,01 \pm 0,1 \times 1000/\text{mm}^3$ und in der LIM-Gruppe $0,81 \pm 0,07 \times 1000/\text{mm}^3$. Die Lymphozyten waren somit in der SMC-Gruppe in der vergangenen Stunde leicht angestiegen, in der LIM-Gruppe jedoch leicht gefallen. Das Verhältnis der Gruppen zueinander war weiterhin gleich, auch während der gesamten LIM-Phase war der Unterschied nahezu konstant geblieben.

Ein leichter Anstieg der Lymphozyten-Anzahl war 24 Stunden nach der Operation zu erkennen (grafisch nicht dargestellt), jedoch auch weiterhin ohne großen Unterschied zwischen den Gruppen (SMC-Gruppe: $1,18 \pm 0,11 \times 1000/\text{mm}^3$, LIM-Gruppe: $1,03 \pm 0,09 \times 1000/\text{mm}^3$). 48 Stunden nach Operationsende stieg die Anzahl bei beiden Gruppen stark an, der Unterschied zwischen den Gruppen war jedoch größer geworden, die Lymphozyten in der LIM-Gruppe waren im Vergleich zur SMC-Gruppe weniger stark gestiegen (SMC-Gruppe: $2,49 \pm 0,31 \times 1000/\text{mm}^3$, LIM-Gruppe: $2,13 \pm 0,18 \times 1000/\text{mm}^3$). Die Lymphozytenzahlen nach 72 Stunden betrugen in der SMC-Gruppe $2,47 \pm 0,36 \times 1000/\text{mm}^3$, in der LIM-Gruppe dagegen nur $2,42 \pm 0,34 \times 1000/\text{mm}^3$. Der Unterschied der beiden Gruppen untereinander war somit 48 Stunden nach Beendigung der Operation am größten.

3.1.4 Anzahl der Monozyten im Differentialblutbild

Die zu den zuvor definierten Zeitpunkten (Kap. 2.2.7, Tab.2) gemessene Anzahl der Monozyten wird im Folgenden dargestellt und erläutert.

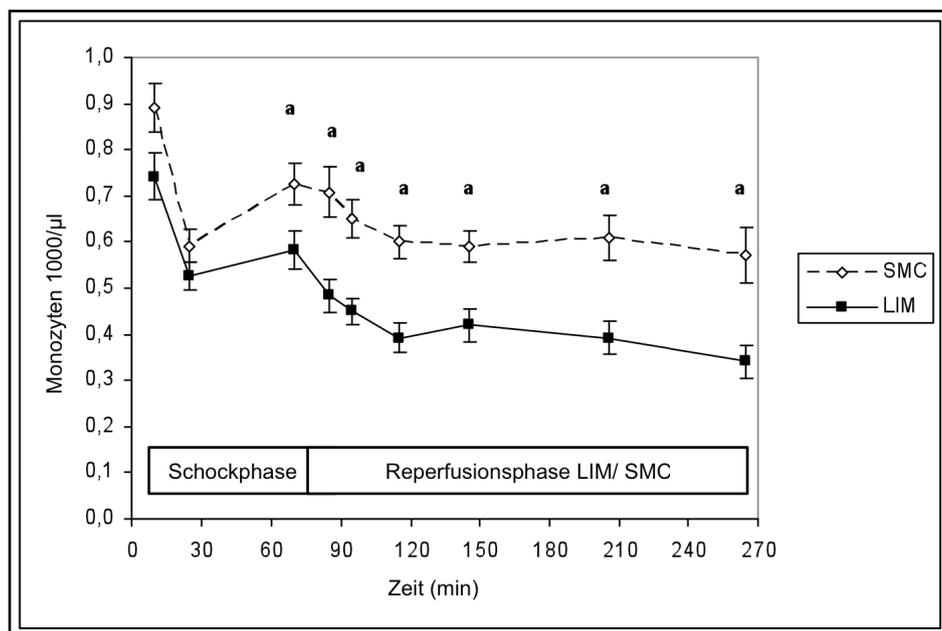


Abbildung 8: Anzahl der Monozyten in der SMC-Gruppe und in der LIM-Gruppe modifiziert nach Loegters et al, Journal of Inflammation, 2010 [70].

Dargestellt sind die MW \pm SEM der absoluten Monozytenzahlen zugeordnet zur SMC- und LIM-Gruppe.

- Statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen SMC- und LIM- Gruppe: a
- Statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied, verglichen mit den Werten bei Ende des Schocks (70 min) in der SMC-Gruppe: b
- Statistisch signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied, verglichen mit den Werten bei Ende des Schocks (70 min) in der LIM-Gruppe: c

Die Referenzwerte für die Anzahl an Monozyten bei Schweinen liegen zwischen $0,3$ und $0,8 \times 1000/\text{mm}^3$. Der Mittelwert der unbehandelten Kontrolltiere lag bei $1,025 \times 1000/\text{mm}^3$.

Die Anzahl der Monozyten verhielt sich ähnlich wie die Anzahl der anderen Leukozytenpopulationen. Zu Beginn des Versuchs und damit vor dem Schock wurden im Mittel bei den Tieren der SMC-Gruppe $0,89 \pm 0,05 \times 1000/\text{mm}^3$, bei den Tieren der LIM-Gruppe $0,74 \pm 0,05 \times 1000/\text{mm}^3$ Monozyten im Differentialblutbild gemessen. Nach der Entblutungsphase waren im Mittel

0,59 ± 0,04 x 1000/mm³ Monozyten im Blut der SMC-Gruppe zu finden, im Blut der LIM-Gruppe waren es zu diesem Zeitpunkt 0,53 ± 0,03 x 1000/mm³. In beiden Gruppen waren damit nach der Entblutung die Zahlen der Monozyten gesunken. Zum Ende des Schocks war die Anzahl der Monozyten in der SMC-Gruppe auf 0,73 ± 0,05 x 1000/mm³ gestiegen, in der LIM-Gruppe war nur ein minimaler Anstieg zu verzeichnen, auf 0,58 ± 0,04 x 1000/mm³.

Mit Einsatz des LIM in der LIM-Gruppe und Weiterbeobachtung der SMC-Gruppe zeigte sich in der SMC-Gruppe ein Abfall auf 0,71 ± 0,06 x 1000/mm³, in der LIM-Gruppe kam es zur weiteren Reduktion der Monozyten auf 0,48 ± 0,03 x 1000/mm³. Nach 25 Minuten wurden in der SMC-Gruppe 0,65 ± 0,04 x 1000/mm³ Monozyten gezählt, in der LIM-Gruppe waren es 0,45 ± 0,03 x 1000/mm³. Nach 75 Minuten LIM, beziehungsweise Nachbeobachtungszeit, wurden in der SMC-Gruppe im Mittel 0,6 ± 0,04 x 1000/mm³ Monozyten gezählt, in der LIM-Gruppe waren es 0,39 ± 0,03 x 1000/mm³. Das Verhältnis in den einzelnen Gruppen blieb über die folgende Zeit konstant. Nach 135 Minuten mit LIM/Nachbeobachtung betrug die Anzahl der Monozyten in der SMC-Gruppe 0,59 ± 0,03 x 1000/mm³, in der LIM-Gruppe wurden im Mittel 0,42 ± 0,04 x 1000/mm³ gezählt. Zum Ende des LIM betrug die Anzahl der Monozyten in der SMC-Gruppe 0,61 ± 0,05 x 1000/mm³, nach der Operation 0,57 ± 0,06 x 1000/mm³. In der LIM-Gruppe wurden zum Ende des LIM 0,39 ± 0,04 x 1000/mm³ Monozyten gemessen, nach der Operation waren es 0,34 ± 0,04 x 1000/mm³. Während der gesamten Zeit von Beginn der LIM-Therapie bis zum Ende der Operation zeigte sich eine signifikante Reduktion der Monozyten in der LIM-Gruppe im Vergleich zur SMC-Gruppe.

Nach einem Tag Nachbeobachtungszeit waren die Zahlen im Vergleich zum Vortag relativ konstant. In der SMC-Gruppe wurden 0,54 ± 0,03 x 1000/mm³ Monozyten gezählt, in der LIM-Gruppe betrug die Anzahl 0,39 ± 0,04 x 1000/mm³. Ein Anstieg der Monozyten wurde nach 48 Stunden beobachtet. In der SMC-Gruppe wurden 1,15 ± 0,09 x 1000/mm³ Monozyten im Blut gezählt, in der LIM-Gruppe befanden sich 0,88 ± 0,07 x 1000/mm³ im Blut. Bei den Tieren, die 72 Stunden nachbeobachtet wurden, befanden sich am dritten Tag

in der SMC-Gruppe $1,03 \pm 0,13 \times 1000/\text{mm}^3$ Monozyten, in der LIM-Gruppe waren es $0,95 \pm 0,16 \times 1000/\text{mm}^3$.

3.2 Gewebeeinfiltration durch neutrophile Granulozyten

3.2.1 Chloracetatesterasegefärbte Gewebeschnitte 48 Stunden nach dem Schock

Im Vergleich der unterschiedlichen Gewebe untereinander fällt auf, dass die Anzahl an Neutrophilen, die das Gewebe infiltriert haben, sich sowohl von Organ zu Organ, als auch innerhalb der Gruppen unterscheiden.

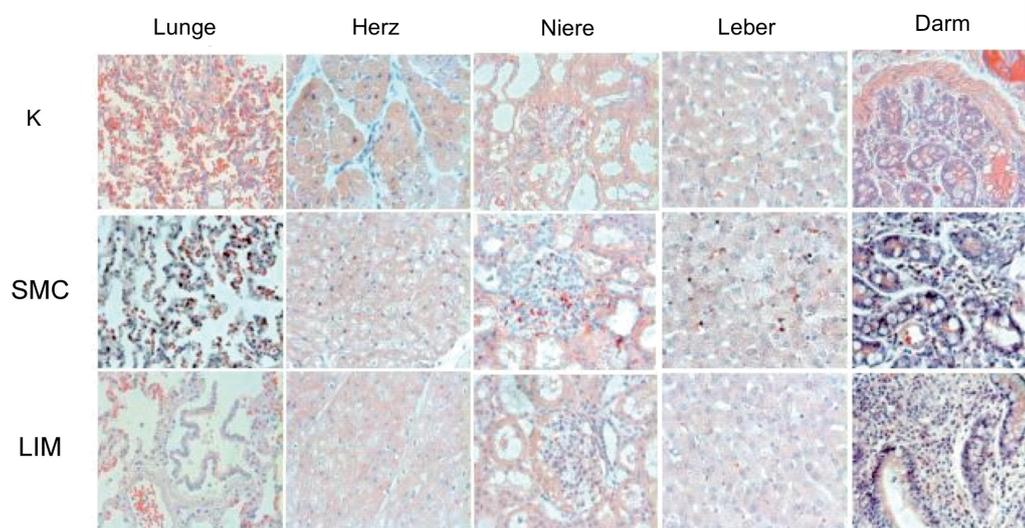


Abbildung 9: Chloracetatesterasefärbung der Gewebeschnitte, modifiziert nach Loegters et al, Journal of Inflammation, 2010 [70].

K: Kontrollgruppe

Dargestellt sind repräsentative Schnitte von Lunge, Herz, Niere, Leber und Darm, die mit Chloracetatesterase gefärbt wurden, zugeordnet zur Kontroll-, LIM- und SMC-Gruppe. Die Schnitte wurden bei der SMC- und LIM-Gruppe 48 Stunden nach Schock entnommen. Die Organe der Kontrolltiere wurden direkt entnommen.

In allen dargestellten Organen ist die schock-induzierte Einwanderung neutrophiler Granulozyten zu sehen. In der LIM-Gruppe ist die Infiltration weniger ausgeprägt als in der SMC-Gruppe und nahezu identisch mit der Kontrollgruppe. Besonders auffallend ist dieser Unterschied in der Lunge.

In der Auszählung repräsentativer Bereiche in den Geweben zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Neutrophilen im Gewebe der SMC-Gruppe im

Vergleich zur Kontrollgruppe. So befanden sich im Lungengewebe der SMC-Gruppe zwischen 101 und 500 Neutrophile, im Lungengewebe der Kontrollgruppe waren es im Durchschnitt nur 6-10 Neutrophile.

Die LIM-Gruppe entwickelte nur eine schwache schock-induzierte Neutrophileninfiltration im Lungengewebe. Es wurden zwischen 11 und 20 Neutrophile bei n=9 Tieren gezählt, bei n=3 Tieren war die Verteilungsbreite mit 21-50 Zellen pro Tier im Mittel höher.

Nach 72 Stunden zeigte sich kein Unterschied zur Gewebeeinfiltration nach 48 Stunden, daher repräsentiert die Abbildung auch die Schnitte, die nach 72 Stunden angefertigt wurden.

3.2.2 Elektronenmikroskopische Darstellung der Gewebeeinfiltration durch Leukozyten

Die Asservierung der Gewebeprobe, sowie die Fixierung des Materials wurden in Düsseldorf durchgeführt. Die Anfertigung der Schnitte, sowie die Fotografien erfolgten durch Professor Cinatl vom Institut für medizinische Virologie in Frankfurt am Main.

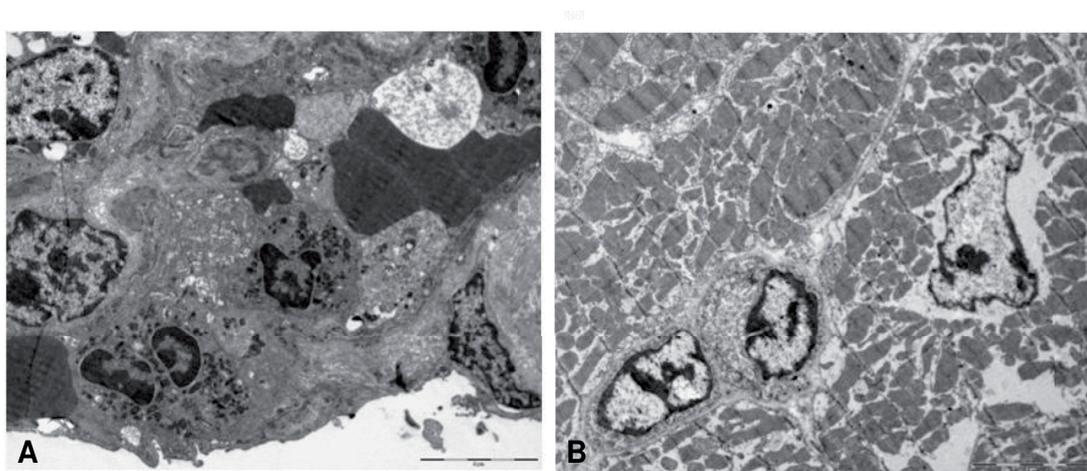


Abbildung 10: Elektronenmikroskopische Darstellung des Lungen- und Herzmuskelgewebes

Dargestellt sind elektronenmikroskopische Bilder von Lungengewebe (A) und Herzmuskelgewebe (B)

Die elektronenmikroskopische Betrachtung der Lunge zeigte eine aktive Infiltration des Lungengewebes durch Leukozyten. Im Herzmuskelgewebe

konnte eine Zerstörung der Zellintegrität durch Leukozyten festgestellt werden.

3.3 Bestimmung von IL-1-beta, IL-6, IL-8, IL-10, TNF-alpha und Interferon-gamma mittels ELISA

3.3.1 IL-1-beta

	Prä Schock	30 Min LIM	Ende LIM	24 Std.	48 Std.	72 Std.
LIM	0	0	0	n.b.	182	n.b.
LIM	0	0	218	0	n.b.	0
LIM	254	180	400	0	200	0
LIM	0	330	1270	0	352	n.b.
LIM	0	0	0	27,1112	n.b.	n.b.
SMC	0	0	0	0	58,5257	0

Tabelle 5 IL-1-beta-Konzentration in beiden Gruppen.

n.b.: nicht bestimmt

Dargestellt ist die Konzentration von IL-1-beta in pg/ml Serum in beiden Gruppen bestimmt mittels ELISA. Es sind nur die Tiere aufgezeigt, bei denen IL-1-beta im Serum nachgewiesen werden konnte.

In der LIM-Gruppe konnte bei 5 von insgesamt 12 Tieren IL-1-beta im Serum nachgewiesen werden. Bei drei von den 5 Tieren konnte jeweils nur zu einem Zeitpunkt IL-1-beta nachgewiesen werden. Bei einem Tier konnte nach 48 Stunden eine IL-1-beta-Konzentration von 182 pg/ml bestimmt werden. Ein anderes Tier zeigte bei Ende des LIM eine Erhöhung auf 218 pg/ml. Bei einem weiteren wurde nach 24 Stunden eine Konzentration von 27,1 pg/ml bestimmt. Bei 2 der 5 Tiere der LIM-Gruppe, bei denen eine erhöhte IL-1-beta-Konzentration nachgewiesen werden konnte, wurde zu mehreren Zeitpunkten IL-1-beta im Serum nachgewiesen. Bei einem Tier zeigte sich bereits nach dem Schock eine Konzentration von 254 pg/ml, nach 30 Minuten mit LIM war die Konzentration nur noch bei 180 pg/ml. Am Ende des LIM-Einsatzes war die Konzentration auf 400 pg/ml gestiegen. Nach 48 Stunden Nachbeobachtungszeit betrug die Konzentration 200 pg/ml. Bei einem weiteren der 5 Tiere der LIM-Gruppe wurde zu mehreren Zeitpunkten eine IL1-beta Erhöhung gemessen. 30 Minuten nach Einsatz des LIM wurde eine

Konzentration von 330 pg/ml gemessen. Zum Ende des LIM betrug die Konzentration 1270 pg/ml, nach 48 Stunden dann 352 pg/ml.

In der SMC-Gruppe zeigte sich nur bei einem Tier nach 48 Stunden eine erhöhte IL-1-beta-Konzentration auf 58,5 pg/ml.

3.3.2 IL-6

	Prä Schock	30 Min LIM	Ende LIM	24 Std.	48 Std.	72 Std.
LIM	0	0	0	80,1374	0	n.b.
LIM	n.b.	486,86	223	26,3277	0	0
LIM	0	0	0	n.b.	0	135,06
LIM	0	176,819	>5000	3,03134	180	n.b.
LIM	328	1480	88	12,7383	0	0
LIM	0	0	172	0	0	n.b.
LIM	0	0	88,7472	0	0	0
LIM	0	0	0	616,191	0	0
SMC	326	0	0	60,5131	0	0
SMC	0	0	0	12,99626	0	0
SMC	50,3	0	0	0	0	50,4
SMC	0	0	0	6,48919	0	0
SMC	0	0	0	250,443	0	0
SMC	0	0	0	0	0	1324,34
SMC	15,3362	5,56744	1,88273	56,1273	17,7372	n.b.

Tabelle 6 IL-6-Konzentration im Serum

Aufgezeigt sind die Konzentrationen von IL-6 in pg/ml im Serum der Schweine zu den bestimmten Zeitpunkten zugeordnet zu LIM- und SMC-Gruppe

Bei der Bestimmung des IL-6 im Serum der Versuchstiere war auffällig, dass nur wenige Tiere vor Beginn des Schocks IL-6 im Serum aufwiesen. In der LIM-Gruppe war bei einem Tier vor Schockbeginn eine IL-6-Erhöpfung messbar. Bei diesem Schwein kam es zu einem Anstieg nach 30 Minuten LIM und danach wieder zu einem Abfall. Bei 2 weiteren Tieren kam es nach 30 Minuten LIM zu einem Anstieg des Interleukins. Mit Beendigung des LIM zeigte sich im Serum von 5 Versuchstieren IL-6. Bei einem Schwein lag die Konzentration bei über 5000 pg/ml. Nach 24 und 48 Stunden war nur noch bei einem Tier IL-6 im Serum nachzuweisen.

In der SMC-Gruppe war vor dem Schock bei drei Tieren IL-6 im Serum nachweisbar. Nach 24 Stunden war das nur noch bei 6 von 8 Tieren der Fall. Im Gegensatz zur LIM-Gruppe zeigte sich das Zytokin erst zu diesem Zeitpunkt. Auch nach 24 und 48 Stunden war bei einzelnen Tieren IL-6 nachweisbar.

3.3.3 Interferon-gamma Bestimmung im Serum mittels ELISA

Die Konzentrationen von INF-gamma lagen in allen Serumproben unterhalb der Nachweisgrenze.

3.3.4 IL-8

	Prä Schock	30 Min LIM	Ende LIM	24 Std.	48 Std.	72 Std.
LIM	85,6	65,2	56,8	n.b.	0	n.b.
LIM	0	236	310	n.b.	330	n.b.
LIM	338	0	0	n.b.	0	n.b.
LIM	0	374	1684	n.b.	167	n.b.
SMC	49	0	0	0	0	n.b.
SMC	49	0	0	0	0	n.b.
SMC	35,2951	13,5757	38,0139	0	0	65,3197
SMC	0	39,174	0	0	0	n.b.

Tabelle 7 IL-8-Konzentration im Serum

Aufgezeigt sind die Konzentrationen von IL-8 in pg/ml im Serum der Schweine zu den bestimmten Zeitpunkten zugeordnet zu LIM- und SMC-Gruppe

Sowohl in der LIM-Gruppe, als auch in der SMC-Gruppe war nur bei wenigen Tieren IL-8 nachweisbar. In der LIM-Gruppe kam es bei 4 von 10 Tieren zu einer Ausschüttung von IL-8. Vor dem Schock war das Zytokin bereits bei 2 Schweinen erhöht, während des Schocks wiesen 3 Tiere eine Interleukin-Ausschüttung auf. Nach 48 Stunden waren noch bei 2 der Versuchstiere erhöhte Interleukin-Konzentrationen zu beobachten.

Die SMC-Gruppe wies bei 4 von 9 Tieren eine erhöhte IL-8-Konzentration auf. Nur bei einem Tier blieb ein erhöhter IL-8-Spiegel bestehen, zum 24- und 48 Stunden-Zeitpunkt war IL-8 nicht nachweisbar, nach 72 Stunden war die Konzentration am höchsten.

Bei allen anderen Tieren war nach Beendigung des LIM kein IL-8 im Serum nachweisbar.

3.3.5 IL-10

	Prä Schock	30 Min LIM	Ende LIM	24 Std.	48 Std.	72 Std.
LIM	37	198	45	n.b.	121	n.b.
LIM	75	94	76	n.b.	66	n.b.
LIM	82	94	84	n.b.	76	n.b.
LIM	64	70	45	n.b.	61	n.b.
LIM	76	86	n.A.	n.b.	n.b.	114
LIM	102	120	88	n.b.	86	n.b.
LIM	114	108	n.A	n.b.	84	n.b.
LIM	22,8447	7,69818	74,4	0	0	16,086
LIM	17,2764	368,517	0	0	47,337	67,257
LIM	0	8,47195	101,107	44,7913	0	n.b.
LIM	0	29,5381	0	0	0	n.b.
SMC	69	98	0	0	0	n.b.
SMC	167	101	99	n.b.	153	n.b.
SMC	59	0	0	0	0	n.b.
SMC	233	96	52	n.b.	0	n.b.
SMC	0	22,1119	0	0	0	0

Tabelle 8 Konzentration von IL-10 im Serum

Aufgezeigt sind die Konzentrationen von IL-10 in pg/ml im Serum der Schweine zu den bestimmten Zeitpunkten zugeordnet zu LIM- und SMC-Gruppe

Die Konzentration von IL-10 im Serum war sowohl in der LIM-Gruppe als auch in der SMC-Gruppe sehr unterschiedlich. In der LIM-Gruppe wurden die durchschnittlich höchsten Werte 30 Minuten nach Einschalten des LIM erreicht. Auch zum Ende des LIM-Einsatzes waren erhöhte IL-10-Konzentrationen im Serum der LIM-Gruppe nachweisbar ebenso wie nach 48 Stunden Nachbeobachtung. Nach 72 Stunden war bei einigen Schweinen eine erhöhte Konzentration nachzuweisen.

In der SMC-Gruppe waren die Konzentrationen, die zu Beginn des Versuches gemessen wurden, etwas höher. In dieser Gruppe wiesen jedoch weniger Schweine eine Erhöhung der Zytokine auf. Nur etwa 50 % der Versuchstiere

zeigten IL-10 im Serum. Zum Ende des LIM und in der Nachbeobachtungszeit zeigte sich nur noch nach 48 Stunden bei einem Versuchstier eine Interleukin Erhöhung.

3.3.6 TNF-alpha

	Prä Schock	30 Min LIM	Ende LIM	24 Std.	48 Std.
LIM	28	146	34	n.b.	0
LIM	122	1410	480	n.b.	0
LIM	0	144	2412	n.b.	112
LIM	>3000	1916	134	n.b.	0
LIM	0	173	377	n.b.	168
SMC	35	72	0	n.b.	0
SMC	123	75	68	n.b.	118
SMC	42	0	0	n.b.	0
SMC	172	72	39	n.b.	0

Tabelle 9 TNF-alpha-Konzentration im Serum

Aufgezeigt sind die Konzentrationen von TNF-alpha in pg/ml im Serum der Schweine zu den bestimmten Zeitpunkten zugeordnet zu LIM- und SMC-Gruppe

In der LIM-Gruppe konnte TNF-alpha bei 3 Tieren stark erhöht nachgewiesen werden. Bei 2 Tieren war es nur schwach vorhanden. Bei den restlichen Schweinen dieser Gruppe konnte TNF-alpha nicht nachgewiesen werden.

In der SMC-Gruppe konnte TNF-alpha bei 4 Tieren nur schwach nachgewiesen werden. Bei den anderen Tieren der Gruppe war TNF-alpha nicht vorhanden. Nach 72 Stunden Nachbeobachtungszeit war TNF-alpha in beiden Gruppen nicht mehr zu finden.

3.4 Chemotaxis

Ex-vivo-Testung der funktionellen Aktivität der aus Natrium-Heparinblut isolierten Neutrophilen

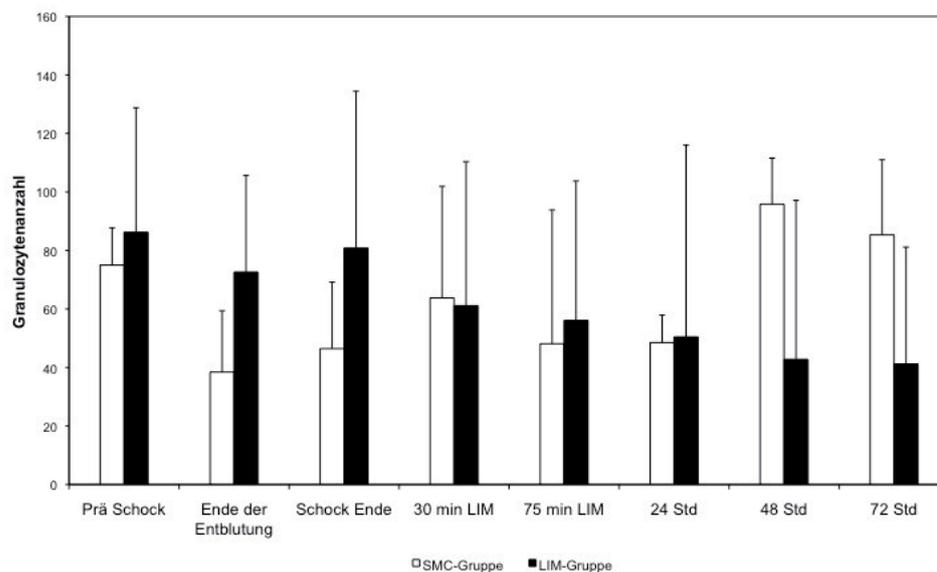


Abbildung 11: Chemotaxis

Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Anzahl neutrophiler Granulozyten, die chemotaktisch gewandert sind, zugeordnet zu LIM- und SMC-Gruppe

Obwohl die Tiere alle gleich behandelt waren zeigte sich bereits zu Beginn des Versuches ein Unterschied zwischen LIM- und SMC-Gruppe. In der LIM-Gruppe wurden im Mittel 86 Granulozyten gezählt, die chemotaktisch aktiv waren, in der SMC-Gruppe waren es 75. Am Ende der Entblutung befanden sich in der LIM-Gruppe im Mittel 72 neutrophile Granulozyten, in der SMC-Gruppe hingegen nur 38. Zum Ende des Schocks betrug die Anzahl in der LIM-Gruppe 81, in der SMC-Gruppe hingegen nur noch 46. Eine Angleichung der Gruppen untereinander war nach 30 Minuten mit Einsatz des LIM in der LIM-Gruppe und unter Beobachtung in der SMC-Gruppe zu sehen. In der LIM-Gruppe war die Anzahl Neutrophiler im Mittel auf 61 gesunken, in der SMC-Gruppe auf 64. Generell zeigt sich anhand der hohen Standardabweichung innerhalb der Gruppen eine große Schwankungsbreite. In der SMC-Gruppe sank die Anzahl der Granulozyten nach 75 Minuten auf 48, in der LIM-Gruppe nur gering auf 56. Nach 24 Stunden waren in der LIM-Gruppe noch 50 Neutrophile, in der SMC-Gruppe ergab sich nach 24 Stunden kein Unterschied. In der weiteren Nachbeobachtungszeit ergab sich ein

deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen. In der LIM-Gruppe sank die Anzahl neutrophiler Granulozyten nach 48 Stunden auf 43, nach 72 Stunden auf 41. In der SMC-Gruppe hingegen stieg die absolute Anzahl im Mittel an. Nach 48 Stunden wurden im Mittel 96 Granulozyten gezählt, nach 72 Stunden 85.

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Anhand der Kinetik der Neutrophilen im Blut konnte eine schockinduzierte Inflammation gezeigt werden.

Die extrakorporale Zirkulation mit LIM verminderte gegenüber der SMC-Gruppe einen posthämorrhagischen Anstieg der Leukozytenzahlen.

Der hämorrhagische Schock war assoziiert mit einer deutlichen Infiltration neutrophiler Granulozyten in verschiedenen Geweben im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren. Zum Teil wurden deutliche Hinweise auf eine verringerte Neutrophilen-Infiltration insbesondere in relevanten Bereichen der Lunge in der LIM-Gruppe gefunden.

Das LIM war in der Lage die chemotaktische Aktivität der Neutrophilen Ex-vivo nach 48 Stunden zu vermindern.

4 Diskussion

Als eine der Folgen schwerer Unfälle mit hämorrhagischem Schock gilt die Entwicklung von SIRS, MODS und MOV und letztendlich auch die Begünstigung einer Sepsis [11]. Auch wenn der pathophysiologische Mechanismus im Detail weiter ungeklärt bleibt, ist inzwischen bekannt, dass die Aktivierung von Leukozyten, vorwiegend PMN, eine bedeutende Rolle in der durch einen Schock vermittelten Entwicklung eines SIRS spielt. Aktivierte PMN akkumulieren im Gewebe und schütten gewebeschädigende Mediatoren aus, die ursächlich sind in der Entstehung eines SIRS [14, 16, 35, 54, 66, 100, 110, 118-119].

Ein weiterer Faktor der zur Aktivierung Neutrophiler beiträgt ist die Entwicklung einer Apoptoseresistenz der neutrophilen Granulozyten im Schock. Normalerweise gehen Neutrophile spontan in Apoptose. Die Lebenszeit beträgt circa 8-20 Stunden im Blutfluss und 1-4 Tage im Gewebe. Studien zeigten, dass nach schwerem Trauma die Lebensspanne der Neutrophilen zunimmt und bis zu 3 Wochen betragen kann [74, 108]. Die Neutrophilen nach Schock sind somit resistent gegenüber apoptotischen Signalen und dies könnte zur Entwicklung eines SIRS mit konsekutiven Organschäden und MODS beitragen [33, 115, 116].

4.1 Extrakorporale Immuntherapie mittels LIM zur Prävention von posttraumatischem SIRS

Der therapeutische Angriffspunkt zur Prävention eines SIRS, der dieser Arbeit zugrunde liegt, ist die Überwindung der Apoptoseresistenz mittels LIM und damit die Verminderung des Risikos, ein SIRS zu entwickeln.

In dem zugrunde liegenden hämorrhagischen Schockmodell konnten sowohl eine Beeinträchtigung der Hämodynamik, eine verminderte Gewebeeinfiltration durch Neutrophile sowie verminderte Lipid-Peroxidation in Darm, Lunge und Leber während einer Beobachtungszeit von 72 Stunden nachgewiesen werden [70].

Um die Funktionalität des LIM zu überprüfen wurden alle eingesetzten LIM-Schäume vor ihrem Einsatz auf ihre Funktionalität überprüft, indem aktivierte

humane Neutrophile mit agonistischem Anti-Fas-IgM-Antikörper inkubiert wurden. Die spätere quantifizierende Analyse des Apoptosenachweises fand mittels FACScan statt [87].

Es konnte in vorigen Studien auch gezeigt werden, dass die Bindung Neutrophiler an membrangebundenen FasL innerhalb von Minuten zu deren Inaktivierung führt, ohne dass bereits Zeichen für Apoptose nachzuweisen sind [22].

Nicht nur im Schock sondern auch bei Einsatz der Herz-Lungen-Maschine kommt es als Folge häufig zum SIRS [61]. In einer Studie zum Einsatz des LIM in den Kreislauf einer Herz-Lungen-Maschine konnte perioperativ ein Ansteigen der Neutrophilen verhindert werden [98].

Ein weiterer Ansatzpunkt, die Zahl der zirkulierenden Neutrophilen zu minimieren, ist der Einsatz eines Leukozytenfilters bei kardiopulmonalem Bypass. In früheren Studien konnten allerdings keine signifikanten klinischen Vorteile beobachtet werden. Teilweise wurden sogar erhöhte Werte von gewebeschädigenden Enzymen, wie PMNE und MPO festgestellt [101]. Dieses Phänomen kann dadurch erklärt werden, dass die passiv im Filter zurückgehaltenen Neutrophilen weiterhin aktiv bleiben und somit über die Ausschüttung schädigender Zytokine und Proteasen eine systemische Inflammation fördern können. Ein wesentliches Ziel ist es daher, Neutrophile innerhalb der Zirkulation rasch zu inaktivieren.

4.2 Fas-induzierte Überwindung der Apoptoseresistenz durch das LIM

Das Fas-/FasL-System spielt eine wichtige Rolle in der Auslöschung und Erneuerung von Zellen und somit in der Aufrechterhaltung der Hämostase [99]. Bisher wurde in verschiedenen Ansätzen die therapeutische Wirksamkeit der Modulation des Fas/Fas-L Systems in der Therapie gegen virale Erkrankungen [29] und maligne Neubildungen getestet [34, 72].

Eine Möglichkeit zur therapeutisch gesteuerten Modulation des Immunsystems ist die Apoptoseinduktion bei zirkulierenden PMN. Der

Fas/Fas-L-Mechanismus spielt eine wichtige physiologische Rolle in der Regulation von Lymphozyten [107, 114] und von PMN [97]. In der Blutzirkulation ist z.B. die Lebensspanne der neutrophilen Granulozyten durch Apoptose auf 4-10 Stunden begrenzt. Nach der Migration in das Gewebe beträgt die Lebenszeit einige Tage. Ist der Apoptosemechanismus gestört, kommt es zu einer verlängerten Lebensdauer der hyperaktivierten PMN und damit zu Gewebeschäden und anhaltender Sekretion toxischer Metabolite [4]. Dies ist einer der vermuteten Mechanismen bei der Entstehung des Ischämie-Reperfusionssyndroms, bei ARDS, MOV, SIRS und bei Autoimmunerkrankungen [99].

Der Funktionsmechanismus des LIM ist die schnelle Inaktivierung neutrophiler Granulozyten und vermutlich Monozyten innerhalb der Zirkulation. Die Hemmung der schädigenden Aktivierung neutrophiler Granulozyten ist somit der therapeutische Angriffspunkt des LIM. Neben dem für lange Zeit gültigen Paradigma der Fas-assoziierten Apoptose konnte vor einigen Jahren gezeigt werden, dass nach Stimulation des Fas durch FasL zahlreiche andere intrazelluläre Signalwege aktiviert werden, die unabhängig von den extrinsischen Apoptosewegen sind [88]. Ein wichtiger Aspekt der Apoptose-unabhängigen Zellveränderung ist die Fas vermittelte Inaktivierung neutrophiler Granulozyten nach Kontakt mit immobilisierten agonistischen anti-Fas Antikörper (Cinatl et al, 2000 [22]). So konnte gezeigt werden, dass die Bindung Neutrophiler an einen membrangebundenen Fas die Neutrophilen innerhalb von Minuten inaktiviert, noch bevor erste Anzeichen für Apoptose erkennbar sind [22]. Bereits Greenstein et al [47] konnten zeigen, dass Fas-induzierte Apoptose in einem höheren Prozentsatz zur reduzierten Endothelzelladhärenz führt als Expression von PS oder Verlust von CD 16 zum selben Zeitpunkt.

Die Entwicklung des LIM beruht auf der Idee, biologische agonistische Moleküle auf künstlichen Oberflächen im Rahmen einer extrakorporalen Immuntherapie zu binden und somit natürliche Immunregulationsprozesse zu simulieren und zu unterstützen. Im Rahmen der extrakorporalen Zirkulation fließt das Blut über Kunststoffschläuche in das LIM-Gehäuse, das mit einem

Antikörper beschichtete offenporige Polyurethanschäume beinhaltet. Die Fas-induzierte Apoptose wird bei Kontakt der Neutrophilen mit dem Antikörper eingeleitet. Diese Neutrophilen lösen sich innerhalb von Minuten aus dem Modul, werden vom eigenen Immunsystem als präapoptotische Zellen erkannt und aus der Zirkulation entfernt. Die feste Bindung des agonistischen anti-Fas Antikörpers an eine biokompatible Oberfläche ist unabdingbar, weil die systemische Applikation von löslichem anti-Fas zu schweren Nebenwirkungen, wie Leberschädigung und Lungenfibrose führt [19, 53].

4.3 Apoptoseresistenz durch verminderte Aktivierung des intrinsischen Apoptoseweges

Die Veränderungen der Apoptose bei Inflammation und schweren Verletzungen könnte möglicherweise mit der unterschiedlichen Expression apoptotischer Proteine korrelieren [32, 82, 103]. In einer 2009 veröffentlichten Studie [87] wurde die Expression einiger Gene, die in Apoptose der Neutrophilen eine Rolle spielen, bei schwer verletzten Patienten untersucht. Die Expression des antiapoptotischen Proteins Mcl-1 war interessanterweise in PMN von schwerst verletzten Patienten deutlich verstärkt. Die Mcl-1-Gen-Expression kann durch mehrere Faktoren induziert werden und in der Folge die Apoptose Neutrophiler verzögern, beispielsweise durch Zytokine und mehrere Signalkaskaden, die hier nicht weiter erläutert werden [86-88, 97, 98]. Zelluläre Konzentrationen von Mcl-1 in humanen Neutrophilen korrelieren eng mit der Überlebensrate [81].

In der oben genannten Studie [87] wurde aufgezeigt, dass erhöhte Serumkonzentrationen von GM-CSF, die 1-2 Tage nach dem Trauma gemessen wurden, eng mit der intrazellulären Konzentration von Mcl-1 und der Apoptoserate Neutrophiler korrelierte. Die Serum-Konzentration von sowohl Mcl-1 als auch GM-CSF nahm mit der Zeit ab. Da sich jedoch die Apoptose der Neutrophilen bis zu 11 Tage nach dem Trauma vermindert zeigte, ist der Einfluss anderer Faktoren als Verursacher der Apoptoseresistenz zu einem späteren Zeitpunkt nach schwerem Trauma wahrscheinlich [87]. Beispielsweise TNF- α , IL-1- β , IL-6, IL-8, IFN- γ und G-CSF wurde bereits eine lebensverlängernde Wirkung auf Neutrophile

zugeschrieben [77]. Diese Zytokine wurden in der vorliegenden Arbeit bestimmt, jedoch konnten viele davon nicht nachgewiesen werden. Die Bestimmung von Mcl-1 in Neutrophilen von Schweinen wäre ein weiterer Ansatzpunkt um die Aktivierung und Überwindung der Apoptoseresistenz der Neutrophilen im Tiermodell zu überprüfen.

Die therapeutische Gabe von GM-CSF nach einem Trauma sollte in Bezug auf die durch GM-CSF induzierte Apoptose-Resistenz kritisch geprüft werden. Kortikosteroide, welche posttraumatisch bei SIRS und relativer Nebenniereninsuffizienz verabreicht werden, führen ebenfalls zu verspäteter Apoptose in Neutrophilen, welches auch auf erhöhte Expression von Mcl-1 zurückzuführen ist [104]. Des Weiteren enthalten Neutrophile hohe Konzentrationen einer funktionell inaktiven beta-Isoform des Glukokortikoidrezeptors, welche durch Ausschüttung von IL-8 hochreguliert wird und somit die Neutrophilen auch weniger sensitiv gegenüber Kortikosteroiden werden lässt [105]. Auch hier sollte die posttraumatische Gabe von Glukokortikoiden neu diskutiert werden.

4.4 Verminderung der zirkulierenden Granulozyten durch das LIM

Im Rahmen des hier vorgestellten Therapieansatzes konnte die Effektivität des LIM im posthämorrhagischen Tiermodell gezeigt werden. Unter Anschluss des LIM zeigten sich die Neutrophilenzahlen und Monozytenzahlen im peripheren Blut regredient. Des Weiteren konnten durch unsere Arbeitsgruppe Hinweise erarbeitet werden, dass das LIM einen positiven Einfluss auf die pulmonale, renale und kardiale Funktion hat (Sadek, 2010). Die LIM-Gruppe wies höhere Sauerstoffsättigungswerte sowie ein besseres Herzzeitvolumen auf. Die Kreatinkinase-Werte waren niedriger in der LIM-Gruppe, allerdings nur nach 72 Stunden.

Aus EDTA-Blut wurden mittels eines automatisierten Zählgerätes die einzelnen Zellpopulationen bestimmt. In 3.1.2 Abb.6 ist die Anzahl neutrophiler Granulozyten im Vergleich der Gruppen untereinander dargestellt. Zu Beginn des Versuches zeigten sich nahezu identische

Anzahlen in den Gruppen, hiermit besteht also eine Vergleichbarkeit der Gruppen. In der Schockphase zeigte sich in beiden Gruppen zunächst ein Abfall der neutrophilen Granulozyten ohne signifikante Unterschiede. Dieser ist zum einen erklärbar durch den Verlust an Volumen und damit auch Verlust an Leukozyten zum anderen durch die erst nach einer gewissen Latenzzeit auftretende Aktivierung der Neutrophilen. Des Weiteren wanderten die neutrophilen Granulozyten nach Aktivierung unter anderem in das Gewebe ein [3, 75], somit könnte auch dies ein Grund für die initiale Verminderung der Granulozyten sein.

Nach Beginn der Reperfusionphase kam es in der LIM-Gruppe zunächst zu einem Abfall der Neutrophilen, während es in der SMC-Gruppe zu einem Anstieg kam. Dies zeigt die Effektivität des LIM, die Anzahl der zirkulierenden Neutrophilen zu vermindern. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch die Ergebnisse, die mit dem LIM beim Kardiopulmonalen Bypass erzielt wurden [98]. Insbesondere in der Anfangsphase zeigte sich eine gute Funktion des LIM in Hinblick auf die Verminderung der Neutrophilen. Nach der ersten Stunde des LIM Einsatzes kam es auch in der LIM-Gruppe zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten, dieser war jedoch anfangs nicht so steil wie der Anstieg in der SMC-Gruppe. In der LIM-Gruppe waren bis zum Ende weniger Neutrophile im peripheren Blut zu finden als in der SMC-Gruppe.

Durch Einsatz nach hämorrhagischem Schock oder Polytrauma könnte somit die Häufigkeit des Auftretens eines SIRS durch Überwindung der Apoptoseresistenz der Neutrophilen vermindert werden.

In der Nachbeobachtungszeit stieg die Anzahl der Neutrophilen in der LIM-Gruppe im Vergleich zur SMC-Gruppe wieder an. Dies ist durch den nun abgeschlossenen LIM-Einsatz zu erklären. Die durch das LIM zirkulierten Granulozyten wurden erfolgreich reduziert, dennoch ist es denkbar, dass es zu einer neuen Rekrutierung von Neutrophilen durch nicht apoptotische aktivierte Granulozyten kam. Für weiterführende Studien wäre einerseits ein längerer Nachbeobachtungszeitraum oder eine Verlängerung des LIM-

Einsatzes notwendig. Eine andere Möglichkeit wäre ein mehrfacher LIM-Einsatz an aufeinanderfolgenden Tagen.

Im Rahmen der Untersuchung sollten sowohl CD 11/CD18 als auch oxidativer Burst bestimmt werden, diese Versuche lieferten jedoch keine verwertbaren Ergebnisse und sind deshalb in dieser Arbeit nicht aufgeführt. Hiermit hätte wahrscheinlich eine genauere Aussage über die Funktionalität der gemessenen Granulozyten getroffen werden können. Ein Versuch über einen Beobachtungszeitraum von einer Woche mit Induktion einer Ischämie einer Extremität wurde bereits durchgeführt.

4.4.1 Das LIM vermindert die Gewebeeinfiltration durch Neutrophile

Die histologische Analyse der Gewebe ergab eine geringere Anzahl Neutrophiler insbesondere im Lungengewebe der Tiere der LIM-Gruppe im Vergleich zur SMC Gruppe. Das Lungengewebe als eines der Schockorgane, wurde somit nach Einsatz des LIM weniger durch Granulozyten infiltriert. Die Verminderung der Neutrophilen im peripheren Blut, als auch die Verminderung im Gewebe zeigen die Funktionalität des LIM.

Auffallend ist, dass die Anzahl Neutrophiler in der LIM-Gruppe insbesondere in der Lunge geringer war, sowohl nach 48 Stunden, als auch noch nach 72 Stunden. Warum letztendlich nach 72 Stunden noch ein Effekt des extrakorporalen Kreislaufs, der nur für 3 Stunden andauerte, zu sehen ist, bleibt letztendlich unklar. In diesem Punkt könnte die Latenz der Apoptoseinduktion eine Rolle spielen. Es hat keine Verlängerung der Lebenszeit der Neutrophilen stattgefunden und es ist von der Überwindung der Apoptoseresistenz auszugehen.

In den anderen „Schockorganen“, wie Leber, Niere und Milz konnten jeweils nur wenige Neutrophile nachgewiesen werden. Zwischen den Gruppen zeigte sich nur ein geringer Unterschied.

4.4.2 Fas-vermittelte verminderte Chemotaxis der Neutrophilen

In der Darstellung der chemotaktisch gewanderten Granulozyten zeigt sich initial noch vor Einsatz des LIM eine gesteigerte Migrationsaktivität in der LIM-Gruppe im Gegensatz zur SMC-Gruppe. Im Versuchsverlauf unter Einsatz

des LIM zeigt sich jedoch eine Verminderung der Chemotaxis in der LIM-Gruppe als Zeichen für eine reduzierte Aktivität der Granulozyten. Dies könnte ein erster Hinweis auf induzierte Apoptose sein, zumindest einer Einschränkung ihrer Funktionalität.

Die Ergebnisse sind jedoch als sehr kritisch zu bewerten. Die Schwankungsbreite innerhalb der Gruppen ist sehr groß, sodass weitere Tests hinzugezogen werden sollten um in zukünftigen Studien die Ex-Vivo-Migrationsaktivität beurteilen zu können. Die Ergebnisse hierzu sind nicht eindeutig und nicht signifikant.

4.5 Einfluss des LIM auf die einzelnen Populationen der Leukozyten

Vergleicht man die Grafik, in der die Neutrophilen dargestellt sind, mit der Grafik, in der die Gesamtleukozyten zu sehen sind, fällt auf, dass die Kurven ähnlich verlaufen. Den größten Anteil der Leukozyten bildeten in diesem Fall die Neutrophilen. Die Zahl der Leukozyten in der LIM-Gruppe stieg jedoch weniger stark an. Das zeigt den erwarteten Effekt. In der Grafik, in der die Anzahl an Lymphozyten dargestellt ist, sind weniger Unterschiede zwischen der LIM- und der SMC-Gruppe feststellbar. Eine Reduktion der Lymphozytenzahlen wäre im Falle eines Schocks mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von infektionsbedingten Komplikationsraten verbunden und wäre somit ein unerwünschter Risikofaktor bei einer extrakorporalen Therapie mit dem LIM.

Diese Ergebnisse zeigen folglich die hohe Selektivität mit der das LIM die Neutrophilen in Apoptose bringt in Hinblick auf die Lymphozyten. In der Grafik, in der die Lymphozyten dargestellt sind, zeigt sich ein Unterschied zwischen den Gruppen, der bereits zu Anfang bestand. Die Entwicklung der Zahlen während des Versuchs zeigt einen ähnlichen Verlauf. Die Lymphozyten sanken in beiden Gruppen ab, jedoch bei beiden Gruppen im gleichen Maße. Nach Schockbeginn zeigte sich ein leichter Anstieg der Lymphozyten, wie er bereits in vorangegangenen Studien mit dem LIM gezeigt werden konnte [98].

Diese In-vivo-Daten zeigen, dass das LIM die Neutrophilenzahlen senkt, bzw. den posthämorrhagischen Anstieg der Leukozytenzahlen vermindert und verzögert. Eine Verminderung der Lymphozytenzahlen könnte aufgrund ihrer regulatorischen Einflüsse eine höhere Rate von Sepsis und postoperativer Infektionen und Infektionen nach Schockereignissen bedeuten.

4.5.1 Reduktion der Monozytenzahlen durch das LIM

Bei der Messung der unterschiedlichen Populationen der Leukozyten im Blutfluss zeigte sich neben der oben beschriebenen Reduktion der Neutrophilenzahlen ebenfalls eine Reduktion der Monozytenzahlen durch Einsatz des LIM. Monozyten sind Zellen, welche kurzlebig sind und im Blut nicht proliferieren [39]. Möglicherweise sind sie involviert in die Beseitigung abgestorbener Zellen und toxischer Moleküle [9] und spielen wahrscheinlich auch eine Rolle in der Erneuerung von Gewebsmakrophagen und dendritischen Zellen [40]. Während einer inflammatorischen Reaktion migrieren die Monozyten aus dem peripheren Blut als Antwort auf gewebeabhängige Signale in die lymphoiden und nicht-lymphoiden Gewebe [40]. Sie phagozytieren andere Zellen und toxische Moleküle (z.B. oxidiertes LDL), produzieren proinflammatorische Zytokine und können sich in inflammatorische dendritische Zellen, Makrophagen oder Schaumzellen differenzieren [106, 111]. Folglich wäre möglicherweise durch Reduktion der Monozyten durch die extrakorporale Therapie mit LIM die posthämorrhagische Inflamationsreaktion zu unterdrücken.

Auch in der Pathogenese der Artherosklerose spielen Monozyten eine Rolle. Die Monozyten werden in die Intima und Subintima der Gefäßwand gelockt, sie nehmen LDL und andere Lipide auf, differenzieren sich zu Schaumzellen und formen frühe Plaquesformen in der Intima [38]. Somit wäre die Suppression der Monozyten durch das LIM als mögliche Prävention der Artherosklerose ein wichtiger neuer Ansatzpunkt für künftige Studien.

4.6 Die Rolle der Zytokine bei SIRS und Sepsis

Zytokine stellen Botenstoffe dar, die wie Hormone und Neurotransmitter für die Kommunikation der Zellen untereinander notwendig sind. Zytokine können

unterteilt werden in Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, kolonie-stimulierende Faktoren, Tumornekrosefaktoren uvm. In dieser Arbeit spielen Interleukine, Tumornekrosefaktor-alpha und Interferon-gamma eine Rolle.

IL-1-beta ist bekannt als Lymphozytenaktivierungsfaktor. IL-6 als B-Zellstimulierungsfaktor gilt als prognostischer Faktor bei SIRS, Trauma und Sepsis, ebenso IL-8 (neutrophilen-aktivierendes Protein). Ein Marker, der bei der Diagnose von SIRS und Sepsis Verwendung findet ist TNF-alpha. Als zytokinsynthese-inhibierender Faktor wurde in dieser Arbeit IL-10 bestimmt. IL-10 ist beispielsweise in der Lage die Bildung von TNF-alpha zu inhibieren [8, 55].

INF-gamma wird unter anderen von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen produziert, fungiert als Signalmolekül bei spezifischen Immunreaktionen und ist z.B. in der Lage die Antigenpräsentation zu verbessern. Bei der Abwehr von Viren und Parasiten spielt es eine Rolle, ebenso in der Wachstumshemmung körpereigener Zellen beispielsweise der Neutrophilen [56].

Die oben genannten Zytokine wurden mittels ELISA bestimmt.

INF-gamma konnte bei keinem der Tiere nachgewiesen werden. In allen Gruppen lag die Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze. Bei den anderen, durch porcine ELISAs bestimmten Zytokinen, konnten teilweise Erhöhungen der Konzentrationen nachgewiesen werden. Weder in der LIM-Gruppe noch in der SMC-Gruppe zeigten sich gruppenspezifische Zytokinprofile. Es konnte keine Dynamik innerhalb der aufeinanderfolgenden Zeitpunkte gezeigt werden. Bei einzelnen Tieren konnten beispielsweise stark erhöhte Level nachgewiesen werden, bei anderen Tieren der gleichen Gruppe wiederum nicht.

Die Ergebnisse aus den ELISAs erlauben somit keine hinreichende Beurteilung, ob es ohne LIM nach hämorrhagischem Schock eine stärkere inflammatorische Antwort gab als mit LIM. Ebenso konnte anhand der

Zytokine nicht belegt werden, ob das LIM eine inflammatorische Reaktion vermindert oder verstärkt.

Bei der Bestimmung von IL-6 konnten Kumar et al [64] zeigen, dass niedrige Konzentrationen während SIRS und Sepsis mit einer besseren Prognose korrelierten. Ebenso zeigte sich bei erhöhten Werten eine erhöhte Mortalität. Ein erhöhter TNF-alpha-Level zeigte sich als prognostisch ungünstiger Faktor [37, 42, 64, 76]. TNF-alpha zeigt sich zu Beginn einer Inflammation häufig erhöht, sinkt dann jedoch schnell wieder ab, da die Halbwertszeit sehr kurz ist [27]. TNF-alpha hat eine duale Wirkung auf die Apoptose von Neutrophilen. Es induziert Apoptose in einer Subpopulation empfindlicher Zellen und verzögert andererseits die Apoptose in den verbleibenden Zellen [84]. Für IL-1-beta gilt dasselbe, der Nachweis in der Zirkulation gelingt nur sehr schwer. Ein weiterer Faktor, der den Nachweis von TNF-alpha, sowie IL-1-beta erschwert, ist die Tatsache, dass diese Zytokine sowohl in einer freien Form, als auch in gebundener Form vorliegen können und sich in der gebundenen Form somit dem Nachweis durch einen ELISA entziehen [92]. Auch Rivera-Chavez et al [36] konnten INF-gamma nur in geringen Mengen nachweisen.

4.7 Weitere Einsatzmöglichkeiten des LIM-Verfahrens

Die Rolle, welche Fas-induzierte Apoptose in der medizinischen Forschung spielt, konnte bereits früh in der Tumor- [34, 72] und antiviralen [29] Forschung gezeigt werden. In vitro konnte bereits festgestellt werden, dass chronisch mit HIV infizierte Zellen möglicherweise durch die Applikation von monoklonalen anti-Fas-Antikörpern abgetötet werden können [15, 20, 73].

Möglicherweise spielt verspätete Apoptose der Lymphozyten auch in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine Rolle. Cheng et al [20] und Bosman et al [15] fanden hohe Spiegel löslichen Fas bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes, welche vermutlich mit Fas-L um das zellgebundene Fas konkurrieren.

Einen weiteren möglichen therapeutischen Angriffspunkt stellen lymphoproliferative Syndrome dar.

Beim Einsatz der Herz-Lungen-Maschine ist das LIM bereits mit Erfolg eingesetzt worden.

Weitere Studien mit Einsatz des LIM erfolgten bereits an der Uniklinik Düsseldorf. Es wurde intraoperativ eine Ischämie einer hinteren Extremität beim Münchner Miniaturschwein erzeugt. Hierzu wurde ein Fogarty-Katheter in die Arteria femoralis eingebracht und durch Aufblasen des Ballons eine Ischämie über einen Zeitraum von 30 Minuten induziert.

Es konnte ein Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der Kontrollgruppe gezeigt werden, ebenso eine Verminderung der Migration in das Gewebe nach Einsatz des LIM.

In Zukunft soll an polytraumatisierten Patienten das LIM getestet werden. Es ist denkbar, sowohl nach hämorrhagischem Schock, als auch nach anderen schweren Traumata, das LIM im klinischen Alltag einsetzen zu können und somit die Wahrscheinlichkeit, ein SIRS zu entwickeln, zu minimieren.

Außerdem könnte es bei Infektionen mit HIV und EBV, bei Malignomen, sowie bei Autoimmunerkrankungen von therapeutischem Nutzen sein.

5 Zusammenfassung

Der hämorrhagische Schock als eine Ursache des hypovolämischen Schocks stellt in der chirurgischen Praxis auch heutzutage noch eine große Problematik dar.

Im Schock kommt es durch den Volumenmangel zu einer Minderperfusion des Gewebes und damit zur Hypoxie, weil periphere Gewebe zugunsten von zentralen Organen wie Herz und Gehirn weniger durchblutet werden. Stoffwechselmetaboliten können nicht mehr adäquat entfernt werden und es kommt zur unspezifischen Aktivierung des angeborenen Immunsystems insbesondere von neutrophilen Granulozyten.

Aktivierte neutrophile Granulozyten sind dafür bekannt, an das Endothel zu adhären und durch die Produktion von Sauerstoffradikalen oder die Sekretion proteolytischer Enzyme, wie Elastase, zu endothelialer Dysfunktion zu führen [2]. Im weiteren Verlauf kann es dadurch zu Gewebeerstörung, zu Ödemen und schließlich MOV kommen. Dem MOV liegt häufig eine inflammatorische Ganzkörperreaktion (SIRS) zugrunde, welche auch auf aktivierte Neutrophile zurückzuführen ist. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass bei Vorliegen eines SIRS die Apoptosefähigkeit der Neutrophilen reduziert ist. In zahlreichen Studien wurde anhand unterschiedlicher Methoden versucht, eine Aktivierung zu verhindern, bislang jedoch ohne ausreichenden therapeutischen Erfolg.

Ein neuer therapeutischer Ansatz ist das so genannte Leukozyten-Inhibitions-Modul (LIM). Es handelt sich um ein thermoplastisches Modul, das einen Fas-induzierenden Polyurethanschaum enthält. Wird das Blut durch das LIM geleitet, so adhären zirkulierende Neutrophilen an den Kunststoffträger. Die funktionelle Aktivität des immobilisierten Antikörpers führt zur schnellen Inaktivierung und Apoptose. Inaktivierte Neutrophile lösen sich aus dem Modul und werden vom eigenen Immunsystem aus der Zirkulation entfernt. Somit können hyperaktivierte Neutrophile nach Passage des LIM im Gewebe keinen Schaden mehr anrichten. Das LIM wurde bereits mit Erfolg bei

kardiochirurgischen Operationen mit Anschluss einer Herz-Lungen-Maschine eingesetzt [98].

Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob das LIM in der Lage ist, die posthämorrhagische Aktivierung der neutrophilen Granulozyten zu vermindern. Dazu wurde zuvor von einer Arbeitsgruppe, bestehend aus 5 Doktoranden (Alberto Schek, Ingo Witte, Jessica Baltes, Sarah Sadek und Annina Ott) ein hämorrhagisches Schockmodell in Schweinen etabliert sowie ein extrakorporales Kreislaufsystem zur Immuntherapie an das Modell angepasst.

Die zentralen Ergebnisse meiner Arbeit sind:

- Der hämorrhagische Schock war assoziiert mit einer deutlichen Infiltration neutrophiler Granulozyten in verschiedenen Geweben im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren
- Die Behandlung mit LIM führte zu einer deutlichen Verringerung der posthämorrhagischen Leukozytenzahlen während des dreistündigen LIM-Einsatzes
- Zum Teil wurden deutliche Hinweise auf eine verringerte Neutrophilen-Infiltration insbesondere in relevanten Bereichen der Lunge gefunden.

Schlussfolgerung: Die extrakorporale Immuntherapie mit LIM führt zu einem verringerten Anstieg der posthämorrhagischen Leukozytenzahlen und zur verringerten Infiltration insbesondere der Lunge. Möglicherweise kann LIM in Zukunft bei polytraumatisierten Menschen oder anderen Patienten mit erhöhtem Risiko, ein SIRS zu entwickeln, eingesetzt werden, um die posthämorrhagische Morbidität und Mortalität zu senken. Zahlreiche weitere Studien zur Vorbereitung der LIM-Therapie für die klinische Anwendung werden derzeit durchgeführt.

6 Referenzen

1. Abdel-Rahman U, Margraf S, Aybek T, Lögters T, Bitu-Moreno J, Francischetti I, Kranert T, Grünwald F, Windolf J, Moritz A, Scholz M: Inhibition of neutrophil activity improves cardiac function after cardiopulmonary bypass. *J Inflamm (Lond)*. 2007; Oct 10;4:21
2. Aird WC: The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome; *Blood*. 2003; May 15;101(10):3765-77. Epub 2003 Jan 23
3. Albelda SM, Buck CA : Integrins and other cell adhesion molecules; *FASEB J*. 1990; Aug;4(11):2868-80
4. Albelda SM, Smith CW, Ward PA: Adhesion molecules and inflammatory injury *FASEB J*. 1994; May;8(8):504-12
5. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med*. 1993; 21: 476-7+ 1612-3.
6. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*. 2002; 105: 248-58.
7. Annane D, Sébille V, Charpentier C, Bollaert PE, François B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troché G, Chaumet-Riffaud P, Bellissant E: Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA*. 2002; 288: 862-71.
8. Asadullah K, Döcke WD, Reinke P, Sterry W, Volk HD. Zytokinbestimmungen-Diagnostischer Einsatz *Dtsch Med. Wschr* 1997; 122: 1424-31.
9. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:669-92.
10. Barr J, Hecht M, Flavin KE, Khorana A, Gould MK: Outcomes in critically ill patients before and after the implementation of an evidence-based nutritional management protocol; *Chest*. 2004; Apr;125(4):1446-57

11. Baue AE, Durham R, Faist E: Systemic inflammatory response syndrome (SIRS), multiple organ dysfunction syndrome (MODS), multiple organ failure (MOF): are we winning the battle? *Shock* 1998; 10: 79-89.
12. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC, Carl VS, Peterson VM. Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis. *Arch Surg* 1996; 131:24-30.
13. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D: Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell*. 1996; Jun 14;85(6):803-15
14. Bone RC: Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 1996; 24:163-72.
15. Bosman FT, Visser BC, van Oeveren J Apoptosis: pathophysiology of programmed cell death. *Pathol Res Pract*. 1996; Jul;192(7):676-83
16. Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Kewis SM, Treacher DF: Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 2006; 368: 157-69.
17. Butcher EC: Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity; *Cell*. 1991; Dec 20;67(6):1033-6
18. Cade JF: High risk of the critically ill for venous thromboembolism. *Crit Care Med*. 1982; 10: 448-50.
19. Chang B, Nishikawa M, Sato E, Inoue M: Mice lacking inducible nitric oxide synthase show strong resistance to anti-Fas antibody-induced fulminant hepatitis. *Arch Biochem Biophys* 2003; 411:63-72.
20. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science*. 1994; Mar 25;263(5154):1759-62
21. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM: FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain

- of Fas and initiates apoptosis. *Cell*. 1995 May 19;81(4):505-12
22. Cinatl J Jr, Blaheta R, Bittoova M, Scholz M, Margraf S, Vogel JU, Cinatl J, Doerr HW: Decreased neutrophil adhesion to human cytomegalovirus-infected retinal pigment epithelial cells is mediated by virus-induced up-regulation of Fas ligand independent of neutrophil apoptosis. *J Immunol* 2000; 165:4405- 4413.
 23. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992; 80:2012-20.
 24. Craig, R. W. MCL1 provides a window on the role of the BCL2 family in cell proliferation, differentiation and tumorigenesis. *Leukemia* 2002; 16: 444 – 454.
 25. Dellinger RP et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008; *Crit Care Med*. 2008; Jan;36(1):296-327
 26. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM: Surviving Sepsis Campaign Guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2004; 32: 858-873.
 27. DeLong WG Jr, Born CT: Cytokines in patients with polytrauma. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 422:57-65.
 28. Derouet, M., L. Thomas, A. Cross, R. J. Moots, and S. W. Edwards. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor signaling and proteasome inhibition delay neutrophil apoptosis by increasing the stability of Mcl-1. *J. Biol. Chem*. 2004; 279: 26915–26921.
 29. Dockrell DH. The multiple roles of Fas ligand in the pathogenesis of infectious diseases. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9: 766-779
 30. Drakulovic MB, Torres A, Bauer TT, Nicolas JM, Nogué S, Ferrer M: Supine body position as a risk factor for nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients: a randomised trial. *Lancet*. 1999; 354(9193): 1851-8.
 31. Dransfield I, Buckle AM, Savill JS, McDowall A, Haslett C, Hogg N. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc

- gamma RIII) expression. *J Immunol.* 1994; Aug 1;153(3):1254-63.
32. Epling-Burnette, P. K., B. Zhong, F. Bai, K. Jiang, R. D. Bailey, R. Garcia, R. Jove, J. Y. Djeu, T. P. Loughran, Jr., and S. Wei. Cooperative regulation of Mcl-1 by Janus kinase/stat and phosphatidylinositol 3-kinase contribute to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-delayed apoptosis in human neutrophils. *J. Immunol.* 2001; 166: 7486 –7495.
33. Ertel, W., M. Keel, M. Infanger, U. Ungethüm, U. Steckholzer, and O. Trentz. Circulating mediators in serum of injured patients with septic complications inhibit neutrophil apoptosis through up-regulation of protein-tyrosine phosphorylation. *J. Trauma* 1998; 44: 767–775.
34. Everett H, McFadden G. Apoptosis: An innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol* 1999; 7: 160-165
35. Fan J, Li Y, Levy RM, Fan JJ, Hackam DJ, Vodovotz Y, Yang H, Tracey KJ, Billiar TR, Wilson MA: Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: role of HMGB1-TLR4 signaling. *J Immunol* 2007; 178: 6573-80.
36. Fernando A. Rivera-Chavez, Herbert Wheeler, Guy Lindberg, Robert S. Munford, Grant E. O’Keefe. Regional and Systemic Cytokine Responses to Acute Inflammation of the Vermiform Appendix. *Annals of surgery* Vol. 237, No. 3, 408 –416
37. Fisher CJ Jr, Opal SM, Dhainaut JF, Stephens S, Zimmerman JL, Nightingale P, et al. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med* 1993; 21:318- 27.
38. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu. Rev. Immunol* 2009; 27:165–197.
39. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003; Jul;19(1):2-4.
40. Geissmann F, Auffray C, Palframan R, Wirrig C, Ciocca A, Campisi L, Narni-Mancinelli E, Lauvau G. Blood monocytes: distinct subsets,

- how they relate to dendritic cells, and their possible roles in the regulation of T-cell responses. *Immunol Cell Biol.* 2008; Jul; 86(5):398-408.
41. Gericke GH, Ericson SG, Pan L, Mills LE, Guyre PM, Ely P. Mature polymorphonuclear leukocytes express high-affinity receptors for IgG (Fc gamma RI) after stimulation with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF). *J Leukoc Biol* 1995; 57:455-61
 42. Gogos CA, Drosou E, Bassaris HP, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 2000; 180:176-80.
 43. Gonzales-Amaro R, Sanchez-Madrid F: Cell adhesion molecules: selectins and integrins; *Curt Rev Immunol* 1999; 19: 389-429
 44. Gosselin EJ, Wardwell K, Rigby WF, Guyre PM. Induction of MHC class II on human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, IFN-gamma, and IL-3. *J Immunol* 1993; 151:1482-90.
 45. Grace PA Ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 1994; 81: 637-47.
 46. Granger DN, Kubes P: The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol.* 1994; May; 55(5): 662-75
 47. Greenstein S, Barnard J, Zhou K, Fong M, Hendey B: Fas activation reduces neutrophil adhesion to endothelial cells; *J Leukoc Biol.* 2000; Nov;68(5):715-22
 48. Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ: Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease; *Free Radic Biol Med.* 1998; Sep; 25(4-5): 404-33
 49. Gross, A., J. M. McDonnell, and S. J. Korsmeyer. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999; 13: 1899 –1911.
 50. Gulbins E, Jekle A, Ferlinz K, Grassmé H, Lang F: Physiology of apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000; Oct;279(4): F605-15

51. Gutierrez G, Reines HD, Wulf-Gutierrez ME Clinical review: hemorrhagic shock. *Crit Care*. 2004; 8: 373-81.
52. Haasper C, Kalmbach M, Dikos GD, Meller R, Müller C, Krettek C, Hildebrand F, Frink M. Prognostic value of procalcitonin (PCT) and/or interleukin-6 (IL-6) plasma levels after multiple trauma for the development of multi organ dysfunction syndrome (MODS) or sepsis. *Technol Health Care*. 2010 Jan; 18(2): 89-100.
53. Hagimoto N, Kuwano K, Miyazaki H, Kunitake R, Fujita M, Kawasaki M, Kaneko Y, Hara N: Induction of apoptosis and pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; 17:272- 278.
54. Hoesel LM, Neff TA, Neff SB, Younger JG, Olle EW, Gao H, Pianko MJ, Bernacki KD, Sarma JV, Ward PA: Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock* 2005; 24: 40-7.
55. Howard M, O'Garra A. Biological properties of interleukin-10. *Immunol Today* 1992; 13: 198-200
56. Ibelgaufts H, ed. Dictionary of cytokines. Edition Roche. Weinheim: VCH, 1995.
57. Jassem, W., and Roake, J: The molecular and cellular basis of reperfusion injury following organ transplantation; *Transplant*. 1998; Rev.12: 14.
58. Jimenez MF, Watson RW, Parodo J, Evans D, Foster D, Steinberg M, Rotstein OD, Marshall JC: Dysregulated expression of neutrophil apoptosis in the systemic inflammatory response syndrome; *Arch Surg*. 1997; Dec;132 (12):1263-9; discussion 1269-70
59. Kasuya H, Onda H, Yoneyama T, Sasaki T, Hori T: Bedside monitoring of circulating blood volume after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2003; 34: 956-60.
60. Kellum JA, Angus DC, Johnson JP, Leblanc M, Griffin M, Ramakrishnan N, Linde-Zwirble WT: Continuous versus intermittent renal replacement therapy: a meta-analysis; *Intensive Care Med*. 2002 Jan; 28(1): 29-37.

61. Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD: Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1983 Dec; 86(6): 845-57
62. Klebanoff SJ, Olszowski S, van Voorhis WC, Ledbetter JA, Waltersdorff AM, Schlechte KG. Effects of gamma interferon on human neutrophils, protection from deterioration on storage. *Blood* 1992; 80:225-34.
63. Klein, J. B., M. J. Rane, J. A. Scherzer, P. Y. Coxon, R. Kettritz, J. M. Mathiesen, A. Buridi, and K. R. McLeish. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor delays neutrophil constitutive apoptosis through phosphoinositide 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *J. Immunol.* 2000;164: 4286 – 4291
64. Kumar AT, Sudhir U, Punith K, Kumar R, Ravi Kumar VN, Rao MY. Cytokine profile in elderly patients with sepsis. *Indian J Crit Care Med.* 2009; Apr-Jun; 13(2): 74-8.
65. Lee A, Whyte MBK, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 1993; 54:283-8.
66. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG: Systemic inflammation after trauma. *Injury* 2007; Dec; 38 (12): 1336-45.
67. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G: International Sepsis Definitions Conference 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003; 29: 530-8.
68. Liles, W. C., P. A. Kiener, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, and S. J. Klebanoff. Differential expression of Fas (CD95) and Fas ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils. *J. Exp. Med.* 1996; 184: 429 – 440
69. Llewelyn M, Cohen J: International Sepsis Forum: Diagnosis of infection in sepsis. *Intensive Care Med.* 2001; 27: 10-32.
70. Lögters TT, Altrichter J, Paunel-Görgülü A, Sager M, Witte I, Ott A,

- Sadek S, Baltés J, Bitu-Moreno J, Schek A, Müller W, Jeri T, Windolf J, Scholz M. Extracorporeal immune therapy with immobilized agonistic anti-Fas antibodies leads to transient reduction of circulating neutrophil numbers and limits tissue damage after hemorrhagic shock/resuscitation in a porcine model. *J Inflamm (Lond)*. 2010; Apr 20;7:18.
71. Lomas JL, Chung CS, Grutkoski PS, LeBlanc BW, Lavigne L, Reichner J, Gregory SH, Doughty LA, Cioffi WG, Ayala A: Differential effects of macrophage inflammatory protein-2 and keratinocyte-derived chemokine on hemorrhage-induced neutrophil priming for lung inflammation: assessment by adoptive cell transfer in mice. *Shock* 2003; 19: 358-365.
72. Los M, Burek CJ, Stroh C, Benedyk K, Hug H, Mackiewicz A. Anticancer drugs of tomorrow: Apoptotic pathways as targets for drug design. *Drug Discov Today* 2003; 8: 67-77.
73. Lu YY, Koga Y, Tanaka K, Sasaki M, Kimura G, Nomoto K. Apoptosis induced in CD4+ cells expressing gp160 of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 1994; Jan;68(1):390-9
74. Maianski, N. A., A. N. Maianski, T. W. Kuijpers, and D. Roos. Apoptosis of neutrophils. *Acta Haematol*. 2004; 111: 56 – 66.
75. Mariscalco MM: Leukocytes and the inflammatory response. *Crit Care Med*. 1993; Sep;21(9 Suppl):S347-8
76. Marshall JC, Vincent JL, Fink MP, Cook DJ, Rubenfeld G, Foster D, et al. Measures, markers, and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit Care Med* 2003; 31:1560-7
77. Mayadas, T. N., and X. Cullere. Neutrophil $\beta 2$ integrins: moderators of life or death decisions. *Trends Immunol*. 2005; 26: 388 –395.
78. McCloskey CA, Kameneva MV, Uryash A, Gallo DJ, Billiar TR: Tissue hypoxia activates JNK in the liver during hemorrhagic shock. *Shock* 2004; 24: 488-494.
79. Melley DD, Evans TW, Quinlan GJ. Redox regulation of neutrophil

- apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome. *Clin Sci (Lond)*. 2005;108: 413-24.
80. Moore FA, McKinley BA, Moore EE. The next generation in shock resuscitation. *Lancet* 2004; 363:1988-1996.
 81. Moulding, D. A., J. A. Quayle, C. A. Hart, and S. W. Edwards. Mcl-1 expression in human neutrophils: regulation by cytokines and correlation with cell survival. *Blood* 1998; 92: 2495–2502.
 82. Moulding, D. A., C. Akgul, M. Derouet, M. R. White, and S. W. Edwards. BCL-2 family expression in human neutrophils during delayed and accelerated apoptosis. *J. Leukocyte Biol* 2001; 70: 783–792.
 83. Murphy, B. M., A. J. O'Neill, C. Adrain, R. W. Watson, and S. J. Martin. The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome *c*. *J. Exp. Med.* 2003; 197: 625– 632.
 84. Murray J, Barbara JA, Dunkley SA, Lopez AF, Van Ostade X, Condliffe AM, Dransfield I, Haslett C, Chilvers ER. Regulation of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-alpha: requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro. *Blood*. 1997 Oct 1;90(7): 2772-83.
 85. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM: FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death--inducing signaling complex. *Cell*. 1996; Jun 14; 85(6): 817-27
 86. Orozco-Levi M, Torres A, Ferrer M, Piera C, el-Ebiary M, de la Bellacasa JP, Rodriguez-Roisin R: Semirecumbent position protects from pulmonary aspiration but not completely from gastroesophageal reflux in mechanically ventilated patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; Oct; 152(4 Pt 1):1387-90
 87. Paunel-Görgülü A, Zörnig M, Lögters T, Altrichter J, Rabenhorst U, Cinatl J, Windolf J, Scholz M. Mcl-1-mediated impairment of the intrinsic apoptosis pathway in circulating neutrophils from critically ill

- patients can be overcome by Fas stimulation. *J Immunol.* 2009; Nov 15;183(10): 6198-206.
88. Peter ME, Budd RC, Desbarats J, Hedrick SM, Hueber AO, Newell MK, Owen LB, Pope RM, Tschopp J, Wajant H, Wallach D, Wiltrot RH, Zörnig M, Lynch DH. The CD95 receptor: apoptosis revisited. *Cell.* 2007; May 4;129(3): 447-50.
89. Pongracz, J., P. Webb, K. Wang, E. Deacon, O. J. Lunn, and J. M. Lord. Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 37329–37334.
90. Radsak M, Iking-Konert C, Stegmaier S, Andrassy K, Hänsch G. M: Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology* 2000; 101, 521-530
91. Reali E, Guerrini R, Moretti S, Spisani S, Lanza F, Tomatis R, Traniello S, Gavioli R. Polymorphonuclear neutrophils pulsed with synthetic peptides efficiently activate memory cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 1996; 60:207-13.
92. Rose S, Marzi I: Mediators in polytrauma – pathophysiological significance and clinical relevance. *Langenbecks Arch Surg* 1998, 383:199-208.
93. Sato H, Tanaka T, Kasai K, Kita T, Tanaka N: Role of p38 mitogen-activated protein kinase on cardiac dysfunction after hemorrhagic shock in rats. *Shock* 2007; 28: 291-9.
94. Sato Y, Sato S, Yamamoto T, Ishikawa S, Onizuka M, Sakakibara Y: Phosphodiesterase type 4 inhibitor reduces the retention of polymorphonuclear leukocytes in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 282: L1376-81.
95. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *Kidney Blood Press Res.* 2000; 23(3-5):173-4.
96. Schall TJ, Bacon KB: Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation; *Curr Opin Immunol.* 1994 Dec; 6(6): 865-73

97. Scheel-Toellner D, Wang K, Craddock R, Webb PR, McGettrick HM, Assi LK, Parkes N, Clough LE, Gulbins E, Salmon M, Lord JM. Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling. *Blood*. 2004 Oct 15;104(8):2557-64.
98. Scholz M, Cinatl J, Barros RT, Lisboa AC, Genevcius CF, Margraf S, Francischetti I, Oremek G, Windolf J, Simon A, Moritz A, Bitu-Moreno J. First efficacy and safety results with the antibody containing leukocyte inhibition module in cardiac surgery patients with neutrophil hyperactivity; *ASAIO J*. 2005; Mar-Apr; 51(2): 144-7
99. Scholz M, Cinatl J: Fas/Fas-L Interaction: A Novel Immune Therapy Approach with Immobilized Biologicals. Wiley InterScience 2004
100. Scholz M, Cinatl J, Schädel-Höpfner M, Windolf J: Neutrophils and the blood-brain barrier dysfunction after trauma. *Med Res Rev*. 2007; 27: 401-16.
101. Scholz M, Simon A, Matheis G, Dzemali O, Henrich D, Kleine P, Wimmer-Reinecker G, Moritz A. Leukocyte filtration fails to limit functional neutrophil activity during cardiac surgery; *Inflamm Res*. 2002 Jul;51(7): 363-8
102. Seal JB, Gewertz BL: Vascular dysfunction in ischemia-reperfusion injury; *Ann Vasc Surg*. 2005; Jul; 19(4): 572-84
103. Simon, H. U. Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation. *Immunol. Rev*. 2003; 193: 101–110.
104. Sivertson KL, Seeds MC, Long DL, Peachman KK, Bass DA. The differential effect of dexamethasone on granulocyte apoptosis involves stabilization of Mcl-1L in neutrophils but not in eosinophils. *Cell Immunol*. 2007; Mar;246(1):34-45.
105. Strickland I, Kisich K, Hauk PJ, Vottero A, Chrousos GP, Klemm DJ, Leung DY. High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids. *J Exp Med*. 2001; Mar 5;193(5): 585-93.
106. Tacke F, Randolph GJ. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology*. 2006; 211(6-8): 609-18.

107. Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell*. 1994; Mar 25; 76(6): 969-76
108. Taneja, R., J. Parodo, S. H. Jia, A. Kapus, O. D. Rotstein, and J. C. Marshall. Delayed neutrophil apoptosis in sepsis is associated with maintenance of mitochondrial transmembrane potential and reduced caspase-9 activity. *Crit. Care Med*. 2004; 32: 1460 –1469.
109. Toda Y, Takahashi T, Maeshima K, Shimizu H, Inoue K, Morimatsu H, Omori E, Takeuchi M, Akagi R, Morita K. A neutrophil elastase inhibitor, sivelestat, ameliorates lung injury after hemorrhagic shock in rats. *Int J Mol Med*. 2007; 19: 237-43.
110. Van Meurs M, Wulfert FM, Knol Aj, De Haes A, Houwertjes M, Aarts LP, Molema G: Early organ-specific endothelial activation during hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock* 2008; 29: 291-9.
111. Varol C, Yona S, Jung S. Origins and tissue-context-dependent fates of blood monocytes. *Immunol Cell Biol*. 2009 Jan;87(1):30-8.
112. Vrints CJ: Pathophysiology of the no-reflow phenomenon; *Acute Card Care*. 2009; 11(2): 69-76
113. Wagner C, Radsak M, Andrassy K, Hänsch GM. Expression of the high affinity receptor for IgG (CD64) on polymorphonuclear neutrophils (PMN), induction by inflammatory cytokines and expression in vivo. *Immunobiology* 1998; 199: 641A.
114. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature* 1992; 356: 314-317.
115. Watson, R. W., O. D. Rotstein, M. Jimenez, J. Parodo, and J. C. Marshall. Augmented intracellular glutathione inhibits Fas-triggered apoptosis of activated human neutrophils. *Blood* 1997; 89: 4175–4181.
116. Watson, R. W., O. D. Rotstein, J. Parodo, M. Jimenez, I. Soric, R. Bitar, and J. C. Marshall. Impaired apoptotic death signaling in inflammatory lung neutrophils is associated with decreased

- expression of interleukin-1-converting enzyme family proteases (caspases). *Surgery* 1997; 122: 163–171.
117. Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, Mirrett S, Reimer LG, Parmigiani G, Reller LB. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 584-602.
118. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils: *N Engl J Med* 1989; 320: 365-276.
119. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A: Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol.* 2005; 78: 325-37.
120. Zakaria el R, Campbell JE, Peyton JC, Garrison RN: Postresuscitation tissue neutrophil infiltration is time-dependent and organ-specific. *J Surg Res.* 2007; 143: 119-25.
121. Zimmerman BJ, Granger DN. Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci.* 1994; 307: 284-92.

7 Curriculum vitae

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen denjenigen bedanken, die mich während der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Professor Dr. med. Joachim Windolf, Direktor der Klinik für Unfall- und Handchirurgie, für die Überlassung des Themas.

Herrn Professor Dr. phil. nat. Martin Scholz, der als Forschungsleiter der Unfallchirurgischen Klinik diese Arbeit möglich machte. Für seine stets unermüdliche Unterstützung, auch während der „Durststrecken“, seine konstruktive Kritik und seine Motivation.

Herrn Dr. med Tim Loegters für die Unterstützung in der TVA und seine Geduld während der Versuche.

Frau Samira Seghrouchni und Frau Jutta Schneider, ohne die die Arbeit im Labor kaum möglich gewesen wäre. Ihnen danke ich für ihre Geduld, die Zeit die sie investiert haben, die Organisation und das stets offene Ohr und ihren Teamgeist.

Unserer Arbeitsgruppe: Sarah Sadek, Jessica Baltés, Ingo Witte und Alberto Schek, für die gemeinsame Arbeit in der TVA und im Labor. Ohne sie hätte diese Arbeit nur halb soviel Spaß gemacht.

Frau Dr. Adnana Paunel-Görgülü für die fachliche Unterstützung im Labor.

Herrn Dr. Sager für sein Vertrauen und die Mitarbeit an unseren Versuchen, sowie Frau Dr. Engelhardt, Frau Schrey und dem Team der Tierpfleger der TVA.

Ich danke meinen Eltern Frau Ulrike Ott und Herrn Dr. med. Wolfgang Ott für die Unterstützung während des gesamten Studiums.

Meinen Schwestern Julia Gockel und Friederike Ott für das Lektorat dieser Arbeit und meinem Bruder Alexander Ott für die Hilfe in allen Formatierungs-Fragen.

Zu guter Letzt gilt der Dank meinen Freunden, sowie meinem Freund Christian Neumaier, die mich während der gesamten Zeit unterstützten und mir stets zur Seite standen.

8 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen benutzt habe.

Die in der vorliegenden Dissertationsschrift verwendeten Abbildungen wurden von mir erarbeitet und teilweise in abgewandelter Form für die Publikationsschrift (Loegters et al, Journal of Inflammation, 2010) verwendet. Die Abbildungen zum Modell wurden von allen Doktoranden der Arbeitsgruppe erstellt.

Mannheim, den 17.09.2010