

Die Bedeutung von Toll-like Rezeptoren für die kardiale Inflammation und Funktion während polymikrobieller Sepsis der Maus

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Ralph Lohner
aus Koblenz

2013

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Rainer Meyer
2. Gutachter: Prof. Dr. med. C. Grohé

Tag der Mündlichen Prüfung: 8.5.2013

Aus dem Institut für Physiologie II
Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Swandulla

Meiner Mutter in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	10
1.1 Prävalenz der Sepsis und ökonomische Folgen.....	10
1.2 Definition der Sepsis	11
1.3 Pathophysiologie der Sepsis	14
1.3.1 Immunreaktion.....	14
1.3.2 Zytokine.....	15
1.3.2.1 TNF α	16
1.3.2.2 IL-1 β	16
1.3.2.3 IL-6	17
1.3.2.4 IL-10	17
1.3.3 Stickstoffmonoxid (NO)	17
1.3.4 HMGB1	18
1.3.5 TREM1	18
1.4 Pathogenese der Organschäden während der Sepsis	19
1.4.1 Störungen der Makrozirkulation.....	19
1.5 Septische Kardiomyopathie.....	19
1.5.1 Physiologie des kontraktiven Apparates des Kardiomyozyten	19
1.5.2 Schädigung von Kardiomyozyten während der Sepsis	20
1.5.3 Zirkulierende kardiodepressive Faktoren	20
1.5.4 Kalziumhaushalt und Myofilamente	21
1.6 Angeborene Immunität und Toll-like Rezeptoren.....	21
1.6.1 Toll-like Rezeptoren	22
1.6.2 Signaltransduktion nach TLR-Aktivierung	24
1.6.3 Toll-like Rezeptoren und septische Kardiomyopathie	25
1.7 Tiermodelle.....	26
1.8 Forschungsziele der Arbeit.....	28

2. Material und Methoden	29
2.1 Versuchstiere	29
2.2 Genotypisierung von transgenen Mäusen	29
2.3 CASP-Operation.....	33
2.4 Bakterienkulturen	33
2.5 RNA-Isolation	33
2.6 Reverse Transkription	34
2.7 Quantitative real-time-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	35
2.8 Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	37
2.9 Druck-Volumen Katheter	39
2.10 Statistische Analysen	41
3. Ergebnisse	42
3.1 Darmflora von WT- und TLR-D Tieren.....	42
3.2 Intraperitoneale Bakterienfreisetzung und Mortalität nach CASP	42
3.3 Kardiales Inflammationsprofil in WT-Mäusen	44
3.4 Kardiales Expressionsprofil von Rezeptoren der angeborenen Immunität in septischen WT-Mäusen	46
3.5 Hämodynamik in septischen WT-Mäusen	48
3.6 Intraperitoneale Bakterienlast nach CASP in TLR-D Mäusen.....	49
3.7 Kardiale Expression von Zytokinen in TLR-D Tieren.....	50
3.8 Immunrezeptorregulation in TLR-D Tieren 18 h nach CASP	53
3.9 Hämodynamik der TLR-D Tiere 18 h nach CASP	55
4. Diskussion	57
4.1 Einfluss von TLR auf die bakterielle Homöostase der Darmflora	57
4.2 Validität des CASP-Modells	58
4.3 Kardiales Zytokinprofil im Zeitverlauf in WT-Mäusen	58
4.4 Myokardiale TLR-Expression in WT-Mäusen nach CASP	60
4.5 Hämodynamik septischer WT-Mäuse 18 h nach CASP.....	61
4.6 TLR-Abhängigkeit der kardialen Inflammation und Dysfunktion.....	64
5. Zusammenfassung	66
6. Literaturverzeichnis	67

Abkürzungsverzeichnis

18 G	18 Gauge
ACCP	American College of Chest Physicans
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Bp	Basenpaare
CASP	colon ascendens stent peritonitis
CCR4	C-C Chemokine Rezeptor Typ 4
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CFU	colony forming units
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CLP	cecal ligation and puncture
CAN	Colistin und Nalidixinsäure
cNOS	constitutive nitric oxide synthase
CpG	Cytosin-phosphatidyl- Guanin
CXC	Chemokine der CXC-Familie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonate
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dP/dt max	max. Druckerhöhungsgeschwindigkeit
dP/dt min	max. Erschlaffungsgeschwindigkeit
ds	doppelsträngig
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESP	end-systolic pressure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GIT	Guanidiniisothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HMGB1	High mobility group box 1
HR	heart rate
HZV	Herzzeitvolumen
i. p.	intraperitoneal

i. v.	intravenös
ICU	intensive care unit
IEC	intestinale epitheliale Zellen
IL	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
IRAK	interleukin-1 receptor associated kinase
I κ B	Inhibitor der NF κ B Kinase
KG	Körpergewicht
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucine-rich repeat
LTA	Lipoteichoic acid
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MDP	Muramyl Dipeptid
MEFV Gen	mediterranean fever gen
mRNA	messenger RNA
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NF κ B	nuclear factor κ B
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
Oligo-dT	Oligonukleotid
Pam3Cys	Lipopeptid und TLR-Agonist
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly IC	Doppelstrang RNA aus Polyribonucleinsäure u. Polyribocytidylsäure
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PRR	pattern recognition receptor
qRT-PCR	Real-Time-quantitative-PCR
RNA	Ribonucleinsäure
RNAsen	RNA verdauende Enzyme

RQ	relativer Quotient
RVU	relative Volumeneinheiten
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SCF	stem cell factor
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SS	einzelsträngig
SSC	Surviving Sepsis Campaign
SV	Schlagvolumen
SW	stroke work
TIR	toll-interleukin 1 receptor
TIRAP	toll-interleukin 1 receptor containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TLR-D	Toll-like Rezeptor Defizienz
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TREM1	triggering receptor expressed on myeloid cells 1
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
WT	Wild-Typ
ZVD	Zentralvenöser Druck

1. Einleitung

1.1 Prävalenz der Sepsis und ökonomische Folgen

In der Bundesrepublik Deutschland versterben etwa jedes Jahr mindestens 60.000 Menschen am Krankheitsbild der Sepsis. Somit ist diese Erkrankung die dritthäufigste Todesursache in Deutschland, nur übertroffen von der Koronaren Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt (Brunkhorst, 2006; Parrillo et al., 1990). Jedes Jahr erkranken 79.000 Einwohner (116 aus 100.000) in der BRD an einer Sepsis, 75.000 (110 aus 100.000) sogar an einer schweren Sepsis oder einem septischen Schock (Moerer und Quintel, 2009). Nicht nur in der Bundesrepublik, sondern auch in anderen hoch entwickelten Ländern der westlichen Hemisphäre stellt die Sepsis eine der häufigsten Todesursachen dar. So erkranken jedes Jahr alleine in den USA geschätzte 750.000 Menschen an ihr (Martin et al., 2003).

Häufig entwickeln Patienten erst im Laufe ihres Krankenhausaufenthaltes dieses Leiden, insbesondere Patienten auf Intensivstationen sind einem erhöhten Risiko ausgesetzt. So beträgt die Prävalenz für Intensivpatienten an einer Sepsis zu erkranken 12,4 %; für eine schwere Sepsis, inklusive septischen Schock, noch 11 % (Sands et al., 1997). Es ist davon auszugehen, dass die Inzidenz in den kommenden Jahren trotz neuer Behandlungsstrategien aufgrund der Zunahme immunsupprimierter Patienten, einer erhöhten Frequenz resistenter Erreger sowie der weit verbreiteten Verwendung von Fremdmaterialien zur Implantation weiter ansteigen wird (Opal und Cohen, 1999). Die Mortalität ist trotz modernster medizinischer Therapiekonzepte und professioneller Betreuung der Patienten auf Intensivstationen mit bis zu 50 % ausgesprochen hoch (Wheeler und Bernard, 1999).

Dies bedeutet neben einer hohen Mortalitätsrate auch eine immense wirtschaftliche Belastung der jeweiligen Gesundheitssysteme. So werden zwischen 40 und mehr als 60 Prozent der Budgets von Intensivstationen für die Bekämpfung dieses Krankheitsbildes eingesetzt (Angus et al., 2001; Chalfin et al., 1993). Das resultiert zum einen aus der relativ langen Verweildauer septischer Patienten auf Intensivstationen, zum anderen aus den kostspieligen Therapiestrategien, die erforderlich sind, um die Vitalparameter der Patienten zu überwachen und aufrecht zu erhalten. So beträgt die durchschnittliche Verweildauer eines Patienten mit einer Sepsis 16,6 Tage. Es entstehen durchschnittliche Behandlungskosten in Höhe von rund 23.000 Euro, alleine für die Intensivbehandlung. Die Kombination von hohen Behandlungskosten und einer sehr hohen In-

zidenz, führen zu enormen Gesamtkosten, die jedes Jahr von den Gesundheitssystemen zu bewältigen sind.

Mit dem Verlassen der Intensivstation ist der Patient allerdings noch keineswegs wieder genesen. Noch über Jahre hinweg ist das Mortalitätsrisiko, abhängig von Alter, Nebenerkrankungen, Krankheitsschwere und der Lokalisation der zugrunde liegenden Infektion, erhöht und die Lebensqualität vermindert (Heyland et al., 2000; Winters et al., 2010). Dementsprechend sind die Behandlungs- und Betreuungskosten über Jahre im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht.

1.2 Definition der Sepsis

Die Begriffsbestimmung der Sepsis geht auf Schottmüller aus dem Jahr 1914 zurück: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“. In dieser Abhandlung beschäftigte sich Schottmüller als erster mit dem Einfluss bakterieller Toxine auf die Erkrankung.

Bis heute ist der Kern dieser Definition unverändert, lediglich eine leichte Anpassung an den heutigen Stand der Wissenschaft ist nötig: „Sepsis ist die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen.“.

Im Jahr 1991 trafen sich Vertreter des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM), um allgemeingültige Definitionen der Sepsis und assoziierter Erkrankungen anzufertigen. Insbesondere sollten die Begriffe Infektion, Bakteriämie, SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock geklärt werden (Bone et al., 1992).

Bei einer Infektion handelt es sich demnach um eine entzündliche Gewebereaktion oder um eine Invasion von Mikroorganismen in normalerweise sterile Gewebe.

Befinden sich vitale Bakterien im Blut, spricht man von einer Bakteriämie.

SIRS ist die Abkürzung für „systemic inflammatory response syndrom“, also eine systemische Entzündungsreaktion. Sie ist durch mindestens zwei der folgenden Symptome gekennzeichnet:

- 1) Die Körpertemperatur liegt über 38° C oder unter 36° C,
- 2) Eine Tachykardie mit einer Herzfrequenz von mehr als 90 Schlägen pro Minute,
- 3) Die Atemfrequenz beträgt mehr als 20 Atemzüge pro Minute oder der arterielle Partialdruck des Kohlendioxids liegt unter 32 mmHg,
- 4) Die Leukozyten können sowohl erhöht ($> 12.000/\text{mm}^3$) als auch erniedrigt ($< 4.000/\text{mm}^3$) sein oder der Anteil an unreifen (stabförmigen) Leukozyten ist größer als 10 %.

Wenn mindestens zwei der o. g. Parameter bei einem Patienten diagnostiziert werden und diese als eine systemische Reaktion auf eine Infektion interpretiert werden können, dann spricht man von einer Sepsis (Bone et al., 1992) (Abb. 1).

Kommt es im Verlauf der Sepsis zu Organdysfunktionen, Durchblutungsstörungen und Hypotonie aus denen ggf. eine Azidose, Oligurie oder gar eine Verschlechterung der Bewusstseinslage resultieren, spricht man von einer schweren Sepsis.

Der septische Schock stellt den Endpunkt dieses progredienten Geschehens mit einer gleichzeitig sprunghaft erhöhten Mortalität dar (Abb. 2). Er ist erreicht, wenn sich die genannten Symptome trotz Volumensubstitution und der Therapie mit positiv inotropen oder vasokonstriktiven Substanzen refraktär verhalten.

Eine sepsisinduzierte Hypotonie besteht, wenn der systolische Blutdruck unter 90 mmHg gefallen ist oder eine Reduktion des Ausgangswertes um 40 mmHg beim gleichzeitigen Fehlen anderer Ursachen festzustellen ist.

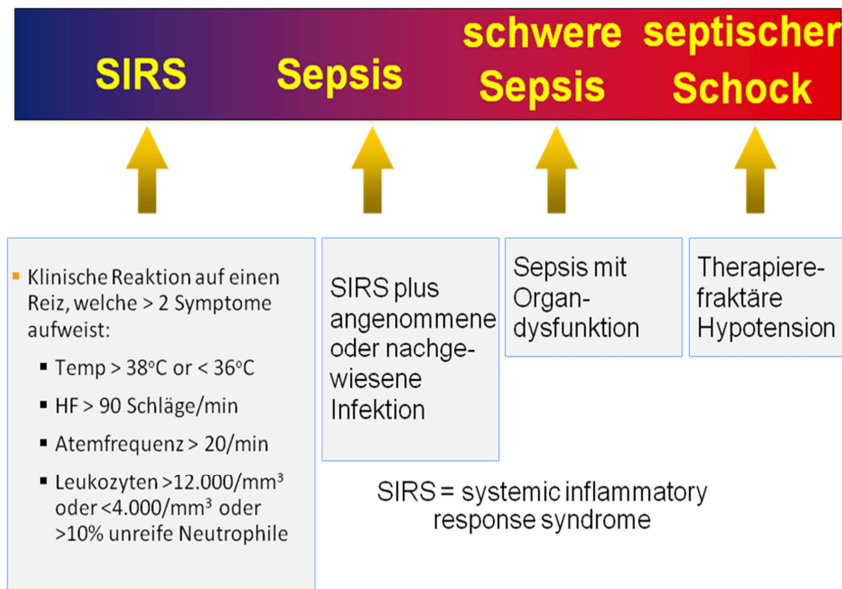


Abb. 1: Gemäß der international gültigen Definition handelt es sich bei einer Sepsis um ein *systemic inflammatory response syndrome*, welchem eine Infektion zu Grunde liegt. Je nach Organfunktion und kardiozirkulatorischer Situation unterscheidet man die Sepsis von einer schweren Sepsis und dem septischen Schock (Bone et al., 1992)

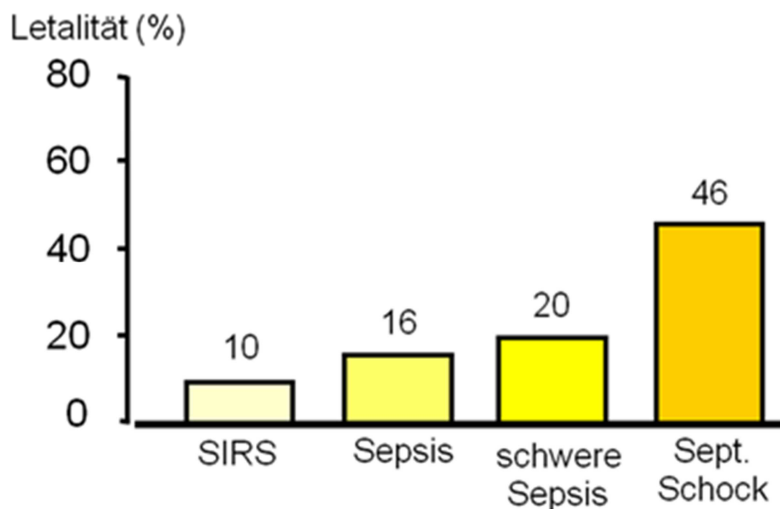


Abb. 2: Neben der hohen Prävalenz der Sepsis ist die Letalitätsrate dieses Krankheitsbildes ausgesprochen hoch. So verstirbt fast jeder fünfte Patient, der an einer Sepsis bzw. schweren Sepsis leidet. Geraten die Patienten in einen septischen Schock steigt die Letalität sprunghaft auf bis zu 46 % an (Wheeler und Bernard, 1999)

Im Jahre 2001 modifizierte die International Sepsis Definition Conference das Modell des SIRS und entwickelte ein erweitertes Konzept zur Einstufung der Sepsis anhand von vier unterschiedlichen Charakteristika, welche mit dem Begriff PIRO bezeichnet werden : Hier steht das P

für die Prädisposition, was bedeutet, dass eine Komorbidität das Überleben einer Sepsis signifikant verschlechtern kann. I kürzt den Begriff Infektion ab und reflektiert das Wissen über die unterschiedliche Pathogenität einzelner Erreger und ihrer Produkte, weshalb R die Antwort des Organismus auf eine Infektion bedeutet. Der letzte Buchstabe O steht für Organversagen oder auch das Versagen eines physiologisch relevanten Systems wie z. B. des Gerinnungssystems (Levy et al., 2001).

1.3 Pathophysiologie der Sepsis

1.3.1 Immunreaktion

Eine Sepsis geht von einem Infektionsherd innerhalb des Organismus aus, von dem die pathogenen Keime oder deren Toxine sich weiter ausbreiten können. Grundsätzlich kommt für einen solchen Infektionsherd jedes Gewebe in Frage, jedoch können Verletzungen, Funktionsstörungen oder Fremdkörper seine Entstehung begünstigen. Der Infektionsherd kann durch ein breites Erregerspektrum von gram-positiven und gram-negativen Bakterien sowie Pilzen gebildet werden. Eine polymikrobielle Mischinfektion ist ebenfalls möglich.

Einer akuten Infektion begegnet der menschliche Organismus mit einer Vielzahl an Abwehrfunktionen, um die Infektion zunächst zu begrenzen und schließlich zu eliminieren. Versagen diese Abwehrprozesse, kommt es, abhängig von der Anzahl, der Pathogenität und der Virulenz der Erreger, zum Eintritt vitaler Bakterien und ihrer Toxine in den Blutstrom.

Die Pathophysiologie der Sepsis ist insbesondere zu Beginn je nach Art des Erregers verschieden, da gram-negative Bakterien wie z. B. *Escherichia coli*, *Enterobacter* und *Klebsiella* anders vom Immunsystem erkannt werden als gram-positive Keime wie z. B. Staphylokokken und Streptokokken.

Zur Erkennung von Pathogenen verfügt der Mensch über ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem, welche sich gegenseitig unterstützen und ergänzen. Beide Systeme bestehen aus löslichen und zellulären Substanzen. Das zelluläre System der angeborenen Immunität wird von Phagozyten und natürlichen Killerzellen gebildet, wobei die Phagozyten in Makrophagen und Granulozyten unterteilt werden können. Beide besitzen hochspezialisierte Oberflächenrezeptoren, die in der Lage sind sog. PAMPs (pathogen-associated molecular pattern) der Keime zu erkennen und zu identifizieren, um sie letztlich zu vernichten (Bianchi, 2007).

Beim erworbenen Immunsystem, welches sich durch klonale Proliferation und eine Gedächtnisfunktion auszeichnet, sind die löslichen Faktoren die Antikörper, die zellulären Faktoren

werden von B- und T-Zellen gebildet. B- und T-Zellen erkennen ebenfalls mit Hilfe von Oberflächenrezeptoren, die durch genetische Rearrangements enorm vielfältige Spezifitäten aufweisen, Fremdanigene. B-Zellen und T-Helferzellen arbeiten eng zusammen. Damit sie untereinander kommunizieren können, verwenden sie lösliche Faktoren, sog. Zytokine, die ebenfalls von den Zellen des angeborenen Immunsystems sezerniert werden und somit zur Steuerung und Aktivierung der adaptiven Immunantwort entscheidend beitragen (Janeway und Medzhitov, 2002).

Physiologischerweise werden beim Auftreten einer Infektion zunächst pro-inflammatorische Zytokine wie TNF α , IL-1 β und IL-6 freigesetzt, um dann durch negatives Feedback von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10, TGF- β und IL-13 ersetzt zu werden (Remick, 2003).

Die pro-inflammatorischen Mediatoren dienen der Auslösung und Unterhaltung der Entzündungsreaktion und können, wenn es zu ihrer überschießenden, systemischen Produktion kommt, eine Sepsis unterhalten und vorantreiben. Verschiedene Fakten stützen diese Aussage: So haben septische Patienten mit erhöhten Zytokinwerten von TNF α ein erhöhtes Mortalitätsrisiko (Hack et al., 1997). Gleichzeitig ist bekannt, dass die Injektion von TNF α - Molekülen in Versuchstiere zu systemischen Entzündungsreaktionen und Gewebeschädigungen führt. Umgekehrt führt eine Injektion von Endotoxin in Versuchstiere zu erhöhten Zytokinwerten im Serum und in den Organen. Letztlich konnte eine Verbesserung der Überlebenskinetik bei den Tieren festgestellt werden, bei denen durch exogene Faktoren oder durch Gendefizienz eine Inhibierung der Zytokinproduktion des Organismus erreicht werden konnte (LaDuca und Gaspari, 2001).

1.3.2 Zytokine

Wie bereits beschrieben spielen Zytokine eine entscheidende Rolle für die inflammatorischen Prozesse im Rahmen von Infektionen und darüber hinaus der Sepsis. Zytokine lassen sich grundsätzlich aufgrund ihrer Funktion in drei verschiedenen Klassen unterteilen:

- 1) Zytokine der natürlichen Immunabwehr und der Entzündungsreaktion; hierzu zählen TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 und α - und β -Interferon
- 2) Eine weitere Klasse bilden die immunregulatorischen Zytokine, welche Wachstum und Differenzierung von Lymphozyten kontrollieren und die Immunantwort steuern; hierzu zählen IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, γ -Interferon und TGF- β

- 3) Schließlich Zytokine, die hauptsächlich Wachstum und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen beeinflussen wie IL-3, IL-7, IL-9, IL-11, SCF (stem cell factor), GM-CSF, G-CSF und M-CSF

Während einer Sepsis spielen insbesondere die Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6 und IL-10 eine bedeutende Rolle bei der Entstehung spezifischer Symptome.

1.3.2.1 TNF α

TNF α hat vielfältigste Wirkungen auf verschieden Zelltypen. So werden Monozyten/ Makrophagen dazu angeregt bakterizide Substanzen inklusive des sog. „respiratory burst“ sowie sekundäre Zytokine freizusetzen. Ähnlich wirkt es auf neutrophile Granulozyten (Parameswaran und Patial, 2010). Durch eine verstärkte Adhärenz neutrophiler Granulozyten an Endothelzellen, hervorgerufen durch eine verstärkte Expression von Oberflächenmolekülen überwiegend in den postkapillären Venolen kommt TNF α eine wichtige chemotaktische Bedeutung zu (Lim et al., 1998). Desweiteren werden eosinophile Granulozyten, T-Lymphozyten und NK-Zellen aktiviert, während die Hämatopoese gehemmt wird.

1.3.2.2 IL-1 β

Hierbei handelt es sich um ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches überwiegend von Monozyten/Makrophagen, jedoch auch von Parenchymzellen gebildet wird (Copray et al., 2001; Watkins et al., 1995). Bei letzteren steht jedoch nicht die Sekretion dieses Mediators in die Blutbahn im Vordergrund, vielmehr bildet sich ein intrazellulärer Zytokinpool, dessen Bedeutung bislang nicht abschließend geklärt werden konnte. Die Wirkungen von IL-1 β sind denen von TNF α sehr ähnlich, hinzu kommt jedoch eine ausgeprägte Wirkung auf T-Helferzellen durch die Induktion von IL-2 und IL-2-Rezeptoren, sowie die Steigerung der klonalen Proliferation von B-Zellen.

1.3.2.3 IL-6

Die Synthese und Sekretion dieses sowohl pro-als auch anti-inflammatorischen Zytokins wird durch verschiedene Stimuli wie Endotoxin, IL-1 und TNF α stimuliert (Prinsen et al., 2008). Auf der einen Seite ist IL-6 ein wichtiger Mediator der Akutphasereaktion, was sich in der Stimulation der Synthese und Freisetzung von Typ-2-Akutphaseproteinen zeigt, auf der anderen Seite ist IL-6 in der Lage, pro-inflammatorische Prozesse durch die Hemmung der TNF α - und IL-1-Produktion einzudämmen. Darüber hinaus wird die Bildung von ACTH und somit von Glukokortikoiden stimuliert, was ebenfalls eine anti-inflammatorische Komponente dieses Zytokins widerspiegelt.

1.3.2.4 IL-10

Dieses anti-inflammatorische und immunsuppressive Zytokin wird von TH-2-Lymphozyten sezerniert. Für seine Bedeutung während einer Sepsis liegen sehr heterogene Erkenntnisse vor: So konnte exogen appliziertes IL-10 auf der einen Seite die inflammatorische Reaktion begrenzen und die daraus resultierenden Schädigungen bei den Versuchstieren verhindern, auf der anderen Seite zeigte sich in anderen Versuchsprotokollen durch die starke Immunsuppression eine erhöhte Letalität, da eine effektive Erregerabwehr nicht mehr erfolgen konnte (Ashare et al., 2005).

1.3.3 Stickstoffmonoxid (NO)

NO wird enzymatisch von NO-Synthasen aus Arginin gebildet. Es gibt drei verschiedene Isoformen dieses Enzyms, 2 konstitutiv exprimierte (cNOS), die durch Anhebung des intrazellulären Kalziumspiegels aktiviert werden, sowie eine induzierbare Isoform (iNOS), deren Aktivierung kalziumunabhängig erfolgt. iNOS wird durch verschiedene Triggerreize während einer Sepsis in verschiedenen Zellen und Geweben induziert und ist dort in der Lage, innerhalb von kurzer Zeit große Mengen von NO zu synthetisieren.

NO selbst gilt als wichtiger Sepsismediator. So wird die Hyporeaktivität der peripheren Widerstandsgefäße gegenüber Vasokonstriktoren überwiegend diesem Metaboliten zugeschrieben. Ebenso konnte bereits gezeigt werden, dass die durch Zugabe von LPS induzierte Kontraktilitätsverminderung von Kardiomyozyten nach Zugabe eines iNOS-Inhibitors fast vollständig reversibel war (Baumgarten et al., 2006). Jedoch ist die Rolle von NO für die Entstehung der septischen Kardiomyopathie bislang nicht abschließend geklärt.

1.3.4 HMGB1

Das high mobility group box 1 (HMGB1) Protein wurde ursprünglich als Nucleosomenstabilisierendes Protein beschrieben, das während der Transkription eine Rolle spielt. Jedoch konnte inzwischen festgestellt werden, dass HMGB1 von Monozyten und Makrophagen nach Stimulation mit LPS auch extrazellulär freigesetzt werden kann (Wang et al., 1999). Dieses extrazelluläre HMGB1 ist selber in der Lage, inflammatorische Prozesse zu unterstützen und interagiert wiederum mit anderen Rezeptoren der angeborenen Immunität, insbesondere mit TLR2 und TLR4 (Park et al., 2004; Yang et al., 2004). Inwiefern HMGB1 von Kardiomyozyten während einer Sepsis gebildet wird, ist bislang nicht untersucht worden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *in vitro* HMGB1 einen negativ inotropen Effekt auf Kardiomyozyten ausübt (Yang et al., 2004).

1.3.5 TREM1

Der „triggering receptor expressed on myeloid cells 1“ (TREM1) ist ein Rezeptor der Immunglobulin-Superfamilie und wird auf Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert. Diese Expression wird im Rahmen von Infektionen mit gram-positiven und gram-negativen Erregern signifikant gesteigert, so dass dieser Rezeptor auch als Marker der Infektion angesehen wird (Bouchon et al., 2001; Colonna und Facchetti, 2003). Bei nicht-infektiösen inflammatorischen Krankheitsbildern wie etwa Colitis ulcerosa oder der Psoriasis findet sich hingegen keine Induktion dieses Rezeptors. Darüber hinaus steigert TREM1 in Anwesenheit von Liganden für TLR2 und TLR4 die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-1 β und hemmt gleichzeitig die Bildung von IL-10 (Bleharski et al., 2003). Gleichzeitig führt die Aktivierung dieser TLR zu einer Expressionssteigerung von TREM1, so dass das Zusammenspiel dieser Rezeptoren in der Lage ist, die inflammatorische Immunantwort wechselseitig zu verstärken (Knapp et al., 2004).

Im Rahmen einer polymikrobiellen Sepsis ist bekannt, dass die TREM1 Expression auf den o. g. Zelltypen massiv gesteigert wird (Gibot et al., 2005). Jedoch ist bislang nicht bekannt, ob TREM1 ggf. auch in Organen wie etwa dem Herzen exprimiert wird und ob eine organständige Expression in der Lage ist, die kardiale Inflammation zu begünstigen.

1.4 Pathogenese der Organschäden während der Sepsis

Die o. g. Mediatorsubstanzen führen über eine Reihe verschiedener Mechanismen zu einer Schädigung von Organzellen. Eine entscheidende Rolle spielt hierbei das verminderte Sauerstoffangebot an die Organe, was durch eine Perfusionsstörung der entsprechenden Organe zu begründen ist. Dies wiederum ist auf die ausgeprägten kardio-zirkulatorischen Störungen während einer Sepsis zurückzuführen.

1.4.1 Störung der Makrozirkulation

Mediatoren wie NO, welche im Rahmen einer Sepsis vermehrt gebildet und freigesetzt werden, führen zu einer Vasodilation und somit zu einer ausgeprägten Herabsetzung des peripheren Gefäßwiderstandes. Daraus resultiert ein Abfall des Blutdruckes, was eine verminderte Perfusion der Endorgane nach sich zieht. Um dies zu verhindern, kommt zu einer kompensatorischen Steigerung des Herzminutenvolumens. Dies wird auch als hyperdynamie Kreislaufumstellung bei septischen Patienten bezeichnet. Häufig ist die Steigerung des HZV jedoch nicht stark genug, um den peripheren Widerstandsverlust zu kompensieren, weshalb es zum Sauerstoffmangel mit konsekutiven Zellschädigungen in den Endorganen kommt.

1.5 Septische Kardiomyopathie

Wie bereits beschrieben spielt für die Aufrechterhaltung der Perfusion während der Sepsis das HZV eine entscheidende Rolle. Eine massive Steigerung ist aufgrund des ausgeprägten peripheren Widerstandsverlustes zwingend erforderlich, um eine ausreichende Geweboxygenierung sicherzustellen. Oftmals ist das Herz septischer Patienten jedoch nicht in der Lage, eine adäquate Pumpfunktion im Verhältnis zum totalen peripheren Widerstandsverlust aufrechtzuerhalten. Die hierfür aktuell diskutierten Mechanismen sollen hier im Folgenden vorgestellt werden (Flynn et al., 2010).

1.5.1 Physiologie des kontraktiles Apparates in Kardiomyozyten

Die kleinste kontraktile Einheit des Kardiomyozyten ist das Sarkomer. Es besteht aus dicken und dünnen Filamenten, wobei die dicken Filamente aus Myosin gebildet werden. Die dünnen Filamente bestehen aus Monomeren von Aktin, welche zum Aktinfilament polymerisieren. Die Aktinfilamente sind an der Z-Scheibe verankert.

Nach Depolarisation der Kardiomyozyten öffnen sich L-Typ Kalzium-Kanäle und sorgen für einen langsamen Kalziumeinstrom in die Zelle (Schwartz et al., 2001). Dieser geringe Kalziumeinstrom genügt, um über die Öffnung Ryanodinrezeptoren für eine massive Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum zu sorgen (Kan und Finkel, 2003). Durch die Bindung von Kalzium an Troponin C wird die Bindungsstelle für den Myosinkopf an Aktin, welche vorher durch Tropomyosin blockiert wurde, freigelegt und der Kontraktionsvorgang kann beginnen. Die Kontraktion wird durch die Entfernung von Kalzium aus dem Cytosol terminiert. Hierzu dient hauptsächlich die Kalzium-ATPase, welche unter Energieverbrauch Kalzium zurück in das sarkoplasmatische Retikulum transportiert. Sie wird durch Phospholamban reguliert. Ausserdem werden kleinere Mengen Kalziums mittels eines Natrium-Kalzium-Austauschers aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum gepumpt.

1.5.2 Schädigung von Kardiomyozyten während der Sepsis

Eine inadäquate Pumpfunktion lässt zunächst an eine Schädigung des kontraktiven Apparates der Kardiomyozyten während einer Sepsis denken. Dieser Verdacht wurde durch Studien erhärtet, die eine Steigerung der Plasmakonzentrationen von Troponin in septischen Patienten demonstrieren konnten (Wu, 2001). Es konnten jedoch keine kardialen Nekrosen bei Patienten, die an einem septischen Schock verstarben nachgewiesen werden (Lanone et al., 2000; Rabuel und Mebazaa, 2006). Dies lässt vermuten, dass die Freisetzung von Troponin auf transiente Membraninsuffizienzen der Kardiomyozyten zurückzuführen ist. Ausserdem scheint die Kontraktilitätsreduktion nicht in einem direkten Zelluntergang begründet zu liegen, vielmehr scheinen subzelluläre Mechanismen hierfür verantwortlich zu sein. So scheint insbesondere die intrakardiale Freisetzung von NO eine entscheidende Rolle für eine Kontraktilitätsreduktion des Kardiomyozyten während einer Sepsis zu spielen (Baumgarten et al., 2006).

1.5.3 Zirkulierende kardiodepressive Faktoren

Neben der Hypothese, dass eine direkte Zellschädigung für die Störung der Kontraktilität verantwortlich sei, wurde die potenzielle Rolle von kardiodepressiven Substanzen, welche im Blutkreislauf septischer Patienten zirkulieren sollten untersucht (Glenn et al., 1971). So konnte gezeigt werden, dass eine Inkubation von Kardiomyozyten der Ratte mit dem Serum septischer Patienten zu einem signifikanten Kontraktilitätsverlust in diesen murinen Zellen führte (Parrillo et al., 1985). Spezifischer noch konnte *in vitro* das kardiodepressive Potenzial der Ent-

zündungsmediatoren $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ sowie des Komplementfaktors C5a nachgewiesen werden (Finkel et al., 1992; Kumar et al., 1996; Niederbichler et al., 2006). Diese sind jedoch nicht nur im Serum septischer Patienten erhöht, sondern Kardiomyozyten sind in diesem Zusammenhang selbst in der Lage diese zu bilden (Maass et al., 2002; Carlson et al., 2005). Daher scheinen nicht nur zirkulierende Faktoren eine wichtige Rolle für den Kontraktilitätsverlust von Kardiomyozyten während einer Sepsis zu spielen, sondern Kardiomyozyten könnten selbst einen entscheidenden Beitrag hierzu leisten.

1.5.4 Kalziumhaushalt und Myofilamente

Während einer Sepsis verändert sich die Kalziumhomöostase auf zwei verschiedene Weisen. Zum einen konnten veränderte myokardiale Kalziumflüsse sowohl in endotoxämischen Meeresschweinchen als auch Rattenkardiomyozyten, welche mit $\text{IL-1}\beta$ *in vitro* inkubiert wurden, gefunden werden (Liu und Schreur, 1995). Dies korrelierte mit einer Herabregulation von kardialen L-Typ Kalziumkanälen und einer nachgeschalteten Verringerung der Kalziumfreisetzung durch den Ryanodinrezeptor (Patel et al., 2000). Hierdurch nimmt die Kontraktilität direkt ab.

Zum anderen kann einmal in das Zytosol freigesetztes Kalzium nur noch verzögert wieder in das sarkoplasmatische Retikulum aufgenommen werden, da die Funktion der Kalzium-ATPase während einer Sepsis deutlich reduziert zu sein scheint (Dong et al., 2001; Wu, 2001).

1.6 Angeborene Immunität und Toll-like Rezeptoren

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie des Organismus gegen krankheitsauslösende Pathogene dar. Es besteht aus verschiedenen zellulären und humoralen Elementen, die Pathogene bereits wenige Minuten nach deren Eindringen in den Organismus effektiv attackieren können.

Zur zellulären Komponente der angeborenen Immunität werden z. B. Makrophagen und neutrophile Granulozyten gezählt, zur humoralen Komponente z. B. das Komplementsystem. Beiden Komponenten ist gemeinsam, dass sie spezifisch Strukturen, sog. „pattern associated molecular patterns (PAMP)“ auf Pathogenen erkennen können und hierdurch eine Immunantwort ausgelöst wird. Die Spezifität zur Erkennung der PAMPs wird keimbahncodiert vererbt, weshalb als PAMPs ausschließlich Strukturen in Frage kommen, die bei einer Vielzahl von Pathogenen in gleicher Weise vorgefunden werden und darüber hinaus müssen diese Strukturen konstant und in-

variabel von diesen exprimiert werden. Die Erkennung dieser Muster durch Zellen des angeborenen Immunsystems erfolgt dann über Mustererkennungsrezeptoren, sog. „pattern recognition receptors (PRR)“ (Nathan, 2006). Diese müssen zuverlässig zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen unterscheiden können, um eine schädliche Autoimmunreaktion zu verhindern.

Prinzipiell können nach Erkennung eines Pathogens durch einen PRR verschiedene Reaktionen ausgelöst werden. Hierzu zählen Opsonierung, Aktivierung der Komplement- und Gerinnungskaskade, die Induktion der Apoptose, die Regulierung co-stimulatorischer Moleküle sowie letztlich die Aktivierung der adaptiven Immunantwort (Janeway und Medzhitov, 2002). Die angeborene Immunität verfügt über eine breite Diversität von PRR, wobei unterschiedliche PRR in der Lage sind, verschiedenartige Immunantworten auszulösen.

1.6.1 Toll-like Rezeptoren

Der Name dieser Rezeptorfamilie leitet sich von dem Protein „Toll“, welches erstmals bei *Drosophila melanogaster* beschrieben wurde, ab. In dieser Spezies wurde es zunächst als Genprodukt charakterisiert, welches für die Anlage der dorso-ventralen Achse der Embryos eine entscheidende Rolle spielt, sowie eine Resistenz gegen Pilz- und gram-positive Infektionen vermittelt (Akira et al., 2006). Inzwischen sind auch bei Säugetieren eine Reihe verschiedener Toll-like Rezeptoren nachgewiesen worden (Iwasaki und Medzhitov, 2004).

Biochemisch handelt es sich bei TLR um Glykoproteine, die entweder auf der Zelloberfläche, in endozytotischen Vesikeln oder intrazellulären Organellen exprimiert werden. Sie bestehen aus einer Ektodomäne aus LRR, die direkt oder mit Hilfe von Adaptermolekülen für die Ligandenbindung verantwortlich ist, gefolgt von einer intrazellulären TIR-Domäne, die die intrazelluläre Signaltransduktion durch die Kopplung an TIR-Domänen enthaltende Adaptermoleküle vermittelt (Kawai und Akira, 2006; Meylan und Tschopp, 2006). Alle TLR, mit der Ausnahme von TLR3, vermitteln nach der Bindung ihres Liganden eine NF κ B-abhängige Zytokininduktion über das gemeinsame Adaptermolekül MyD88. TLR3 verwendet für diese Zytokininduktion das Adaptermolekül TRIF. Die Aktivierung dieser Signaltransduktionskaskaden erfolgt durch ligandenspezifische Aktivierung einzelner TLR. Hierbei wird ein breites Spektrum konservierter Muster von Partikeln erkannt, die eine Infektion mit Pathogenen signalisieren. So erkennen die TLR1, -2, -4, -5 und -6 Bestandteile bakterieller Membranen wie z. B. Lipoproteine, Peptidoglykan, Lipoteichonsäure, Lipopolysaccharid oder Flagellin sowie Bestandteile ver-

schiedener Fungi (Alexopoulou et al., 2002; Cook et al., 2004; Gewirtz et al., 2001; Hawn et al., 2003; Ozinsky et al., 2000; Poltorak et al., 1998; Takeuchi et al., 2001; Takeuchi et al., 2002). Die TLR3, -7, -8 und -9 erkennen Nukleinsäuresequenzen verschiedener Pathogene. Da hierfür zunächst die umgebenden Zellstrukturen der Pathogene zerstört werden müssen, sind diese Rezeptoren in der Zellmembran des Endosoms lokalisiert (Heil et al., 2003; Latz et al., 2004; Lee et al., 2003, Matsumoto et al., 2003). Die verschiedenen TLR und ihre Liganden sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Rezeptor	Ligand	Herkunft des Liganden
TLR1	Lipopeptide	Bakterien
TLR2	Lipoproteine Peptidoglykan Zymosan Pam3Cys	Verschiedene Pathogene Gram-positive Bakterien Pilze Synthetisch
TLR3	dsRNA polyIC	Viren Pilze
TLR4	LPS	Gram-negative Bakterien
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6	Zymosan	Pilze
TLR7	ssRNA 9.2 s RNA Imidazochinolin	Viren Synthetisch Synthetisch
TLR8	ssRNA Imidazochinolin	Viren Synthetisch
TLR9	DNA CpG DNA	Bakterien, Viren Synthetisch

Tab. 1: Hier sind die TLR 1-9 mit ihren wichtigsten Liganden dargestellt. Ätiologisch finden sich für die einzelnen TLR hochkonservierte Ligandenstrukturen von Bakterien, Viren und Pilzen. Inzwischen gibt es jedoch eine Vielzahl von synthetisch generierten TLR-Liganden, von denen einige exemplarisch in dieser Tabelle aufgeführt sind

1.6.2 Signaltransduktion nach TLR-Aktivierung

Die intrazelluläre Signalweiterleitung erfolgt nach Bindung des Liganden an den TLR bei allen Rezeptoren außer TLR3 durch die Rekrutierung des Adaptermoleküls MyD88, welches an den zytoplasmatischen Anteil des aktivierten TLR bindet (Takeda et al., 2003). Darüber hinaus können auch noch andere Adaptermoleküle wie TIRAP oder TRAM zusammen mit MyD88 an den aktivierten Rezeptor binden (Bell et al., 2005; Gay et al., 2006). Über verschiedene Zwischenmoleküle, in erster Linie Kinasen, erfolgt letztlich die Aktivierung von NF κ B. Dieser Transkriptionsfaktor transloziert nach seiner Aktivierung in den Nukleus und induziert dort die Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine, die für die Regulation der Immunantwort essentiell sind (Moynagh, 2005; Meylan et al., 2006). Der Signalweg der TLR ist in Abbildung 3 dargestellt.

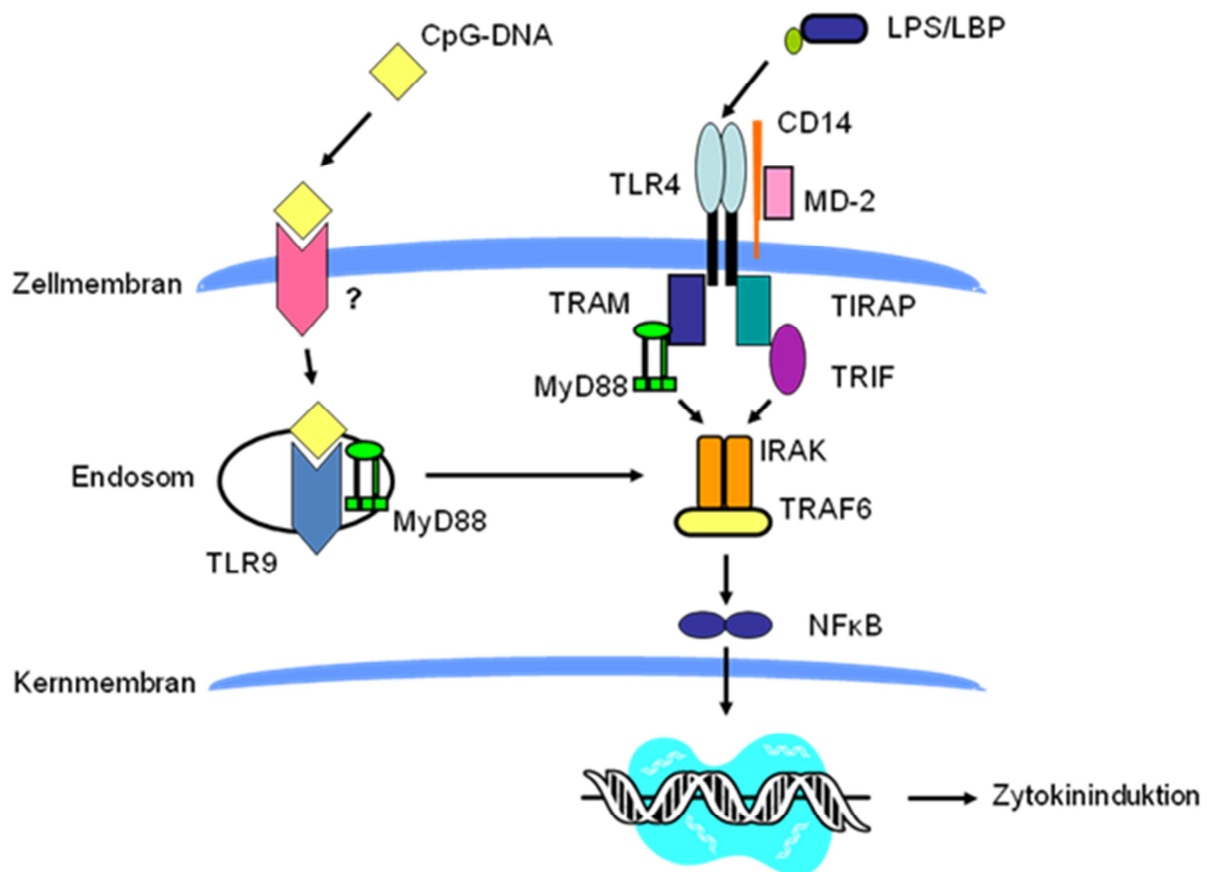


Abb 3: Dargestellt ist exemplarisch die Signaltransduktion des TLR4 und TLR9. So muss LPS zur Erkennung durch den Rezeptorkomplex TLR4, CD-14 und MD-2 an LBP gebunden sein. Anschließend wird über verschiedene intrazelluläre Signaltransduktionsproteine das Molekül MyD88 aktiviert, das die gemeinsame Endstrecke aller TLR außer TLR3 darstellt. Dieses führt zu einer Aktivierung von NFκB, einem Transkriptionsfaktor, der letztlich für die Zytokininduktion verantwortlich ist. Im Gegensatz zur TLR4, der auf der Zelloberfläche exprimiert wird, ist der TLR9 endosomal lokalisiert. Die genauen Mechanismen, wie die polare bakterielle DNA über die Zellmembran internalisiert wird, sind aktuell noch nicht vollständig verstanden. Diskutiert wird die Beteiligung von Chemokinrezeptoren. Jedoch unterscheiden sich die nach Bindung des Liganden an seinen Rezeptor ablaufenden Signaltransduktionsprozesse nicht wesentlich von denen membranständiger TLR

1.6.3 Toll-like Rezeptoren und septische Kardiomyopathie

Wie bereits dargestellt erkennen Zellen des angeborenen Immunsystems pathogene Keime mit Hilfe von TLR und initiieren eine Immunantwort. In den letzten Jahren zeigte sich jedoch, dass nicht nur immunkompetente Zellen TLR exprimieren, sondern auch ortständige, kardiale Gewebezellen mit TLR ausgestattet sind und in der Lage sind Immunreaktionen auszulösen (Frantz et al., 1999; Frantz et al., 2001; Frantz et al., 2007).

Für die Entwicklung einer kardialen Dysfunktion während einer Sepsis scheinen diese TLR eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass Mäuse, welche für den LPS- Ko-rezeptor CD-14 defizient sind, keine kardiale Inflammation und Dysfunktion nach intra-peritonealer LPS-Administration entwickeln (Knuefermann et al., 2002). Dies spiegelte sich zum einen in signifikant reduzierten kardialen Inflammationsparametern wie TNF α und IL-1 β wider, zum anderen in verbesserten funktionellen Parametern des linken Ventrikels. Jedoch konnte nicht nur für den Pathogenitätsfaktor LPS eine wichtige Bedeutung des angeborenen Immunsystems bei der Entwicklung einer septischen Kardiomyopathie nachgewiesen werden. Ähnliche Befunde zeigten sich bei der Untersuchung des kardiodepressiven Potenzials von bakterieller DNA. So führte die Applikation von CpG-Motiven in WT-Mäusen zu einer kardialen Inflammation und konsekutiv zu einer reduzierten Kontraktilität der Kardiomyozyten. TLR9-D Tiere hingegen waren vor diesen negativen Auswirkungen geschützt (Knuefermann et al., 2008). Diese Arbeiten stützen somit die These, dass nicht nur die von immunkompetenten Zellen gebildeten zirkulierenden Zytokine zu einer Kardiodepression während einer Sepsis führen, sondern der Kardiomyozyt selbst in der Lage ist, bakterielle Fragmente zu erkennen und mit der Bildung proinflammatorischer Mediatoren zu antworten. Darüber hinaus scheinen herzständige TLR an der Entstehung des septischen Herzversagens unmittelbar beteiligt zu sein.

1.7 Tiermodelle

Um das Krankheitsbild der Sepsis besser verstehen zu können, werden bereits seit Jahrzehnten verschiedene Tiermodelle verwendet, die je nach ihrem Design bestimmte Aspekte der Pathomechanismen dieses Krankheitsbildes darstellen sollen. Zur Ermittlung der Bedeutung einzelner TLR für die Entstehung und den Verlauf der Sepsis wurden bereits viele verschiedene Studien mit TLR-Liganden (LPS, LTA, CpG-Oligonukleotide ect.) durchgeführt, welche den Tieren i.v. oder i. p. appliziert wurden. Diese Untersuchungen konnten den Einfluss und die Bedeutung einzelner bakterieller Komponenten für das septische Krankheitsbild belegen und zeigen, dass das angeborene Immunsystem und seine PRR eine wichtige Rolle hierbei zu spielen scheinen. Insbesondere die Applikation von LPS wird aktuell noch weit verbreitet zur Sepsisinduktion *in vivo* verwendet. Jedoch konnten für dieses Verfahren bereits einige Schwächen bezüglich seiner klinischen Relevanz gezeigt werden: So stellte sich heraus, dass das durch LPS-Injektion hervorgerufene Zytokinprofil in den Versuchstieren nicht auf den septischen Patienten in einer ICU übertragbar ist. Bei septischen Patienten zeigten sich deutlich spätere Zytokinmaxima von TNF α ,

IL-6 und CXC Chemokinen als in den mit LPS behandelten Versuchstieren (Remick et al., 2000; Cavaillon et al., 2003). Diese Ergebnisse sind der Tatsache geschuldet, dass die LPS-Applikation zwar ein realistisches Bild der Endotoxinämie zeichnet, jedoch reale Patienten im Rahmen einer Infektion nicht nur mit einem spezifischen Zellwandbestandteil als Pathogen, sondern mit vitalen Bakterien zu kämpfen haben. Diese bestehen aus vielen verschiedenen Pathogenitätsfaktoren und oftmals findet sich nicht nur ein einzelner Keim, sondern eine poly-mikrobielle Mischinfektion bei den Patienten.

Andere Modelle verwenden zu Sepsisinduktion vitale Bakterien. Diese können ebenfalls i.v. oder i.p. appliziert werden und sind gut steuerbar, da eine genau definierte Anzahl von CFU appliziert werden kann. Leider wiesen die meisten dieser Modelle deutlich von der Realität abweichende Mortalitätsraten von teils nur 20 % auf (Ghiselli et al., 2004). Die Ursache hierfür liegt in einer häufigen Abszessbildung bei i.p. Applikation mit konsekutivem Ausbleiben einer diffusen Peritonitis. Werden die Bakterien hingegen i. v. appliziert spiegelt dies insbesondere die Frühphase der Sepsis in menschlichen Patienten nur mangelhaft wider, da sich hier oftmals nur sehr geringe Menge vitaler Bakterien im Blut im Sinne einer Bakteriämie nachweisen lassen.

Um dieser Problematik zu begegnen gilt aktuell die CLP-Methode als Goldstandard zur Sepsisinduktion im Tiermodell. Hierbei wird das Caecum der Versuchstiere abgebunden und anschließend perforiert, was den Austritt von Faeces in die Bauchhöhle nach sich ziehen soll. In der Folge entsteht eine Peritonitis durch ein polymikrobielles Erregerspektrum. Jedoch konnten aktuelle Studien belegen, dass dieses Modell ebenfalls stark zu einer intraabdominellen Abszessformierung neigt und eine diffuse Peritonitis oftmals nicht erreicht wird (Maier et al., 2004). Es konnte jedoch bereits hinreichend gezeigt werden, dass die Ausbreitungsweite vitaler Bakterien in der Peritonealhöhle einen entscheidenden prognostischen Faktor für das Outcome der Sepsis darstellt. Deshalb wurde das CASP-Modell als eine potenzielle Verbesserung des CLP-Modells zur realistischen Simulation einer diffusen Peritonitis entwickelt (Traeger et al., 2010). Hierbei stellt ein in den aufsteigenden Teil des Kolons implantierter Stent eine kontinuierliche Verbindung zwischen Darmlumen und Peritonealhöhle her. Dies wiederum soll eine zeitabhängige, gleichmäßige Verteilung vitaler Bakterien intraabdominell gewährleisten. Es konnte gezeigt werden, dass im CASP-Modell operierte Versuchstiere im Vergleich zu CLP-Tieren zum gleichen Zeitpunkt post-OP eine signifikant höhere intraperitoneale Bakterienlast aufwiesen. Daher ist davon auszugehen, dass das CASP-Modell das suffizientere Verfahren zur re-

alitätsnahen Abbildung einer Sepsis ist. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit das CASP-Modell zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis eingesetzt.

1.8 Forschungsziele der Arbeit

- 1) Zunächst wurde untersucht, ob das CASP-Modell entsprechend bisherigen Hinweisen in der Literatur durch die Ausbildung einer diffusen Peritonitis als suffizientes Sepsismodell anzusehen ist. Hierzu sollte durch Peritoneallavagen evaluiert werden, ob eine im Zeitverlauf kontinuierlich ansteigende Bakterienzahl in der Peritonealhöhle nach Stentimplantation festgestellt werden konnte.
- 2) Darüber hinaus wurde untersucht, ob sich durch eine polymikrobielle Infektion der Bauchhöhle eine kardiale Inflammation in den Versuchstieren auslösen ließ und sich ggf. ein spezifisches, zeitabhängiges Zytokinprofil ableiten ließ. Hierzu erfolgte die Bestimmung der kardialen Zytokinspiegel mittels qRT-PCR und ELISA zu den Zeitpunkten 6, 18, 24 und 36 h nach CASP-OP. Ausserdem sollte untersucht werden, ob auch eine Regulation von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zu den genannten Zeitpunkten erfolgte.
- 3) Es wurde evaluiert, ob sich durch CASP-Operation eine hämodynamisch relevante septische Kardiomyopathie induzieren ließ. Hierzu wurden 18 h nach Sepsisinduktion mit einem Druck-Volumen-Katheter linksventrikuläre Pumpfunktionsparameter aufgezeichnet.
- 4) Es wurde analysiert, ob die durch eine polymikrobielle Sepsis ausgelöste kardiale Inflammation und Dysfunktion TLR-abhängig vermittelt wird. Hierzu wurden TLR-D Tiere ebenfalls einer CASP-Operation unterzogen und die kardiale Inflammation mittels qRT-PCR und ELISA bzw. die kardiale Funktion mittels Druck-Volumen Katheter bestimmt.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Es wurden Wildtyp- (WT; C57BL/6, Charles River Laboratories) und TLR-defiziente (TLR2-D, TLR4-D und TLR9-D) Mäuse verwendet, wobei die TLR-D Tiere als Brutpaare freundlicherweise von Professor Shizuo Akira (Osaka University, Japan) zur Verfügung gestellt wurden. Das Alter der Versuchstiere betrug 10-12 Wochen mit einem Körpergewicht zwischen 23-25 g.

Die Erzeugung der transgenen Mauslinien erfolgte durch homologe Rekombination an embryonalen Stammzellen von C57BL/6 Mäusen. Den TLR-defizienten Tieren fehlte das jeweilige Gen sowohl in den Gewebezellen, als auch in den im Knochenmark stetig neu gebildeten und im Blut zirkulierenden, immunkompetenten Zellen. Der Defizienznachweis wurde mit einer Genotypisierung geführt.

Die Versuchstiere wurden in dafür speziell ausgestatteten Räumlichkeiten des Hauses für Experimentelle Therapie des Universitätsklinikums Bonn sowohl prä- als auch postoperativ untergebracht. Diese waren vollklimatisiert und durchliefen einen 12 Stunden Tag-Nacht Rhythmus. Futter und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

Alle in dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche sind behördlicherseits geprüft und genehmigt worden (LANUV).

2.2 Genotypisierung von transgenen Mäusen

In dieser Arbeit wurden ausschließlich homozygot TLR-defiziente Tiere verwendet. Die Genotypisierung erfolgte aus genomischer DNA, die aus den Spitzen der Mausschwänze isoliert wurde, mit Hilfe der Polymerase Chain Reaction (PCR). Die Isolation der genomischen DNA erfolgte strikt nach Anleitung des DNeasy Tissue Kits (Qiagen, Hilden Deutschland). Zum Screening wurden die folgenden Primer nach Anleitung von Professor Shizuo Akira verwendet:

Primer 1: „wild-type“ oder „neo1500“

Primer 2: “extra”

Für die Genotypisierungen wurden folgende PCR-Ansätze angesetzt (Tabelle 2):

PCR-Ansatz	Volumen [μ l] pro Ansatz
10 x PCR buffer	3
50 mM MgCl ₂	2,5
Betaine (5 M)	10
Primer 1	0,5
Primer 2	0,5
Aqua dest.	5,9
2,5 mM dNTP-Mix	2,4
Taq-Polymerase	0,2
DNA aus Isolation	5
Gesamtvolumen pro Ansatz	30

Tab. 2: Dargestellt ist die exakte Zusammensetzung des Mastermixes, der zur Genotypisierung der transgenen Versuchsmäuse verwendet wurde

Für die Genotypisierung der TLR9-D Tiere wurden folgende Primersequenzen verwendet:

1. „wild type“: 5'-GAA GGT TCT GGG CTC AAT GGT CAT GTG-3'

- spezifisch für das unveränderte TLR9-Gen

2. „neo1500“: 5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3'

- spezifisch für eine Neomycin-Resistenz-Kassette im veränderten TLR9-Gen

3. „extra“: 5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3'

- Bereich außerhalb des veränderten Bereiches in entgegengesetzter Richtung zu „wild-type“ und „extra“

Die mutierten Allele wurden durch die Primerkombination „neo1500“ und „extra“ detektiert, die WT-Allele durch die Kombination der Primer „wild-type“ und „extra“. Die Amplifikation des zu untersuchenden Genprodukts erfolgte mit einem Thermocycler Whatman Biometra T-Gradient 96 (Biometra, Göttingen, Deutschland).

In 35 Zyklen wurde folgendes Programm durchgeführt:

1. + 94 °C für 30 s
2. + 67 °C für 60 s
3. + 74 °C für 60 s

Beim letzten Zyklus wurde die Proben für 10 Minuten bei + 74 °C inkubiert, bevor sie zur Aufbewahrung bei + 4 °C gekühlt wurden. Nach Zugabe des Ladepuffers wurden die amplifizierte Genprodukte, die eine Länge von etwa 1200 bp aufwiesen, in einem 1 %igem Agarose-Gel bei 100 V für 45 min aufgetrennt.

Für die Genotypisierung der TLR2-D Tiere wurden folgende Primersequenzen verwendet:

1. „a“ : 5´-GTT TAG TGC CTG TAT CCA GTC AGT GCG-3´
- spezifisch für das unveränderte TLR2 Gen
2. „b“: 5´- TTG GAT AAG TCT GAT AGC CTT GCC TCC-3´
- Bereich außerhalb des veränderten Bereiches in entgegengesetzter Richtung zu „a“ und „b“
3. „c“: 5´- ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC GAG-3´
- spezifisch für eine Neomycin-Resistenz-Kassette im veränderten TLR2-Gen

Der PCR-Ansatz sowie das Amplifikationsprotokoll unterschieden sich bis auf die Primer nicht von dem o. g. Verfahren für die TLR9-D Versuchstiere. Die amplifizierte Genprodukte wiesen hierbei eine Länge von 900 bp auf und wurden ebenfalls in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt.

Für die Genotypisierung der TLR4-D Tiere wurden folgende Primersequenzen verwendet:

4. „a“ : 5´-CGT GTA AAC CAG CCA GGT TTT GAA GGC -3´
- spezifisch für das unveränderte TLR4-Gen
5. „b“: 5´-TGT TGC CTT TCA GTC ACA GAG ACT CTG -3´
- Bereich außerhalb des veränderten Bereiches in entgegengesetzter Richtung zu „a“ und „b“

6. „c“: 5´-TGT TGG GTC GTT TGT TCG GAT CCG TCG -3´

- spezifisch für eine Neomycin-Resistenz-Kassette im veränderten TLR4-Gen

Die amplifizierten Genprodukte wiesen hierbei eine Länge von 1100 bp auf und wurden ebenfalls in einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt.

2.3 CASP-Operation

Jedes Versuchstier wurde unmittelbar vor der Operation gewogen, um sicherzustellen, dass alle Tiere in einer Gewichtsklasse von 23-25 g lagen. Anschließend erfolgte die Narkoseeinleitung in einer Plexiglaskammer durch den Einstrom des volatilen Inhalationsnarkotikums Isofluran (Forene, Abbott, Wiesbaden). Nach der Narkoseeinleitung wurde die Maus aus der Kammer entnommen und auf einer auf 37° Celsius vorgeheizten Wärmeplatte in Rückenlage fixiert. Zur Aufrechterhaltung der Narkose während der OP wurde dem Versuchstier bei erhaltener Spontanatmung über einen vor die Nase vorgelegten Plastikschlauch 2,5 l Sauerstoff/min und 2 Vol % Isofluran appliziert. Die Feststellung einer ausreichenden Narkosetiefe erfolgte durch das gezielte Setzen eines Schmerzreizes (tail-pinch) und dem Ausbleiben einer schmerzbedingten Reaktion.

Es folgte die Vorbereitung des Operationsfeldes durch eine schonende Entfernung der Bauchbehaarung mit handelsüblicher Enthaarungscreme und Wattestäbchen. Auf eine Rasur wurde bewusst verzichtet, um ein zusätzliches Trauma, welches zu einer Zytokininduktion führen könnte, zu vermeiden. Im Anschluss erfolgte eine großzügige Hautdesinfektion mit Betaisadonna-Lösung (Mundipharma GmbH, Limburg) im Operationsbereich.

Durch eine ca. 1,5 cm lange mediale Inzision der Haut wurde nun der M. rectus abdominis freigelegt und die Linea alba dargestellt. Entlang dieser erfolgte auf einer Länge von ca. 1 cm die Eröffnung der Bauchhöhle. Mit zwei sterilen Wattetupfern wurde nun das Caecum aufgesucht und zusammen mit dem terminalen Ileum und dem aufsteigenden Teil des Colons herausluxiert und auf der sterilisierten Bauchfläche des Tieres gelagert. 1 cm oberhalb des Ileozökalpols wurde das Colon ascendens antimesenterial mit einem monofilen 7/0 Faden (Ethicon, Prolene, Norderstedt) durchstoßen und ein Knoten wurde gelegt. Ein 18 G Venenverweilkatheter (Braun, Vasofix, Melsungen) diente zur Punktion des Colons unmittelbar oral der gelegten Naht. Nach der sicheren intraluminalen Lage des Venenverweilkatheters wurde der Stahlmandrin vorsichtig zurückgezogen und der Plastikschlauch wurde zur Fixierung mit 7/0 Faden an der Darmwand

vernäht. Anschließend wurde er mit einer Schere knapp über der Serosa abgeschnitten und durch vorsichtige taktile Manipulation des Colons mit Faeces gefüllt. Danach erfolgte die Reposition der ausgeschwenkten Darmabschnitte in die Bauchhöhle mit zwei sterilen Wattetupfern. Mit 5/0 Faden wurden sowohl der Muskel als auch die Haut sauber verschlossen. Zur Analgesie erhielten die Tiere am Ende des Eingriffs noch eine subkutane Injektion von 0,1 mg/kg KG Buprenorphin (Temgesic®, Essex Pharma, Grünenthal) zusammen mit 20 ml/kg KG NaCl zwecks Volumensubstitution.

2.4 Bakterienkulturen

Für die Erfolgskontrolle der Sepsisinduktion wurden Bakterienkulturen aus einer Peritoneallavage angelegt. Hierzu wurden die Tiere wie beschrieben zu den Zeitpunkten 0, 6, 18, 24 und 36 h nach CASP-OP narkotisiert und die Bauchhöhle über die OP-Naht eröffnet. In eine 5 ml Spritze wurde auf Körpertemperatur vorgewärmtes, autoklaviertes PBS gefüllt und auf den Konus der Spritze ein Venenverweilkatheter ohne Stahlmandrin aufgesetzt. Dies geschah, um bei der fraktionierten Injektion des PBS keine Verletzungen der Darmschlingen zu verursachen.

Mit einer zweiten 5 ml Spritze, ebenfalls mit dem Plastikschlauch des Venenverweilkatheters bestückt, wurde das kurz im Bauchraum geschwenkte PBS aspiriert.

Es wurde sorgfältig auf die Sterilität aller verwendeten Materialien und Oberflächen geachtet.

Das so gewonnene bakterienhaltige PBS wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einem Vortex schonend durchmischt. Anschließend wurde 1 ml in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Verdünnungsreihe mit den Faktoren 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 angelegt. Mit je 50 µl dieser Verdünnungen wurden nun MacCONKEY und Columbia-Agarplatten mit Colistin Sulfat und Nalidixin Säure (CNA) beimpft und im Anschluss daran für 48 h bei 37,5° C bebrütet. Dabei galt MaCONKEY-Agar als selektiv für gram-negative Erreger und Columbia-Agar durch den Zusatz von CNA als selektiv für gram-positive Bakterien.

Danach konnten die CFUs ausgezählt und der Erfolg der Sepsisinduktion dokumentiert werden.

Nach der Probenentnahme für die Bakterienkulturen durch die Peritoneallavage wurden den Versuchstieren die Herzen für die nachfolgenden molekularbiologischen Analysen entnommen.

2.5 RNA Isolation

Da RNA sehr instabil ist, wurden alle im Folgenden beschriebenen Schritte auf Eis durchgeführt und alle hinzugefügten Reagenzien hatten Temperaturen zwischen -20°C und $+4^{\circ}\text{C}$.

In 15 ml Falcontubes wurden 3 ml TRIzol (Invitrogen, Paisley, Scotland, UK) pipettiert und die auf flüssigen Stickstoff gelagerten Organproben wurden hinzu gegeben. Die Organe wurden in der Lösung mit einem Gewebehomogenisator (Ultra-Turrax TP 18-10 Janke & Kunkel KG, Stauffen im Breisgau, Deutschland) homogenisiert. Um eine Kontamination der Proben mit Gewebsresten oder RNAsen zu vermeiden, erfolgte eine Reinigung des Homogenisators mit 4 M GIT und 0,1 % DEPC-Wasser vor und nach jedem Gebrauch. Anschließend wurden 600 μl Chloroform in die Probenröhrchen pipettiert und mit einem Vortex Genie (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) schonend durchmischt. Es schloss sich eine 10 min. Inkubationsphase an, nach welcher die Proben in einer auf -9°C vortemperierten Zentrifuge (Zentrifuge CPKR, Beckman Instruments GmbH, München, Deutschland) für 30 min. bei 4000 U/min zentrifugiert wurden. Es bildeten sich drei übereinander geschichtete Phasen.

In der obersten, wässrig- klaren Phase befand sich die RNA, die nach vorsichtigem Abpipettieren in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß überführt wurde. Hier erfolgte nun die Zugabe von 2 ml Isopropanol zur Ausfällung der RNA. Nach dem Durchmischen der Lösung wurde diese für 10 min. inkubiert und anschließend 20 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Es bildete sich ein Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes, welches nach vorsichtigem dekantieren des Isopropanols mit 6 ml 75 % Ethanol (Merck) gewaschen wurde. Nach erneuter Inkubation schloss sich eine letzte Zentrifugation für 20 min bei 4000 U/min an.

Das nun am Boden des Reaktionsgefäßes haftende Pellet wurde, nachdem der Überstand aus Ethanol abpipetiert war, luftgetrocknet und danach in 50 μl 0,1 %-DEPC Wasser resuspendiert und in RNase freie 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Wesseling, Deutschland) überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

2.6 Reverse Transkription

Die aus den Organproben gewonnene RNA wurde zur späteren Analyse in komplementäre DNA (cDNA) durch Reverse Transkription umgeschrieben. Da eine quantitative Analyse mittels Real-Time PCR geplant war, musste zunächst eine Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben erfolgen, um zu gewährleisten, dass jedem Transkriptionsansatz die exakt gleiche Menge an RNA hinzugefügt wurde. Diese Bestimmung wurde mit Hilfe eines BioPhotometers 6131 (Eppendorf)

durchgeführt, indem die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt wurde. Aus der Ratio von 260/280 nm konnte ausserdem die Integrität der RNA abgeschätzt werden.

Für die Synthese der cDNA wurde jedem Ansatz 1 µg RNA hinzugefügt. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung eines Omniscript RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Ein Master-Mix aus folgenden Komponenten wurde angesetzt (Tabelle 3):

Komponente	Master-Mix einfach [µl]
10 x RT-PCR Buffer	2
dNTP-Mix (5 nmol jeweils)	2
Oligo-dT-Primer	2
Omniscript reverse Transkriptase	1
mRNA	variabel, mit RNase-free H ₂ O auf 13 µl aufgefüllt

Tab. 3: Zusammensetzung des Mastermix-Ansatzes für die Synthese der cDNA

Die Reverse Transkription wurde in einem Thermocycler (Biometra, Göttingen, Whatman Biometra T-Gradient 96) durch Inkubation der Proben bei +37° C für 60 min durchgeführt. Danach wurden die Proben noch im Thermocycler auf +4° C gekühlt und nach der Entnahme bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° C tiefgefroren.

2.7 Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)

Die aus der reversen Transkription erhaltenen cDNA wurde mit Hilfe der qRT-PCR analysiert. Dieses Verfahren erlaubte es, eine große Anzahl von Proben gleichzeitig und somit im direkten Vergleich zu analysieren.

Die qRT-PCR erfolgte mit dem TaqMan 7900 (Applied Biosystems, Kalifornien, USA) unter Verwendung von 384 Well Platten. Es wurden folgende kommerziell erhältliche Primersonden eingesetzt (Tabelle 4):

Primer-Sonde	Produkt-Nummer
mouse GAPDH (endogene Kontrolle)	Mm99999915_g1
mouse IL-1 β	Mm99999061_g1
mouse IL-6	Mm01210732_g1
mouse TNF- α	Mm00443258_m1
mouse TLR2	Mm01213945_g1
mouse TLR4	Mm00445273_m1
mouse TLR9	Mm00446193_m1
mouse CD14	Mm00438094_g1
mouse TREM1	Mm01278455_m1
mouse HMGB1	Mm00849805_gH
mouse CCR4	Mm99p99052_s1
mouse iNOS	Mm00440491_g1
mouse IL-10	Mm00439616_m1

Tab. 4: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten qRT-PCR Primer zur Detektion der aufgeführten Zielgene

Die Analyse für jede Probe erfolgte in einer Dreifachbestimmung (Triplett) für jedes einzelne Zielgen. Auf einer Platte wurden 16 Proben pro Zielgen gemessen, so dass ein Ansatz für 48 Wells (16 * 3) vorbereitet wurde. Dieser bestand aus folgendem Mastermix (Tabelle 5):

Komponente	Master-Mix einfach [μ l]	Master-Mix pro Versuch [μ l]
PCR Master-Mix (2 x)	5,0	280
RNase-free H ₂ O	3,5	196
Primer Sonde	0,5	28

Tab. 5: Mastermix-Zusammensetzung für die qRT-PCR

Die folgenden Pipettierschritte wurden alle auf Eis durchgeführt: Zunächst wurden die 48 Wells mit einer 8 Well Multiwellpipette mit je 9 μ l Mastermix beladen. Diese wurden im Anschluss mit je 1 μ l cDNA der zu untersuchenden Proben auf ein Gesamtvolumen von 10 μ l aufgefüllt. Dies bedeutete eine eingesetzte Analysemenge von 50 ng cDNA.

Die qRT-PCR wurde als relative $\Delta\Delta C_T$ -Studie durchgeführt. Dazu wurden insgesamt 40 Zyklen durchlaufen (Zyklus: 15 s. bei 95° C, 1 min. bei 50° C).

Als endogene Kontrolle wurde das mausspezifische, konstitutiv exprimierte Haushaltsgen (house-keeping gene) Glycerinaldehypphosphat-Dehydrogenase (mouse GAPDH) verwendet.

Die mRNA-Probe einer unstimulierten WT-Maus diente als Kontrolle zur Bestimmung des Relativen Quotienten (RQ).

Die Daten der qRT-PCR wurden mit der Software SDS 2.2 (Applied Biosystems) analysiert.

2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 wurde neben der mRNA ebenfalls die Proteinkonzentration (ng Zytokin pro mg Protein) bestimmt. Dies geschah, um mögliche Unterschiede zwischen der Transkription der Gene und der Proteinexpression zu detektieren.

Die Messung erfolgte in einer Zellsuspension, bestehend aus dem homogenisierten Gewebe und dem ELISA-Puffer, der aus folgenden Bestandteilen angesetzt wurde (Tabelle 6):

Lösung	Volumen [ml]
PBS (autoklaviert)	9,60
Protease-Inhibitor (Roche, Mannheim, Deutschland)	0,40
Triton X-100 (Sigma-Aldrich)	0,01
250 mM PMSF in Isopropanol gelöst	0,01

Tab. 6: Komponenten des zur Proteindetektion verwendeten ELISA-Puffers

Die gefrorenen Herzen wurden in 1 ml Puffer mit einem Gewebehomogenisator (Ultra-Turrax TP 18-10 Janke & Kunkel KG, Stauffen im Breisgau, Deutschland) mazeriert. Es folgte eine 15 min Inkubation auf Eis. Im Anschluss wurden die Zelltrümmer bei 13.000 U/min für 15 Minuten in einer auf 4° C gekühlten Zentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und aliquotiert. Die aufbereiteten Proben wurden bis zur Messung bei – 80° C gelagert.

Für die Bestimmung der Zytokin-Konzentrationen wurden folgende Quantikine® ELISA-Kits

der Firma R&D Systems GmbH (Wiesbaden, Deutschland) verwendet (Tabelle 7):

Zytokin	Katalog-Nummer
mouse IL-1 β	M6000B
mouse IL-6	MLB00B
mouse TNF- α	MTA00

Tab. 7: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten ELISA-Kits

Die Herstellung der Standards und die Einhaltung der Inkubationszeiten erfolgten nach Anleitung der Herstellerfirma. Die Waschritte der 96-Well-Platten wurde in 5 Zyklen mit einem Atlantis Microplate Washer V1.3 (Asys Hitech, Eugendorf, Österreich) durchgeführt. Nach Zugabe der „stop solution“ (Stopp-Lösung) wurde die Reaktion in den Wells beendet.

Parallel zur ELISA-Messung wurde die Proteinkonzentration in den zu untersuchenden Proben bestimmt, um die zu erwartenden Messergebnisse auf diese Weise zu normalisieren. Dabei wurde das PIERCE BCA-Kit (PIERCE, Rockford, USA) verwendet. Zur Herstellung des BCA-Reagenz wurden die Reagenzien A und B in einem Verhältnis von 50:1 vermischt. 2 μ l Zellsuspension wurden mit 998 μ l BCA-Reagenz (Probenverdünnung 1:500) für 30 Minuten bei + 37° C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 562 nm mit dem BioPhotometer 6131 (Eppendorf) gemessen. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors wurde die Proteinkonzentration der Proben [mg/ml] bestimmt.

Mit dem ELISA-Reader Asys EXPERT 96 (Asys Hitech) wurden die optischen Dichten der Proben photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Kontrollwellenlänge von 540 nm gemessen. Mit Hilfe der dazugehörigen Software zur Auswertung MIKROWIN 2000 V 1.0 (Asys Hitech) wurde eine Standardkurve in einer 4-Punkt-Auftragung erstellt. Die Sensivität des ELISA wurde vom Hersteller überprüft. Die minimal detektierbare Konzentration betrug 1,6 pg pro Milliliter. Signifikante Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen konnten vom Hersteller ausgeschlossen werden. Aus den gemessenen, optischen Dichten der Proben im Zusammenhang mit ihren Proteinkonzentrationen wurde automatisch die Zytokin-Konzentration [ng pro mg Protein] bestimmt.

2.9 Druck-Volumen Katheter

18 h nach der CASP-OP wurden die hämodynamischen Parameter der Tiere bestimmt, um die Auswirkungen der induzierten polymikrobiellen Sepsis auf das Herz-Kreislaufsystem zu untersuchen. Dazu wurde ein in den linken Ventrikel eingebrachter Druck-Volumen Katheter (Millar Instruments Inc., Houston, Texas, USA) verwendet. Hierbei handelte es sich um einen 1,4 French Katheter aus Polyimid (SPR-839), ausgestattet mit einem Micromanometer und 4 Elektroden, welche der Leitfähigkeitsmessung dienten. Sie hatten einen Abstand von 4,5 mm, was der Distanz zwischen Apex und Aortenklappe der Mäuse entsprach.

Folgendes Setup wurde gewählt: Der Katheter wurde über je eine Druck- und einen Volumenanschluss mit dem MPVS-300 System (Millar Instruments) verbunden, wo eine Konditionierung der Signale stattfand, um eine Datenaquisition durchführen zu können. Hierzu wurden die Signale über analoge Inputs an einen PowerLab (ADInstruments GmbH, Spechbach, Deutschland) übertragen, der mit einem Computer verbunden war, auf dem die Daten mit Hilfe des Programms Chart 5.5.5 (Millar Instruments) visualisiert werden konnten.

Ca. 30 min vor Operationsbeginn wurde der Katheter in eine auf Körpertemperatur vorgewärmte, sterile, 0,9 %ige Kochsalzlösung eingelegt, um seine spätere Messumgebung zu simulieren. Die Narkoseeinleitung der Versuchstiere erfolgte wie unter 2.3 beschrieben. Um eine Auskühlung der Tiere und eine daraus resultierende Beeinflussung der Hämodynamik zu verhindern, wurde der Eingriff auf einer auf 37° C warmen Heizplatte durchgeführt. Die Narkose wurde bei einem Flow von 2 l O₂ pro Minute und 2 Vol % Isofluran aufrechterhalten. Isofluran wurde gewählt, weil es die geringsten kardiodepressiven Eigenschaften aufweist und somit die hämodynamischen Parameter am wenigsten beeinflusste.

Die Mäuse wurden auf dem Rücken liegend fixiert und die Haut wurde vom Unterkiefer bis zum Sternum inzidiert. Die Glandula parotis lag nun frei und konnte zu beiden Seite ausgeschwenkt werden. Unter dem Mikroskop erfolgte dann die Präparation der A. carotis. Diese wurde kranial abgebunden und nach kaudal vorsichtig mit einem 5/0 Faden umlegt, so dass durch Zug am kaudalen Faden eine reversible Abklemmung des Gefäßes erfolgen konnte. Es wurde strikt darauf geachtet, eine Kompression oder Verletzung des N. vagus zu vermeiden, um eine parasymphatische Verfälschung der Messergebnisse zu verhindern. Danach wurde die A. carotis mit einer Mikroschere inzisiert. Durch das entstandene Loch konnte nun der Druck-Volumen Katheter in das Gefäß eingebracht werden und nach dem Lösen des kaudalen Fadens wurde

dieser entlang des Gefäßes in den linken Ventrikel vorgeschoben. Als Kriterium für eine sichere intraventrikuläre Lage galt ein Abfall des enddiastolischen Blutdrucks auf annähernd 0 mmHg. Nun wurde die Narkose auf 1 Vol % Isofluran reduziert und die Aufzeichnung der Daten begann.

Die Druckdaten konnten mit dem Programm Chart 5.5.5 sofort auf dem PC ausgelesen werden. Die Volumendaten wurden jedoch nicht in einem absoluten Volumen (z. B. μl) angezeigt, sondern als relative Volumeneinheiten (RVU) ausgegeben. Dies lag darin begründet, dass über die Elektroden des Katheters nur eine Gesamtleitfähigkeit ermittelt werden konnte. Um das absolute Volumen zu bestimmen, musste noch eine Volumenkalibrierung erfolgen.

Das Prinzip des Leitfähigkeitskatheters beruht auf der Gleichung:

$$V = (L^2 / \sigma) * G$$

Hierbei ist V das absolute Volumen, L der Abstand zwischen den Elektroden, σ die Leitfähigkeit des Blutes und G die gemessene Gesamtleitfähigkeit.

L ist als Größe mit 4,5 mm durch die Konstruktion des Katheters vorgegeben.

Um σ zu bestimmen, wurden den Versuchstieren im Anschluss an die Messung mit einer heparinisierten Spritze Blut aus dem linken Ventrikel entnommen. Dieses wurde in einen auf Körpertemperatur vorgewärmten Plastikblock (Millar Instruments, P/N 910-1049) mit 6 zylindrischen Bohrungen überführt. Die Löcher hatten exakt definierte Durchmesser, so dass folgende Formel für die Bestimmung des absoluten Volumens zum Einsatz kommen konnte:

$$V = \pi * r^2 * L$$

Das Volumen war proportional zur Leitfähigkeit, was eine lineare Beziehung zueinander bedeutete, so dass es möglich war, mit der Küvettenkalibration eine Volumen-Kalibrations-Gerade zu konstruieren. Hierbei wurde das kalkulierte zylindrische Volumen gegen die gemessene Leitfähigkeit aufgetragen. Die Steigung und der y-Intercept konnten nun verwendet werden, um die RVUs in ein absolutes Volumen in μl umzurechnen.

Sowohl die Konstruktion der Geraden als auch die Umrechnung der RVUs erfolgten mit der Analysesoftware PVAN 3.6 (Millar Instruments).

In den Rohdaten war jedoch nicht nur die Leitfähigkeit des Blutes im linken Ventrikel enthalten, sondern auch die Leitfähigkeit der umgebenden Gewebe (Herz, Lunge ect.). Um diese Störgröße zu eliminieren, wurde den Versuchstieren im Verlauf der Messung eine hypertone, 10 %ige Kochsalzlösung als Bolus in die linke V. jugularis injiziert. Dies führte beim Einwaschen in den linken Ventrikel zu einem massiven Anstieg der Leitfähigkeit.

Aus diesem Anstieg konnte nun ein paralleles Volumen berechnet werden, welches dem Einfluss des umgebenden Gewebes entsprach und somit vom Gesamtvolumen abzuziehen war.

Dadurch war das tatsächliche, absolute Volumen im linken Ventrikel bestimmt und eine Verwendung der Volumendaten konnte erfolgen.

2.10 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der in den einzelnen Untersuchungen gemessenen Parameter erfolgte ebenso wie die graphische Darstellung der Ergebnisse mit dem Programm Prism 5.00 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Die numerischen Daten wurden entweder mittels unpaired *t*-Test oder bei Analysen, die mehr als nur zwei Gruppen implizierten, mittels 1 Way ANOVA und Newman-Keuls post-test Verfahren ausgewertet. P-Werte ≤ 0.05 wurden als statistisch signifikant angesehen und sind in den Graphiken mit einem * markiert. Die einzelnen zu untersuchenden Gruppen wiesen jeweils eine Stichprobengröße von $n \geq 8$ Versuchstieren auf.

3. Ergebnisse

3.1 Darmflora von WT- und TLR-D Tieren

Um die Suffizienz polymikrobieller Sepsismodelle zu belegen, sind mikrobiologische Analysen zwingend erforderlich. Da in diesem Projekt eine Sepsisinduktion durch die kontinuierliche Freisetzung von Darmbakterien erfolgte, wurde zunächst überprüft, ob WT- und TLR-D Mäuse sich grundsätzlich in der bakteriellen Zusammensetzung ihrer jeweiligen Darmflora unterschieden oder die Gruppen untereinander vergleichbar waren. Hierzu wurden Stuhlproben aus verschiedenen Darmkompartimenten (Ileum, Zäkum und Kolon) entnommen und anschließend zum Nachweis gram-positiver und gram-negativer Keime auf Columbia- und MacCONKEY-Agar für 48 h bei 37° C bebrütet. Es zeigte sich, dass sich WT-, TLR2-D und TLR9-D Mäuse bezüglich ihrer Darmflora nicht voneinander unterschieden und sowohl mit gram-positiven als auch gram-negativen Darmkeimen besiedelt waren (s. Kap. 3.5 Abb. 9). TLR4-D Tiere zeigten jedoch eine komplette Abwesenheit von gram-negativen Keimen in allen untersuchten Darmkompartimenten. Da gram-negative Keime eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Sepsis spielen, wurden TLR4-D Tiere von der weiteren CASP-Untersuchungsreihe ausgeschlossen, weil hier eine Vergleichbarkeit mit den anderen Untersuchungsgruppen nicht mehr gegeben schien.

3.2 Intraperitoneale Bakterienfreisetzung und Mortalität nach CASP

Zur Validierung der CASP-Operation wurden Peritoneallavagen zu den Zeitpunkten 0, 6, 18, 24 und 36 Stunden nach Sepsisinduktion von WT-Mäusen angefertigt und anschließend auf MacCONKEY-Agar und Columbia-Agar mit CNA-Zusatz für 48 h bei 37° C inkubiert. Danach wurden die CFUs /ml ausgezählt, um die intraperitoneale Bakterienfreisetzung im Zeitverlauf zu eruieren. Es zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der intraperitonealen Bakterienzahl im Zeitraum von 0-36 h (Abb. 4).

Zusätzlich wurden die Versuchstiere bezüglich ihrer Überlebenskinetik analysiert. Es zeigte sich eine konstante, zeitabhängig ansteigende Mortalitätsrate nach CASP-Intervention. Kein WT-Tier überlebte länger als vier Tage nach Sepsisinduktion (Abb. 5).

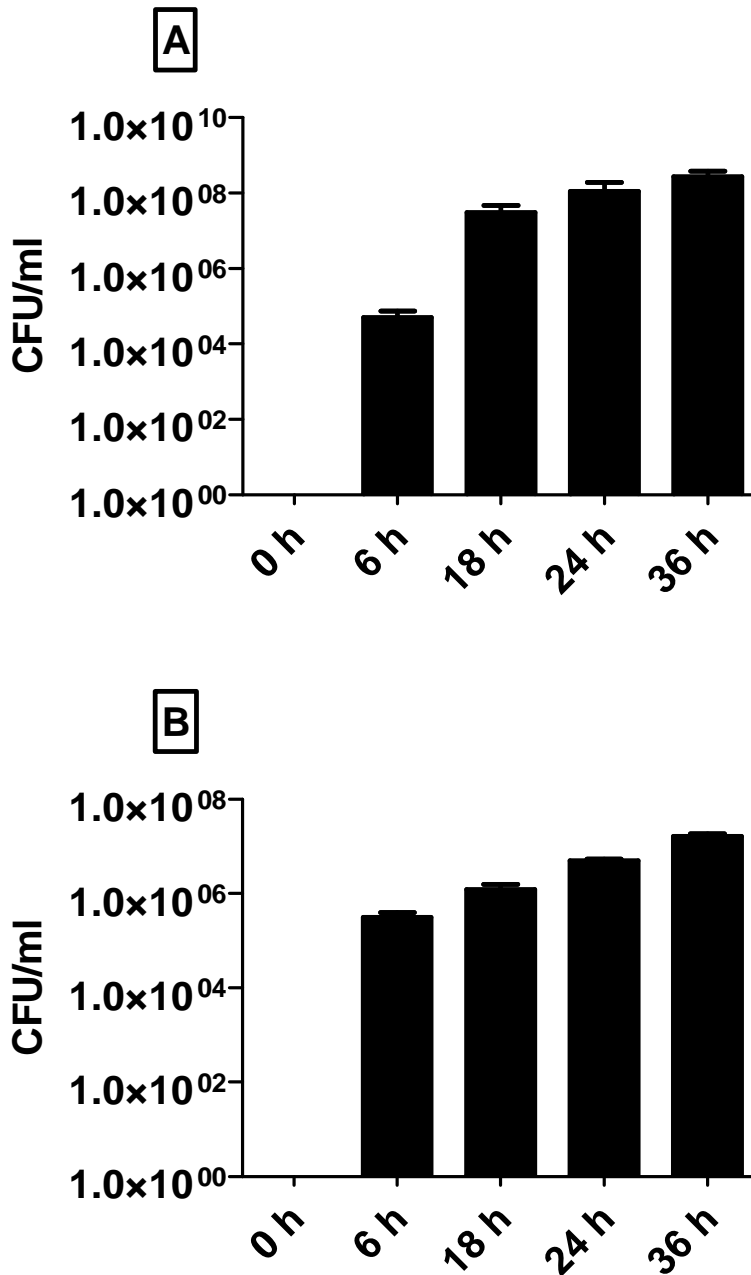


Abb. 4: Dargestellt ist die intraperitoneale Bakterienbesiedlung in WT-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach CASP-OP (n= 8). A zeigt den Verlauf der Freisetzung gram-negativer Bakterien gemessen als CFU/ml nach Bebrütung der Peritoneallavage auf MaCONKEY-Agar, B zeigt die Freisetzungskinetik für gram-positive Keime nach Inkubation auf Columbia-Agar mit CNA-Zusatz. Es lässt sich sowohl für gram-negative als auch gram-positive Bakterien ein kontinuierlicher Anstieg der CFU/ml nach CASP-OP beobachten

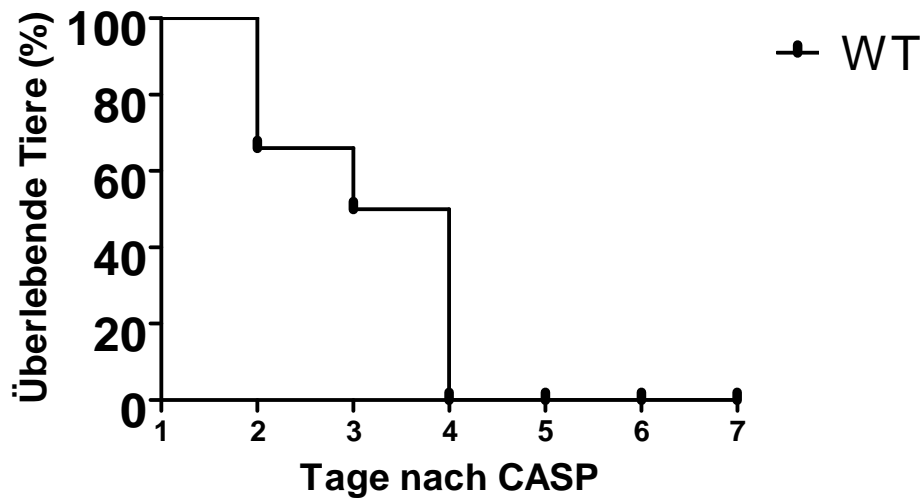


Abb. 5: Nach CASP-OP konnte bei WT-Mäusen eine kontinuierlich ansteigende Mortalität im Zeitverlauf beobachtet werden. 4 Tage nach Sepsisinduktion lag die Mortalität bei 100 % (n= 10)

3.3 Kardiales Inflammationsprofil in WT-Tieren

Zu den Zeitpunkten 6, 18, 24 und 36 h nach Sepsisinduktion erfolgte eine molekularbiologische Analyse der kardialen Inflammationsparameter via qRT-PCR aus den Herzen der WT-Tiere. Es konnte eine Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen direkt im Herzgewebe nachgewiesen werden. So zeigten IL-1 β und IL-6 bereits 18 h nach CASP-Operation einen signifikanten Anstieg ihrer mRNA-Expression im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Abb. 6 A, B). Während sich das Zytokinniveau von IL-6 nach 24 h wieder auf Kontrollniveau reduzierte, stieg die Expression von IL-1 β in den Herzen der septischen Tiere weiter an und fiel erst nach 36 h signifikant ab. Für TNF α konnte ein ähnliches Expressionsmuster wie für IL-1 β detektiert werden, denn auch hier zeigte sich nach 24 h eine Maximalexpression des Zytokins, welche gegenüber allen anderen Zeitpunkten signifikant erhöht war (Abb. 6 C).

Für die mRNA-Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 konnte ein kontinuierlicher Anstieg im beobachteten Zeitraum festgestellt werden. Die höchste Expression, die alle anderen Zeitpunkte signifikant übertraf, fand sich nach 36 h (Abb. 6 D). Es war demnach ein Wechsel von einer pro-inflammatorischen zu einer anti-inflammatorischen Immunreaktion im kardialen Gewebe septischer WT-Mäuse im Verlauf der polymikrobiellen Sepsis feststellbar.

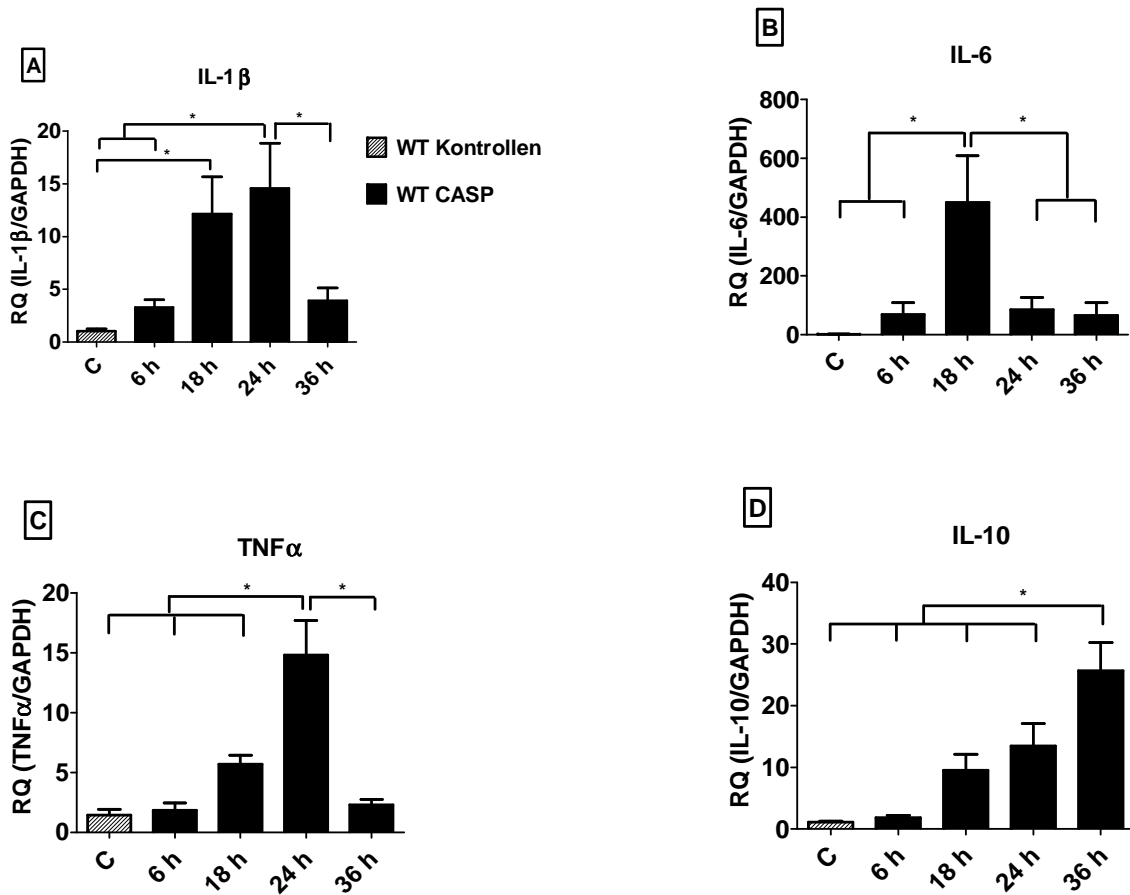


Abb. 6: Dargestellt sind die Ergebnisse der qRT-PCR bezüglich der kardialen Zytokinexpression im Zeitverlauf von 6-36 h nach CASP-OP (n= 8). So zeigte sich für IL-1 β ebenso wie für IL-6 bereits 18 h nach Sepsisinduktion ein signifikanter Anstieg dieser proinflammatorischen Mediatoren im kardialen Gewebe. Für TNF α wurde eine etwas spätere Regulation zum Zeitpunkt 24 h nach CASP-OP beobachtet. Es ließ sich jedoch bei allen proinflammatorischen Zytokinen ein Abfall der kardialen Regulation spätestens 36 h nach CASP-Intervention feststellen. Im Gegensatz hierzu zeigte sich für das antiinflammatorische Zytokin IL-10 ein kontinuierlicher Anstieg der kardialen Expression über die gesamten 36 h

Neben diesen klassischen Zytokinen wurden noch weitere Inflammationsmarker analysiert. Es konnte jedoch weder für HMGB1 noch für iNOS eine Regulation der Expression in den Herzen septischer Tiere detektiert werden (Abb. 7).

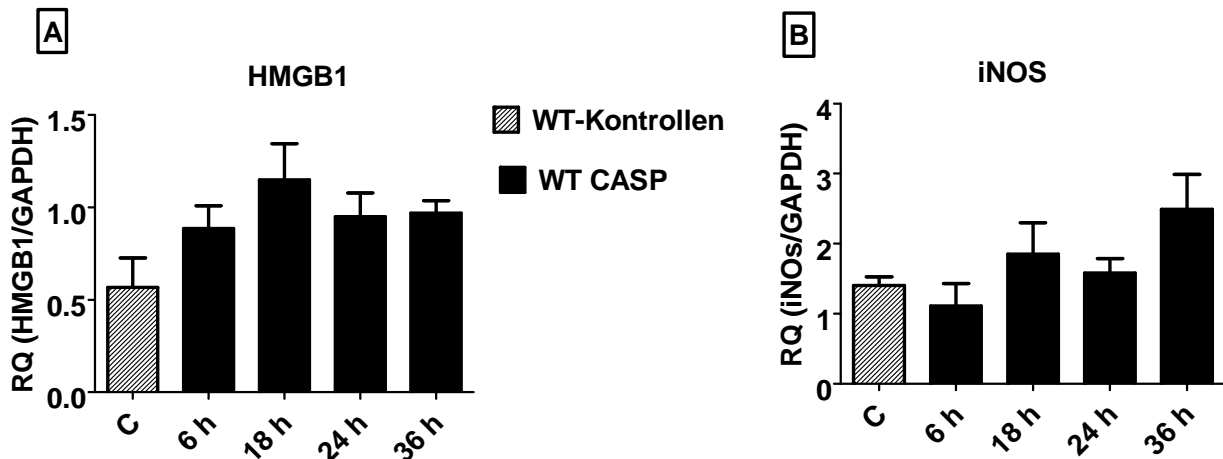


Abb. 7: Im Rahmen der qRT-PCR Analyse konnte weder für HMGB1 noch für iNOS eine Regulation im kardialen Gewebe im Zeitverlauf zu den untersuchten Zeitpunkten detektiert werden

3.4 Kardiales Expressionsprofil von Rezeptoren der angeborenen Immunität in septischen WT-Mäusen

Wie bereits erwähnt ist die Expression und Regulation von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, insbesondere von TLRs, auf immunkompetenten Zellen im Rahmen einer Inflammation hinlänglich bekannt. Im folgenden Teil dieser Arbeit ging es jedoch darum, ein kardiales Expressionsprofil dieser Rezeptoren im untersuchten Zeitraum zu entwerfen. So konnten mittels qRT-PCR unterschiedliche Expressionsmuster verschiedener Rezeptoren beobachtet werden: TLR2, verantwortlich für die Erkennung gram-positiver Bakterienbestandteile und CD-14, ein Co-Rezeptor von TLR4 und TLR9 waren beide bereits 18 h nach Sepsisinduktion maximal exprimiert. TLR4, als Rezeptor für die Erkennung gram-negativer Bakterien via LPS verantwortlich, wies zu allen untersuchten Zeitpunkten eine signifikante Induktion im Vergleich zur Kontrollgruppe auf, wohingegen TLR9, welcher bakterielle DNA detektiert, erst nach 36 h signifikant reguliert wurde.

Erstmalig gelang es, im Rahmen dieser Arbeit TREM1, ein Rezeptor der bislang nur auf myeloiden Zellen nachgewiesen werden konnte, im Herzen zu detektieren und eine Regulation im Rahmen einer Sepsis nachzuweisen. So zeigte sich ein kontinuierlicher Anstieg der kardialen

TREM1-Expression während einer CASP-induzierten Sepsis in WT-Mäusen (Abb. 8). Hingegen konnte für CCR4 keinerlei Regulation im Herzen nachgewiesen werden.

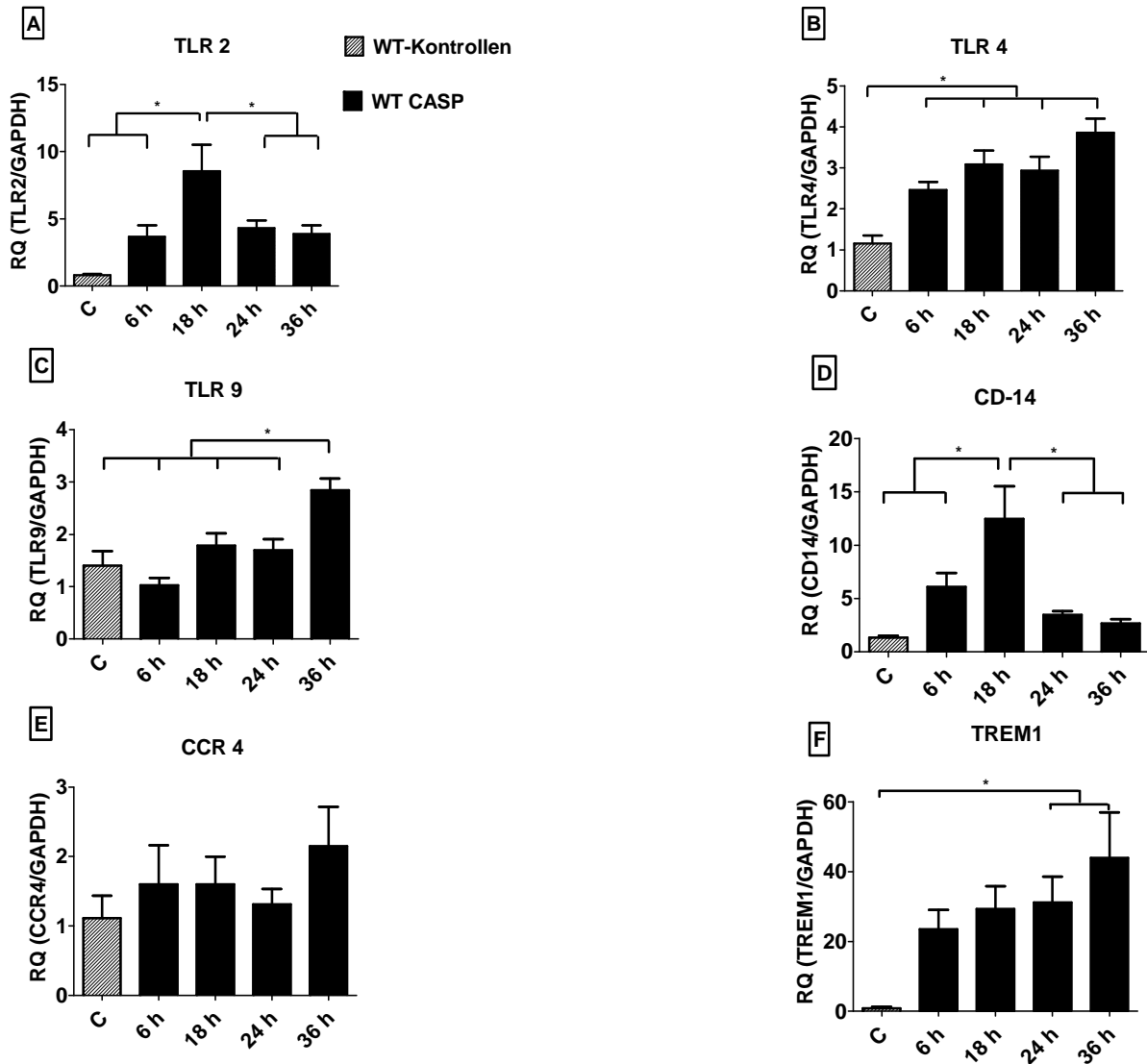


Abb. 8: Ergebnisse der kardialen Rezeptorexpression gemessen mittels qRT-PCR in WT-Herzen nach CASP-Intervention. TLR2 und TLR4 zeigten eine frühe Induktion der kardialen Expression bereits 18 h nach Sepsisinduktion. Gleiches galt für den TLR4-TLR9-Corezeptor CD-14. TLR9 hingegen zeigte erst 36 h nach CASP-OP eine signifikante Expressionssteigerung im kardialen Gewebe. Für den Chemokinrezeptor CCR4 ließ sich zu keinem der genannten Zeitpunkte eine Regulation feststellen. Hingegen zeigte sich für TREM1 eine kontinuierliche Expressionssteigerung über den gesamten in dieser Arbeit analysierten Zeitraum

3.5 Hämodynamik in septischen WT-Mäusen

Ein besonderes Augenmerk wurde in dieser Arbeit auf die hämodynamische Situation septischer Tiere *in vivo* gelegt. Hierzu erfolgten Untersuchungen mittels eines Druck-Volumen-Katheters 18 h nach CASP. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da hier bereits eine signifikante kardiale Inflammation nachgewiesen werden konnte, die Mortalität der Tiere bis zu diesem Zeitpunkt mit ca. 25 % jedoch noch moderat war.

18 h nach CASP befanden sich WT-Mäuse trotz Volumensubstitution in einem hypodynamischen septischen Schock. Dies zeigte sich in signifikant reduzierten Parametern der Herzfrequenz, des Schlag- und Herzzeitvolumens, des endsystolischen Druckes im linken Ventrikel, sowie reduzierter Kontraktilität und verminderter Schlagarbeit. Tab. 8 zeigt dies im Einzelnen.

	Sham 18 h	CASP 18 h
Herzfrequenz/min	587.2 ± 25.86	472.4 ± 26.14 *
Schlagvolumen (µl)	14.38 ± 0.8153	7.868 ± 0.8536 *
Herzzeitvolumen (µl/min)	8417 ± 500.4	3579 ± 546.8 *
Endsystolischer Druck (mmHg)	88.10 ± 1.852	68.00 ± 3.532 *
dP/dt max (mmHg/sec)	11270 ± 1190	6144 ± 1022 *
dP/dt min (mmHg/sec)	-10020 ± 935.1	-5683 ± 1145 *
Schlagarbeit (mmHg/µl)	1161 ± 65.34	432.2 ± 78.92 *

Tab. 8: Gezeigt sind die Ergebnisse der invasiven hämodynamischen Messungen mit einem Druck-Volumen Katheter. Verglichen wurden Sham-operierte Tiere und Tiere, die einer CASP-OP unterzogen worden waren zum Zeitpunkt 18 h post OP. *P < 0.05

3.6 Intraperitoneale Bakterienlast nach CASP in TLR-D Mäusen

Um die Bedeutung einzelner TLRs für die kardiale Inflammation nach CASP im Mausmodell zu analysieren wurden genetisch veränderte Mäuse eingesetzt, welche entweder für TLR2 oder TLR9 defizient waren. Aufgrund der moderaten Mortalität bei bereits bestehender kardialer Inflammation und Dysfunktion in WT-Mäusen 18 h nach CASP-OP wurde für die Untersuchung der TLR-D Tiere wurde ebenfalls dieser Zeitpunkt ausgewählt.

Zunächst wurden die intraperitonealen CFUs/ml in TLR2-D und TLR9-D Mäusen 18 h nach CASP bestimmt und mit den WT-Daten verglichen (Abb. 9). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den drei Versuchsgruppen bezogen auf die intraperitoneale Bakterienlast. TLR9-D Mäuse wiesen etwas geringen Bakterienzahlen auf, jedoch war dies ohne statistische Relevanz.

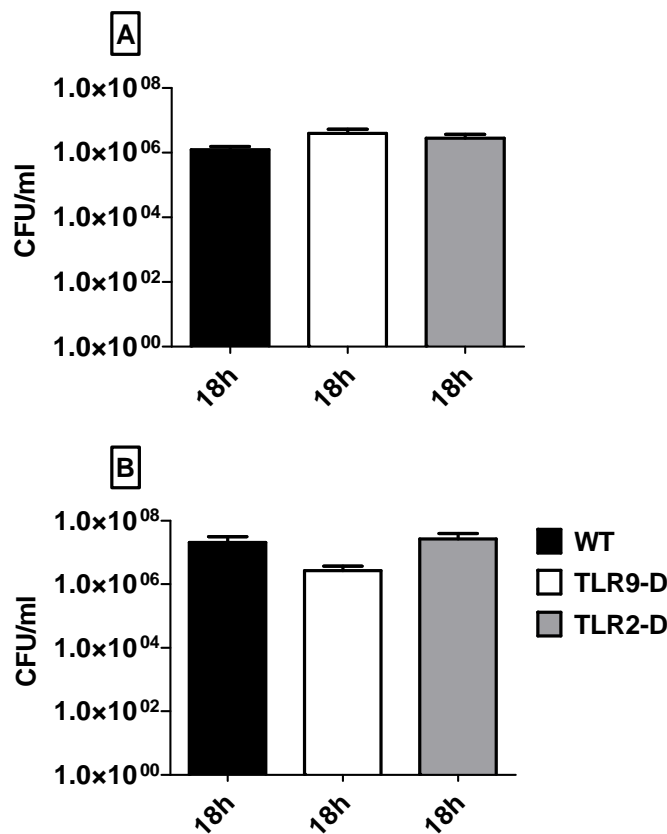


Abb. 9: Dargestellt ist der Vergleich der intraperitonealen Bakterienzahl gemessen als CFUs/ml zum Zeit-punkt 18 h nach Sepsisinduktion zwischen den WT-, TLR2- und TLR9-Versuchstieren. Wie die Ab-bildung zeigt lässt sich weder für gram-positive (A) noch für gram-negative Bakterien (B) ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen beobachten

3.7 Kardiale Expression von Zytokinen in TLR-D Tieren

Neben der mikrobiologischen Analyse erfolgte ebenfalls eine Analyse der Inflammationsparameter aus den Herzen dieser Tiere zum Zeitpunkt 18 h nach CASP mittels qRT-PCR.

Der Anstieg der $\text{TNF}\alpha$ -Expression bei den TLR-D Gruppen erreichte nicht das Signifikanzniveau gegenüber unbehandelten WT-Gruppen. Interessanterweise führte die CASP-OP auch bei den beiden anderen untersuchten pro-inflammatorischen Zytokinen IL-1 β und IL-6 in den TLR9-D Tieren nicht zu einem signifikanten Anstieg gegenüber unbehandelten WT-Tieren (Abb. 10 A, B). In den TLR2-D Tieren dagegen bewirkte die CASP-OP einen Anstieg der IL-1 β Expression ungefähr auf das Niveau der entsprechenden WT-Tiere. Die IL-6 Expression der TLR2-D Tiere stieg unter diesen Bedingungen auf ein Vielfaches der WT-Tiere. Die mRNA-Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 war in den TLR9-D und den WT-Tieren signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht, noch höher und signifikant gegenüber den anderen Gruppen war die Expression in den TLR2-D Tieren (Abb. 10 D)

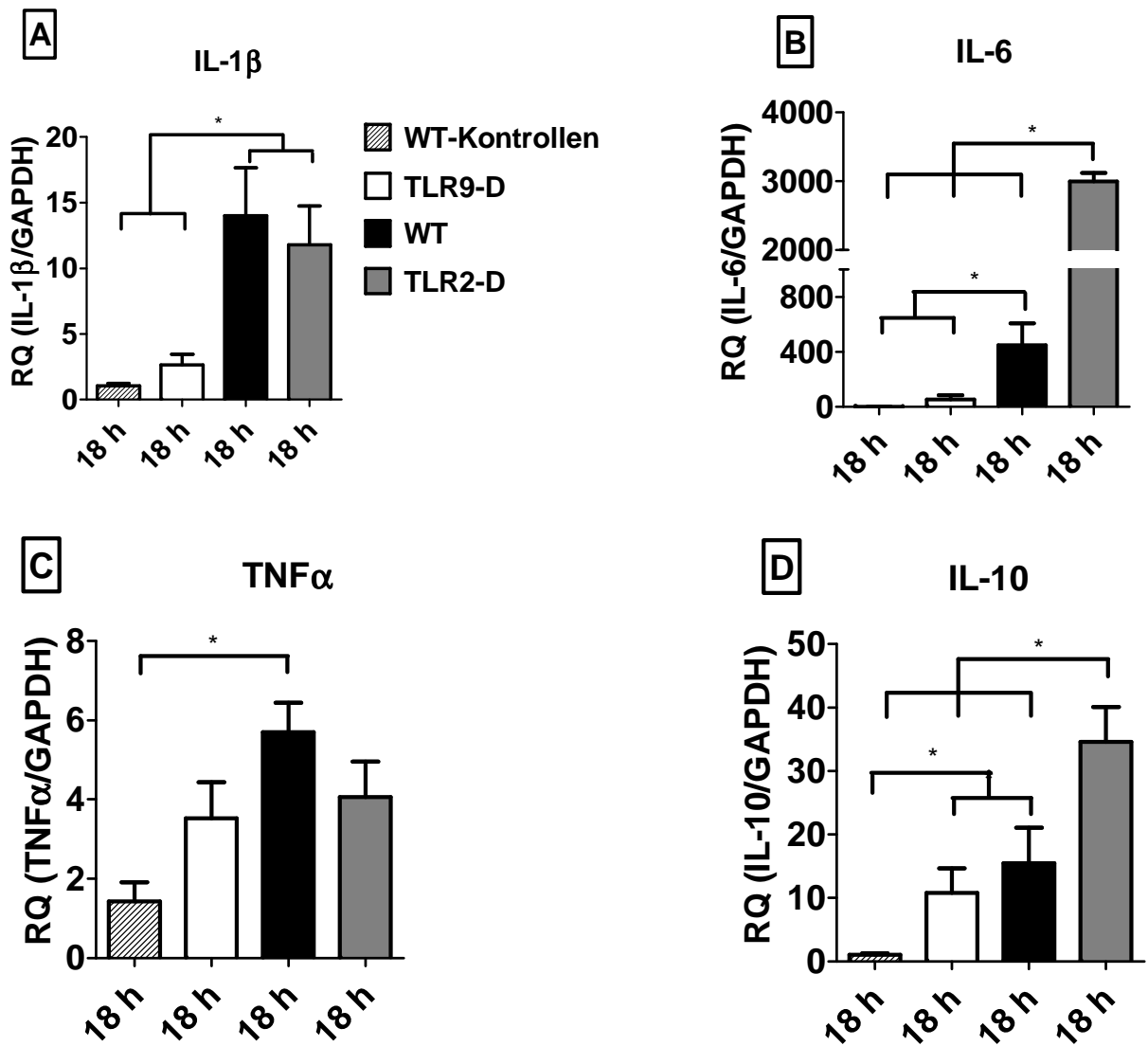


Abb. 10: Gezeigt ist der Vergleich der kardialen Zytokinexpression zwischen WT-, TLR2-D- und TLR9-D-Versuchstieren 18 h nach Sepsisinduktion sowie Sham-operierten WT-Tieren als Kontrollgruppe. Es zeigt eine signifikante Heraufregulation der kardialen Zytokinexpression in WT- und TLR2-D Tieren. Bei TLR2-D Tieren war die Expression von IL-6 und IL-10 im kardialen Gewebe sogar signifikant höher als in allen anderen Versuchstiergruppen. In den TLR9-D Tieren ergab sich hingegen keine Veränderung proinflammatorischer Zytokine im Herzen, jedoch war die Expression des antiinflammatorischen Mediators IL-10 im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant induziert

Da diese Daten die mRNA-Level in den Herzen septischer Tiere widerspiegeln, jedoch keinen Rückschluss auf die tatsächlichen Proteinkonzentrationen erlauben, wurden mittels ELISA die Proteinkonzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α , IL1 β und IL-6 bestimmt. Diesen wird eine besondere kardiodepressive Eigenschaft im Rahmen der septischen Kardiomyopathie zugeschrieben.

Es zeigte sich, dass TNF α durch ELISA auf Proteinebene 18 h nach CASP in keiner der Gruppen detektierbar war. IL-1 β und IL-6 hingegen waren messbar und zeigten eine signifikant geringere Konzentration in der TLR9-D Gruppe als in der WT- und TLR2-D Gruppe (Abb. 11).

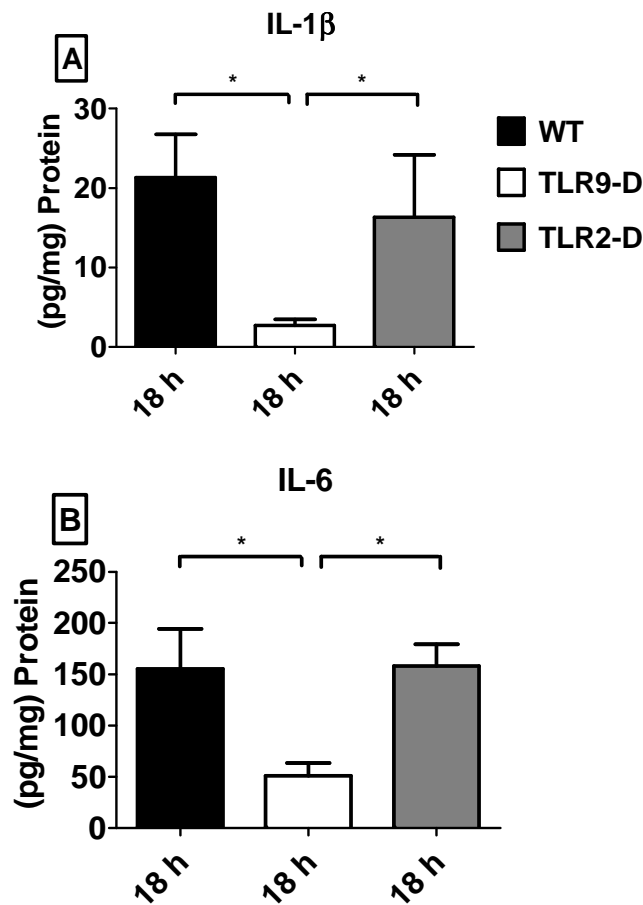


Abb. 11: ELISA-Untersuchung zur Analyse der Proteinexpression pro-inflammatorischer Zytokine in den Herzen septischer Versuchstiere 18 h nach CASP-OP. Untersucht wurden die Herzen von WT-, TLR2-D- und TLR9-D-Tieren. Es zeigte sich korrelierend zu den Ergebnissen der qRT-PCR Untersuchungen eine signifikante Expressionssteigerung für die Zytokine IL-1 β und IL-6 im kardialen Gewebe von WT- und TLR2-D-Versuchstieren 18 h nach CASP-OP. Im Gegensatz hierzu zeigte sich eine signifikant geringere Proteinkonzentration dieser pro-inflammatorischen Mediatoren in den Herzen von TLR9-D-Mäusen ebenfalls 18 h nach CASP-Intervention

3.8 Immunrezeptorregulation in TLR-D Tieren 18 h nach CASP

Neben dem Zytokinprofil wurde ebenfalls die Regulation von Immunrezeptoren durch qRT-PCR in den Herzen von TLR2- und TLR9-D Mäusen 18 h nach Sepsisinduktion analysiert und mit den Sham-operierten WT-Mäusen verglichen. Es zeigte sich, dass die Defizienz eines TLR die Regulation anderer TLRs während der kardialen Inflammation signifikant beeinflusst. So zeigten TLR9-D Tiere eine signifikant geringere Induktion von TLR2, TLR4 und CD-14 als WT-Mäuse 18 h nach CASP. In der TLR2-D Gruppe fand sich im Vergleich zu der WT-Gruppe eine geringere Induktion von TLR4 und TLR9, jedoch nicht von CD-14. TREM1 hingegen wurde in

den Herzen TLR2-D Tiere signifikant höher reguliert als in den Herzen von WT- und TLR9-D Mäusen (Abb. 12).

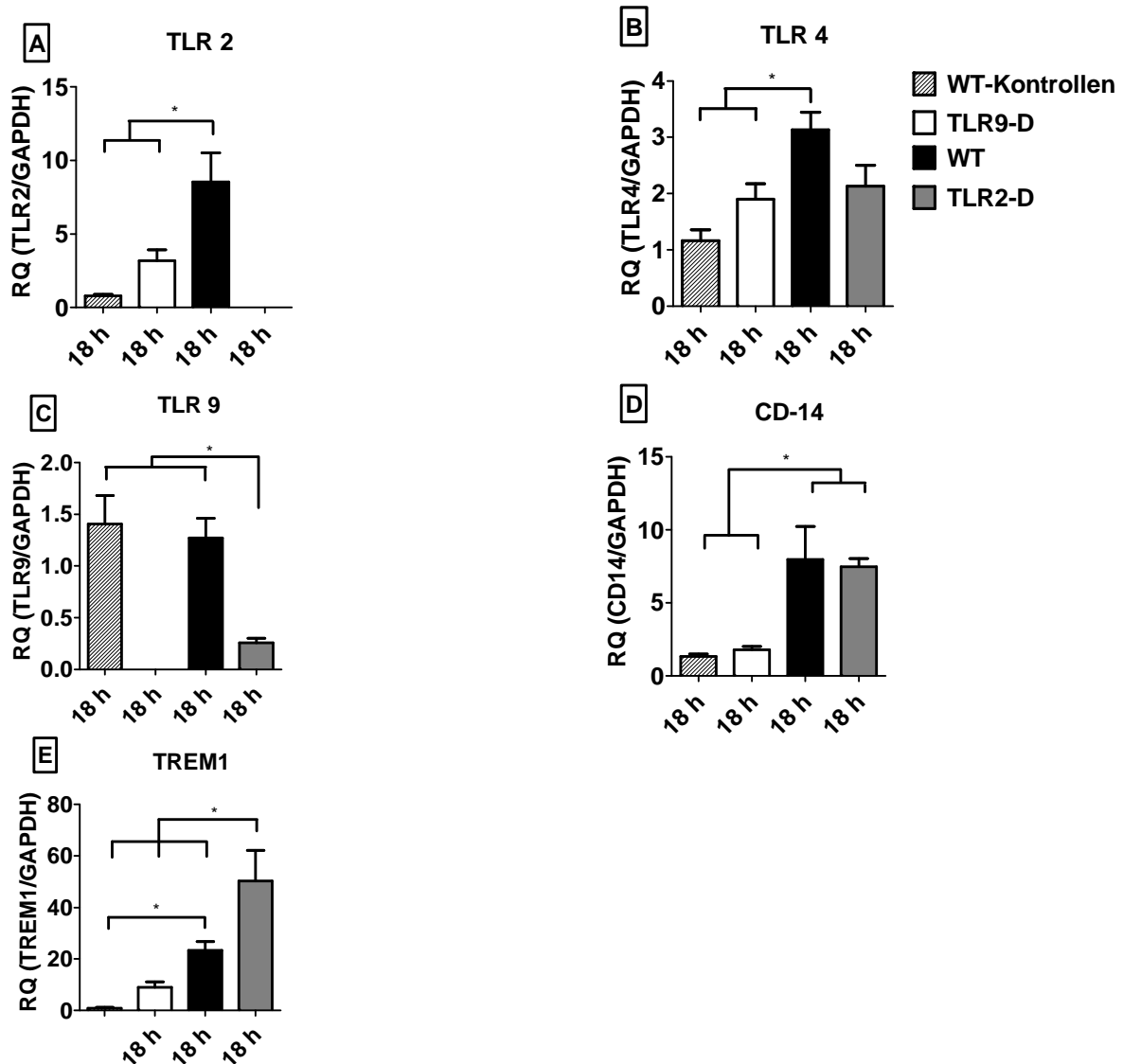


Abb. 12: mRNA-Expression von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems 18 h nach CASP-OP im Vergleich zwischen WT-, TLR2-D- und TLR9-D-Versuchstieren und einer Kontrollgruppe. Es ließ sich eine Hochregulation der Immunrezeptoren TLR2 (A), TLR4 (B), CD-14 (D) und TREM1 (E) in den Herzen septischer WT-Tiere beobachten. Diese Regulation ist gegenüber TLR9-D-Tieren signifikant stärker ausgeprägt. Ein ähnliches Expressionsprofil ließ sich für die Rezeptoren von TLR2-D-Versuchstieren feststellen. Auch diese zeigten eine signifikante Induktion der Rezeptoren CD-14 und TREM1 gegenüber TLR9-D-Tieren und den Kontrollen. TLR9 wurde hingegen in keiner Versuchsgruppe zu dem genannten Zeitpunkt reguliert. Die signifikant geringere Expression dieses Rezeptors in den Herzen von TLR2-D-Tieren ist am ehesten als statistisches Phänomen bei RQ-Werten nahe 1 zu werten

3.9 Hämodynamik der TLR-D Tiere 18 h nach CASP

Im Folgenden wurde untersucht, ob die signifikant geringere kardiale Inflammation in den Herzen von TLR9-D Tieren 18 h nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis im Vergleich zu WT- und TLR2-D Mäusen einen Einfluss auf die hämodynamische Situation *in vivo* hat. Hierzu wurden wieder Untersuchungen mit einem in den linken Ventrikel eingebrachten Druck-Volumen-Katheter durchgeführt.

Es zeigte sich, dass TLR2-D Mäuse 18 h nach Sepsisinduktion genau wie WT-Mäuse an einem hypodynamen septischen Schock litten. So wiesen sowohl WT- als auch TLR2-D Mäuse signifikant reduzierte Werte für das Schlagvolumen, das Herzzeitvolumen, den endsystolischen Druck im linken Ventrikel sowie die Schlagarbeit auf, verglichen mit TLR9-D Tieren (Abb. 13).

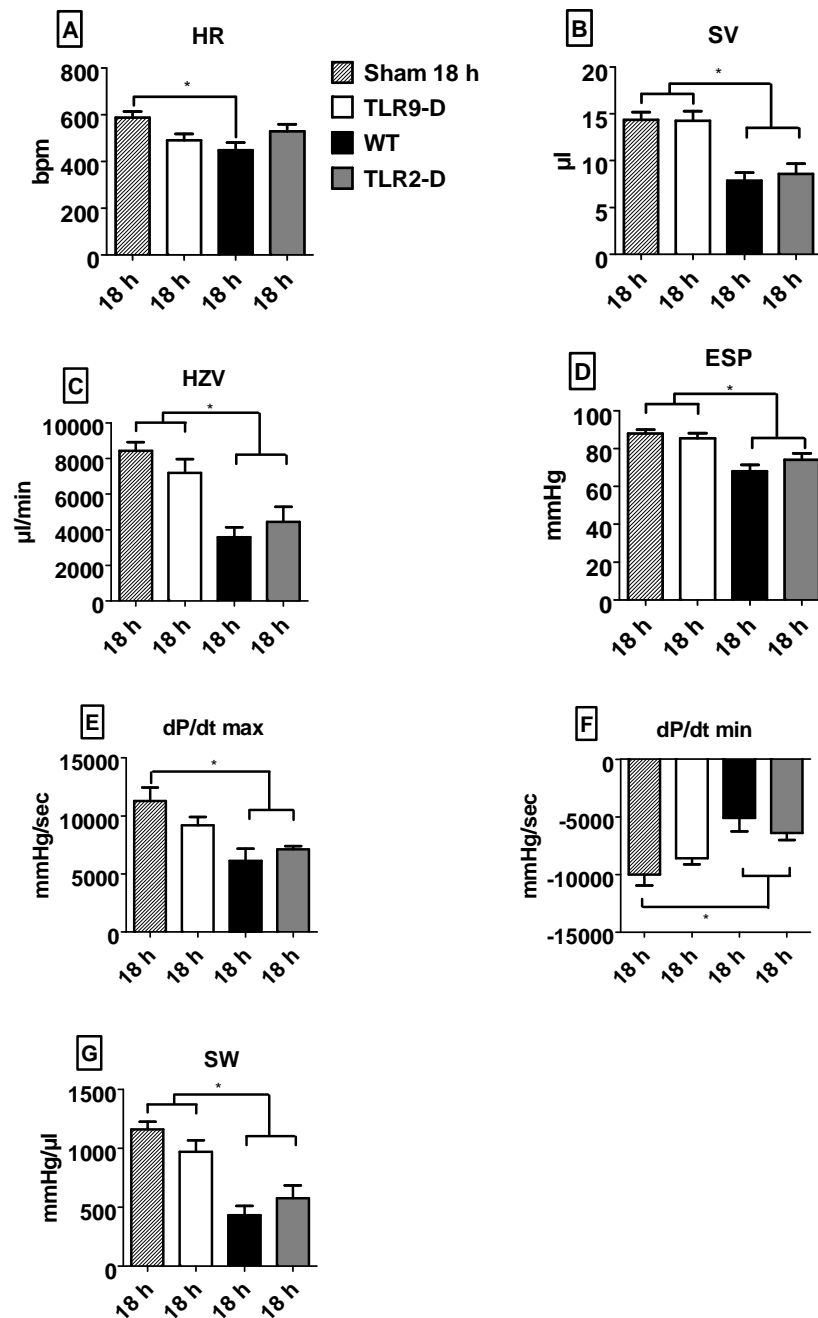


Abb. 13: Häemodynamische Untersuchungen mit einem in den linken Ventrikel eingebrachten Druck-Volumen-Katheter bei WT-, TLR2-D- und TLR9-D-Versuchstieren 18 h nach CASP-OP und einer Kontrollgruppe. Es zeigte sich für WT- und TLR2-D-Tiere eine gleichermaßen ausgeprägte Reduktion der kardialen Pumpfunktion mit signifikanter Einschränkung des SV (B), HZV (C), ESP (D), dP/dt max (E), dP/dt min (F) und SW (G) im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Im Gegensatz hierzu zeigte die TLR9-D-Versuchsgruppe 18 h nach CASP-OP eine vollständig erhaltene kardiale Funktion, wie in der gesunden Kontrollgruppe

4. Diskussion

4.1 Einfluss von TLR auf die bakterielle Homöostase der Darmflora

Das CASP-Modell greift zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis auf die natürlich vorhandenen Bakterien der Darmflora zurück, indem es durch die Implantation eines Stents den Übertritt dieser Bakterien in die Peritonealhöhle ermöglicht. Somit spielt die bakterielle Zusammensetzung des Faeces der Versuchstiere eine wichtige Rolle für die Auslösung einer Immunantwort. Aus diesem Grund wurde zuerst mit Hilfe selektiver Nährmedien die bakterielle Zusammensetzung des Faeces in WT-, TLR2-D, TLR4-D und TLR9-D Mäusen untersucht. Hierbei zeigte sich eine Besiedlung verschiedener Darmkompartimente sowohl mit gram-positiven als auch mit gram-negativen Bakterien in allen Versuchsgruppen mit Ausnahme von TLR4-D Mäusen. In dieser Gruppe konnten keinerlei gram-negative Bakterien im Darmlumen detektiert werden. Dieses überraschende Phänomen ist möglicherweise mit den intestinalen epithelialen Zellen (IEC) in Verbindung zu setzen, welche für die Interaktion des Wirtsorganismus mit den Darmbakterien verantwortlich sind. Diese IEC exprimieren verschiedene TLR darunter auch TLR2, TLR4 und TLR9 (Cario et al., 2002; Ortega-Cava et al., 2003; Pedersen et al., 2005), welche in der Lage sind bakterielle Bestandteile der Darmflora zu erkennen. Es wird jedoch durch diese Erkennung kommensaler Bakterienbestandteile keine inflammatorische Antwort ausgelöst, wie sie eigentlich zu erwarten wäre. Hierfür existieren zwei Erklärungsmodelle: Zum einen scheinen diese nicht-pathogenen Bakterien die Ubiquitinierung von I κ B zu verhindern, zum anderen sind sie wohl in der Lage, den aktiven Transport von NF κ B aus dem Zellkern via PPAR γ zu induzieren (neish et al., 2000; Kelly et al., 2004). Sobald jedoch diese Epithelschicht von den Bakterien überwunden wird, kommt es zu einer starken inflammatorischen Immunreaktion des Organismus. Inwiefern jedoch die Präsenz bzw. Abwesenheit von TLR und anderen Immunrezeptoren der IEC direkt die Zusammensetzung der intestinalen Flora beeinflusst, ist nur wenig untersucht. Es ist jedoch bekannt, dass Mäuse, die defizient für den Rezeptor Nod2 sind, einen zytoplasmatischen PRR, der Muramyl Dipeptid (MDP) von einem breiten bakteriellen Spektrum erkennt, eine signifikant höhere Besiedlung des terminalen Ileums mit *Bacteroides* aufweisen als WT-Mäuse (Petnicki-Ocwieja et al., 2009). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein direkter Einfluss genetischer Komponenten auf die Darmflora auch beim Menschen besteht. So zeigten Patienten, die an einer Mutation des MEFV-Genes litten, welches direkt mit dem familiären mediterranen Fieber assoziiert ist, eine

deutliche Depletion kommensaler Bakterien im Intestinum im Vergleich zu gesunden Individuen aufweisen (Khachatryan et al., 2008).

Die hier beobachtete veränderte Zusammensetzung der intestinalen Bakterienflora bei TLR4-Defizienz, könnte also ursächlich mit dem Fehlen des TLR4 zusammenhängen. Als Konsequenz der unterschiedlichen Darmbakterienzusammensetzung musste die TLR4-D Versuchsgruppe von weiteren Experimenten ausgeschlossen werden, da eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen den einzelnen Gruppen unter diesen Bedingungen nicht mehr gegeben war.

4.2 Validität des CASP-Modells

In dieser Arbeit konnte die Suffizienz des CASP-Modells zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis im Mausmodell belegt werden. Es zeigte sich eine kontinuierliche, zeitabhängige Freisetzung vitaler Darmbakterien aus dem intestinalen Lumen in die Peritonealhöhle. Diese Beobachtung steht im Einklang mit bisherigen Beschreibungen anderer CASP-Studien (Traeger et al., 2010). Die Mortalität nach CASP-Intervention mit einem 18 G Stent lag nach 72 h bei 100 %. Dies belegt, dass durch die Operation eine durch den WT-Organismus nicht beherrschbare Infektion geschaffen wurde, die unbehandelt zum Tode führt. Im Gegensatz hierzu lässt sich im CLP-Modell, welches allgemein als Goldstandard zur Sepsisinduktion im Tiermodell angesehen wird, eine deutlich geringere Mortalität bei den Versuchstieren beobachten (Maier et al., 2004). Ebenfalls wurde eine deutlich geringere Bakterienzahl in der Peritonealhöhle bei diesem Modell verglichen mit CASP-operierten Tieren gefunden. Dies lässt vermuten, dass es sich bei der CASP-Methode um ein sehr zuverlässiges Modell zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis handelt, das auch bezüglich seiner Reproduzierbarkeit bisherigen Sepsismodellen überlegen sein könnte.

4.3 Kardiales Zytokinprofil im Zeitverlauf in WT-Mäusen

Im Rahmen dieser Studie wurde das kardiale Expressionsmuster der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6, sowie des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 nach CASP-Intervention untersucht. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Sepsis, ausgelöst durch ein polymikrobielles Erregerspektrum, eine zeitlich-dynamische Zytokinantwort im Herzen hervorruft. So zeigte die kardiale mRNA-Expression von TNF α einen kontinuierlichen Anstieg mit einem Maximum 24 h nach Sepsisinduktion, um nach 36 h wieder annähernd Kontrollniveau zu erreichen. Dies galt in ähnlicher Weise für die kardiale Expressionskinetik von IL-1 β .

Darin unterschieden sich die herzspezifischen Zytokinreaktionen dieser beiden pro-inflammatorischen Mediatoren deutlich von bislang bekannten Zytokinprofilen im Serum septischer Mäuse. Im Gegensatz zur kardialen Expressionsdynamik von TNF α und IL-1 β zeigten sich im Serum sehr früh nach Sepsisinduktion (innerhalb der ersten 1-5 h) signifikant höhere Zytokinkonzentrationen als im Serum der korrespondierenden Kontrollgruppen (Hedge et al., 2010). Dies wird zum einen durch die Tatsache erklärt, dass die Infektion ausgelöst durch CASP-OP und die mit ihr einhergehende Inflammation zunächst auf die Abdominalhöhle begrenzt ist und erst im weiteren Verlauf über eine Bakteriämie das Herz erreicht, zum anderen scheint es sich hierbei jedoch um ein CASP-Modell spezifisches Phänomen zu handeln, da in früheren Studien nach hochdosierter i. p. Administration von TLR-Agonisten ebenfalls sehr früh eine kardiale Induktion von TNF α und IL-1 β zu beobachten war (Nemoto et al., 2002; Knuefermann et al., 2008). Somit scheint die kontinuierliche Freisetzung von Pathogenen, wie sie für das CASP-Modell charakteristisch ist, eine entscheidende Rolle für die kardiale Inflammationskinetik zu spielen.

IL-6 zeigte im Vergleich zu TNF α und IL-1 β ein etwas früheres Maximum zum Zeitpunkt 18 h nach Sepsisinduktion. Zu allen anderen untersuchten Zeitpunkten unterschied sich die kardiale Expression von IL-6 nicht von der Kontrollgruppe. Auch für dieses Zytokin gilt, dass es im Serum im Rahmen einer polymikrobiellen Sepsis deutlich früher detektiert werden kann als im Herzen septischer Tiere nach CASP-Intervention (Andrejko et al., 1998).

Es ließ sich jedoch bei allen drei untersuchten Mediatoren beobachten, dass die kardiale pro-inflammatorische Aktivität auf einen Zeitraum von 24 h nach Sepsisinduktion begrenzt war. Danach fanden sich für TNF α , IL-1 β und IL-6 jeweils Zytokinlevel im Herzen, die sich mit denen der Kontrollgruppe vergleichen ließen. IL-10 hingegen zeigte einen kontinuierlichen Anstieg der kardialen mRNA-Expression über den kompletten Zeitraum von 36 h. Demnach scheint das Herz im Rahmen der kardialen Inflammation während einer polymikrobiellen Sepsis zwei getrennte Phasen zu durchlaufen und einen Wechsel von einer pro-inflammatorischen Phase hin zu einer anti-inflammatorischen Phase zu vollziehen. Dieser zweiphasige Verlauf konnte auch im Serum septischer Mäuse nach CLP beobachtet werden (Ashare et al., 2005). Die kontinuierliche Expressionssteigerung von IL-10 resultiert in einer zunehmenden Immunsuppression und wird unter anderem für die im Zeitverlauf rasch ansteigende Mortalität, die sich auch beim CASP-Modell wiederfindet, verantwortlich gemacht (Reddy et al., 2001).

4.4 Myokardiale Immunrezeptor-Expression in WT-Mäusen nach CASP

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die kardiale Expression von TLR zu verschiedenen Zeitpunkten nach CASP-Operation untersucht. Es zeigte sich das TLR4, der für die Erkennung von LPS gram-negativer Bakterien verantwortlich ist, bereits 6 h nach Sepsisinduktion eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression aufwies und dieses Gen über den kompletten Untersuchungszeitraum von 36 h induziert wurde. Für den TLR4-TLR9-Corezeptor CD-14 konnte ebenfalls ein früher Anstieg der kardialen Expression beobachtet werden, jedoch zeigte sich hier ein signifikanter Abfall der mRNA-Konzentration 24 h nach CASP-Operation. Somit konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal belegt werden, dass eine TLR4-Regulation im Herzen während einer kardialen Inflammation im Rahmen einer polymikrobiellen Sepsis stattfindet. Bisher war lediglich bekannt, dass die intraperitoneale Applikation von LPS die kardiale CD-14 Expression induziert, jedoch konnte kein Einfluss auf die TLR4-Expression nachgewiesen werden (Knuefermann et al., 2002). Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass der myokardial exprimierte TLR4 in der Lage ist, eine kardiale Inflammation zu vermitteln und somit die septische Kardiomyopathie in ihrer Entstehung zu begünstigen. Im Gegensatz hierzu steht die Beobachtung einer leukozytenabhängig vermittelten kardialen Inflammation (Tavener et al., 2004). So zeigte sich im chimären Mausmodell, welches für myokardiale TLR4 Expression defizient war, diesen Rezeptor jedoch auf seinen Leukozyten exprimierte, nach LPS-Applikation eine reduzierte myokardiale Kontraktilität. Hierbei wurde jedoch nicht der Einfluss im Serum zirkulierender kardiodepressiver Zytokine auf die Kardiomyozyten ausgeschlossen. So sind diese trotz Abwesenheit pathogener Keime in der Lage die Kontraktilität massiv zu reduzieren (Joulin et al., 2007). Ausserdem konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die Inkubation isolierter Kardiomyozyten zusammen mit LPS zu einer Reduktion der Kontraktilität führt und dieser Effekt TLR4-vermittelt ist (Baumgarten et al., 2006).

Der TLR2 zeigte 18 h nach Induktion einer polymikrobiellen Sepsis durch CASP-OP ebenfalls einen signifikanten Anstieg der kardialen mRNA-Expression. Diese Beobachtung ist weniger überraschend, da bereits in einer früheren Studien nachgewiesen werden konnte, dass die i. p. Applikation des gram-positiven Bakteriums *S. aureus* zu einer Erhöhung der kardialen TLR2-Expression führt (Knuefermann et al., 2004).

Im Gegensatz zu den bisher genannten Rezeptoren lässt sich für den TLR9 erst eine deutlich spätere kardiale Regulation im Rahmen einer polymikrobiellen Sepsis erkennen. So zeigte sich für diesen Rezeptor erst eine signifikante Expressionssteigerung 36 h nach CASP-OP. Da

bakterielle DNA, welche den TLR9 stimuliert, im Gegensatz zu TLR2- und TLR4-Liganden intrazellulär lokalisiert ist, muss diese, um erkannt werden zu können, erst aus den Bakterien freigesetzt werden. Hieraus könnte sich die zeitlich verzögerte kardiale Induktion von TLR9 erklären lassen, da die direkte i. p. Applikation von bakterieller DNA zu deutlich früheren kardialen Expressionsteigerung führt (Knuefermann et al., 2008).

Neben den TLR wurden auch noch weitere Rezeptoren des Immunsystems auf ihre kardiale Expression während einer polymikrobiellen Sepsis untersucht. So konnte erstmalig gezeigt werden, dass TREM1 im Herzen septischer Versuchstiere eine im Zeitverlauf kontinuierlich ansteigende Expression erfährt. Obwohl TREM1 keine Bedeutung für die frühzeitige Diagnosesicherung einer Sepsis zu haben scheint, könnte dieser Rezeptor in Zukunft möglicherweise als ein Marker für die Stärke und Dauer einer myokardialen Inflammation eine Rolle spielen (Sarafidis et al., 2010). Im Gegensatz hierzu konnte in dieser Arbeit weder für CCR4 noch für HMGB1 eine Regulation der kardialen Expression im Rahmen einer polymikrobiellen Sepsis beobachtet werden.

4.5 Häodynamik septischer WT-Mäuse 18 h nach CASP

Da wie bereits beschrieben 18 h nach Sepsisinduktion eine signifikante kardiale Inflammation detektiert werden konnte, erfolgte aufgrund der zu diesem Zeitpunkt noch moderaten Mortalität die invasive Evaluation der Herz-Kreislauf-Funktion mittels eines Druck-Volumen Katheters. Dieser zeichnete linksventrikuläre hämodynamische Parameter der septischen Tiere auf. Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der kardialen Funktion mit deutlich eingeschränkter systolischer Pumpfunktion im Rahmen einer septischer Kardiomyopathie 18 h nach CASP-OP in WT-Mäusen. Die kardiale Kontraktilität gemessen als dp/dt max war im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert, was einen signifikanten Einbruch des HZV und des linksventrikulären endsystolischen Druckes nach sich zog. Insgesamt korrelierten diese Beobachtungen mit dem Bild des hypodynamen septischen Kreislaufschocks. Diese Daten decken sich mit den echokardiographischen Beobachtungen septischer Patienten auf Intensivstationen, die eine verschlechterte systolische und diastolische Pumpfunktion während einer Sepsis entwickelten (Jafri et al., 1990; Munt et al., 1998; Poelaert et al., 1997).

Verschiedene experimentelle Faktoren haben einen unmittelbaren Einfluss auf die kardiale Performance im septischen Tierversuchsmodell. So spielt die Art der gewählten Anästhesie für die invasive Messung der Häodynamik eine entscheidende Rolle für die Beurteilung der

gemessenen Parameter. Es konnte gezeigt werden, dass Isofluran, welches als volatiles Inhalationsnarkotikum auch in dem vorliegenden Setting verwendet wurde, als Goldstandard für die invasive Evaluation der Herz-Kreislauf-Funktion anzusehen ist (Janssen et al., 2004). Dies liegt in dem verglichen mit anderen Narkotika recht geringen kardiodepressiven Effekt und erlaubt somit eine deutlich bessere Beurteilbarkeit der durch die Sepsis selbst hervorgerufenen hämodynamischen Alterationen.

Darüber hinaus wirkt sich die post-operative Volumenapplikation unmittelbar auf die Hämodynamik während einer Sepsis aus. So wurde im CLP-Modell demonstriert, dass eine aggressive Flüssigkeitssubstitution von 100 ml/kg KG trotz einer wie in dieser Arbeit beobachteten Reduktion der kardialen Kontraktilität zu einem erhöhten HZV verglichen mit der Kontrollgruppe führen kann (Tao et al., 2004). Jedoch spiegelt eine solch massive Volumengabe nicht die aktuellen Empfehlungen der SSC (Surviving Sepsis Campaign) für septische Patienten auf Intensivstationen wider, die im Falle einer Hypotension initial zur Applikation von 20 ml/kg KG kristalloider Infusionen raten (Rivers et al., 2001). Zwar wird in dieser Empfehlung kein direktes Limit für die Volumensubstitution genannt, doch sollte die weitere Flüssigkeitsapplikation nach Parametern wie ZVD oder Laktat gesteuert erfolgen.

In der vorliegenden Arbeit wurden somit diese exogenen Einflussgrößen auf die kardiale Funktion möglichst minimiert bzw. der Realität auf Intensivstationen angeglichen.

Daraus ergab sich die Frage, welche Mechanismen tatsächlich für die Entstehung einer septischen Kardiomyopathie während einer polymikrobiellen Sepsis verantwortlich sind. Mehrere Arbeiten zu diesem Thema fokussierten ihr Interesse auf die Bedeutung von NO, welches durch die iNOS im Rahmen einer Sepsis gebildet werden kann. So bewirkt NO durch die Bildung von cGMP im Herzen eine Verminderung des β -adrenerg vermittelten langsamen Kalziumeinstroms in den Kardiomyozyten und eine Desensibilisierung der Myofilamente für Kalzium (Shah et al., 1994). Darüber hinaus sind sehr hohe Konzentrationen von NO sogar in der Lage die Apoptose in Kardiomyozyten zu induzieren (Kawaguchi et al., 1997). Auf der anderen Seite wurde berichtet, dass NO die diastolische Funktion trotz Ventrikeldilatation während einer Sepsis aufrechterhalten kann und die myokardiale Perfusion durch eine Vasodilatation der Koronargefäße verbessern kann (Belcher et al., 2002; Cotton et al., 2002).

Das für die NO-Produktion während eines inflammatorischen Stimulus in erster Linie verantwortliche Enzym iNOS wird im Myokard von Patienten mit Herzinsuffizienz exprimiert, wobei die Ätiologie der Herzinsuffizienz und die Stärke ihrer Ausprägung letztlich für das

Regulationsniveau nicht maßgeblich ist (de Belder et al., 1993; Drexler et al., 1998; Fukuchi et al., 1998; Haywood et al., 1996). Diese Beobachtungen mögen die Tatsache erklären, dass in der vorliegenden Arbeit zwar eine grundsätzliche Expression von iNOS in den Herzen septischer Versuchstiere detektiert werden konnte, jedoch keine signifikante Induktion im Zeitverlauf über 36 h nach CASP-OP. Es muss jedoch angemerkt werden, dass hierdurch kein direkter Rückschluss auf die tatsächliche kardiale NO-Konzentration möglich ist. Womöglich spielt die absolute Konzentration von NO *in vivo* für die septische Kardiomyopathie auch nur eine untergeordnete Rolle, da beim Auftreten von oxidativem Stress, wie es bei einer Sepsis der Fall ist, NO durch das anfallende O_2^- zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) umgewandelt wird, das seinerseits toxisch wirkt und kardiale Kontraktilität reduzieren kann (Harrison et al., 1997).

Letztlich gilt festzustellen, dass NO-Inhibition als potenzielle therapeutische Intervention in klinischen Studien keine Verbesserung des Überlebens septischer Patienten zeigen konnte. Im Gegenteil zeichnete sich eher ein negativer Trend für das beobachtete Patientenkollektiv ab, was zum Abbruch der Studie führte (Bailey et al., 2007).

Somit muss zu Erklärung der in dieser Arbeit beobachteten Kardiodepression das Augenmerk auf andere Sepsismediatoren gerichtet werden. So stellt der beobachtete Anstieg der kardialen $TNF\alpha$ -Expression innerhalb der ersten 24 h nach Sepsisinduktion einen potenziellen Erklärungsmechanismus dar. Ähnliches scheint für den pro-inflammatorischen Mediator IL-1 β zu gelten, da gezeigt werden konnte, dass die Inkubation von Kardiomyozyten mit dem Serum von Sepsispatienten, welches hohe Konzentrationen beider Zytokine enthielt, die Kontraktilität der Kardiomyozyten *in vitro* signifikant reduzierte (Kumar et al., 1996; Kumar et al., 2007). $TNF\alpha$ ist in der Lage, die Bildung von Sphingosine zu induzieren, was eine Hemmung des Kalziumeinstromes durch den Ryanodin-Rezeptor im Kardiomyozyten und somit eine Abnahme der Kontraktilität zur Folge hat (Oral et al., 1997; Edmunds et al., 1999). Die angeführten Arbeiten konnten diese Effekte für im Serum zirkulierenden $TNF\alpha$ belegen, in dieser Arbeit wird jedoch erstmalig gezeigt, dass dieses Zytokin im Herzen selbst induziert wird, was die den kardiodepressiven Effekt vermutlich deutlich stärker beeinflussen dürfte.

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine signifikante Regulation von IL-6 18 h nach CASP-OP sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene im Herzen detektiert werden. Auch für dieses pro-inflammatorische Zytokin ist ein negativ inotoper Effekt in der Literatur vorbeschrieben (Zhang et al., 2007). Darüber hinaus ist bekannt, dass die Höhe der Serumkonzentrationen von IL-6 direkt mit der zu erwartenden Mortalität von Sepsispatienten auf

Intensivstationen korrelieren und es sich bei diesem Mediator gleichzeitig um einen sehr frühzeitig bestimmbar Marker handelt, der noch deutlich vor Serumelevationen von C-reaktivem Protein messbar ist (Hack et al., 1989; Pfeiffer et al., 1999). Bezogen auf die Expressionsdaten im Herzen und die Korrelation zur Hämodynamik in der vorliegenden Arbeit lässt sich feststellen, dass dieser hohe prädiktive Wert vermutlich in dem frühen kardialen Expressionspeak von IL-6 im Rahmen einer polymikrobiellen Sepsis begründet liegt. Der anschließende in diesem Modell beobachtete Rückgang des Expressionsniveaus zieht jedoch keine Verbesserung der Mortalitätsrate nach sich, sondern deutet vielmehr darauf hin, dass die Frühphase der Sepsis, in der die pro-inflammatorische Reaktion besonders intensiv ist, entscheidend für die Hämodynamik und letztlich für das Outcome der Versuchstiere zu sein scheint.

4.6 TLR-Abhängigkeit der kardialen Inflammation und Dysfunktion

Wie bereits beschrieben ist das angeborene Immunsystem via TLR in der Lage, eine kardiale Inflammation nach Stimulation durch entsprechende TLR-Liganden zu vermitteln und zu unterhalten. Die vorliegende Arbeit beleuchtet jedoch zum ersten Mal die Rolle einzelner TLR für die kardiale Inflammation und Funktion während einer polymikrobiellen Sepsis. So zeigte sich zum Zeitpunkt 18 h nach CASP-OP eine signifikant geringer ausgeprägte kardiale Inflammation in TLR9-D Versuchstieren als in den WT- und TLR-2D Versuchsgruppen. Gleichzeitig war die kardiale Funktion bei TLR9-D Tieren zu diesem Zeitpunkt verglichen mit der gesunden Vergleichspopulation nicht beeinträchtigt. TLR2-D Tiere zeigten hingegen das gleiche Bild eines hypodynamen septischen Kreislaufschocks wie WT-Mäuse nach CASP-OP. Aktuelle Arbeiten anderer Arbeitsgruppen zeigten im CLP-Modell einen Überlebensvorteil sowohl für TLR9- als auch für TLR2-Defizienz während einer polymikrobiellen Sepsis, einhergehend mit signifikant reduzierten Inflamationsparametern im Serum dieser Tiere (Alves-Filho et al., 2009; Plitas et al., 2008). In beiden Studien wurde diese Beobachtung durch eine signifikant geringere intraperitoneale Bakterienlast in den TLR-defizienten Tieren verglichen mit den septischen WT-Tieren erklärt. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch durch die Verwendung des CASP-Modells gezeigt werden, dass es keinen Unterschied in der intraperitonealen Bakterienzahl 18 h nach Sepsisinduktion zwischen WT- und TLR-D Tieren gab und somit die geringere kardiale Inflammation in der TLR9-D Gruppe nicht durch diesen Mechanismus alleine erklärt werden kann. Der im CLP-Modell gesehene, protektive Effekt der

TLR2-defizienz während einer polymikrobiellen Sepsis konnte in dieser Arbeit demnach nicht bestätigt werden. Gleichzeitig kann sogar noch durch Interaktion einzelner TLR untereinander die Immunantwort gegen gram-negative Erreger auch bei TLR2-defizienz reduziert sein (Wiersinga et al., 2007). Da wir zeigen konnten, dass im Rahmen der durch CASP-induzierten Sepsis ein im Zeitverlauf kontinuierlicher Anstieg von gram-positiven und gram-negativen Bakterien intraperitoneal zu beobachten war, ist die überschießende kardiale Inflammation und daraus resultierende septische Kardiomyopathie möglicherweise auf eine verstärkte Pathogenität gram-negativer Erreger zurückzuführen.

Die septische Kardiomyopathie scheint im vorliegenden Modell maßgeblich durch den TLR9 vermittelt zu sein, obwohl dieser Rezeptor erst sehr spät eine Regulation auf mRNA-Ebene während einer polymikrobiellen Sepsis erfährt. Im Umkehrschluss könnte dies bedeuten, dass bakterielle DNA ein besonders starker Trigger für die kardiale Inflammation ist und die nachfolgende Organdysfunktion begünstigt. Unterstützung erfährt diese Hypothese durch aktuelle Beobachtungen bezüglich des akuten Nierenversagens während einer polymikrobiellen Sepsis. So gelang es durch die Applikation von Chloroquin, einem Pharmakon, welches die endosomale Azidifizierung hemmt und somit auch den TLR9 blockiert, das akute Nierenversagen in einem polymikrobiellen Sepsismodell zu verhindern (Yasuda et al., 2008).

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich beim CASP-Modell um ein suffizientes Modell zur Induktion einer polymikrobiellen Sepsis handelt. Es ließ sich nach Implantation eines Dickdarmsstents eine kontinuierliche Freisetzung von Darmbakterien beobachten, wie sie auch im Rahmen von Anastomoseninsuffizienzen nach abdominalchirurgischen Eingriffen oder bei Durchwanderungsperitonitis beobachtet werden kann.

Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Peritonitis ausgelöst durch ein polymikrobielles Erregerspektrum eine kardiale Inflammation induziert. Diese zeigte einen zweiphasigen Verlauf, in dem initial während der ersten 24 h die pro-inflammatorischen Zytokine dominierten, um dann durch eine anti-inflammatorische Immunantwort abgelöst zu werden. Gleichzeitig ließ sich eine Regulation kardialer Immunrezeptoren beobachten. So zeigten die TLR2, -4 und -9 sowie CD-14 und TREM1 ein für jeden Rezeptor individuelles Expressionsprofil mit spezifischen Regulationspeaks.

Darüber hinaus entwickelten Mäuse bereits 18 h nach CASP-OP korrelierend zur kardialen Inflammation das Bild eines hypodynamen septischen Kreislaufschocks. Dies lag an einer deutlich reduzierten kardialen Kontraktilität mit in der Folge stark eingeschränktem HZV und Abfall des linksventrikulären end-systolischen Druckes.

Die in dieser Arbeit beobachtete kardiale Inflammation und die daraus folgende septische Kardiomyopathie im Rahmen einer polymikrobiellen Sepsis scheint überwiegend TLR9 vermittelt zu sein. So zeigten Mäuse, die für diesen Rezeptor defizient waren eine signifikant geringer ausgeprägte kardiale Inflammation. Gleichzeitig war die kardiale Funktion im Vergleich zur gesunden Vergleichspopulation nicht beeinträchtigt. TLR2-Defizienz scheint hingegen im Gegensatz zu früheren Beobachtungen keinen Einfluss auf die kardiale Inflammation und Funktion während einer polymikrobiellen Sepsis mit sich zu bringen.

6. Literaturverzeichnis

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801

Alexopoulou L, Thomas V, Schnare M, Lobet Y, Anguita J, Schoen RT, Medzhitov R, Fikrig E, Flavell RA. Hyporesponsiveness to vaccination with *Borrelia burgdorferi* OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. *Nat Med* 2002; 8: 878-884

Alves-filho JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto H, Silva JS, Gazzinelli RT, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 4018-4023

Andrejko KM, Chen J, Deutschman CS. Intrahepatic STAT-3 activation and acute phase gene expression predict outcome after CLP sepsis in the rat. *Am J Physiol* 1998; 275: G1423-G1429

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-1310

Ashare A, Powers LS, Butler NS, Doerschug KC, Monick MM, Hunninghake GW. Anti-inflammatory response is associated with mortality and severity of infection in sepsis. *Am J Physiol* 2005; 288: L633-L640

Bailey A, Pope TW, Moore SA, Campbell CL. The tragedy of TRIUMPH for nitric oxide synthesis inhibition in cardiogenic shock: where do we go from here? *Am J Cardiovasc Drugs* 2007; 7: 337-345

Baumgarten G, Knuefermann P, Schuhmacher G, Vervolgyi V, von Rappard J, Dreiner U, Fink K, Djoufack C, Hoeft A, Grohe C, Knowlton AA, Meyer R. Toll-like receptor 4, nitric oxide, and myocardial depression in endotoxemia. *Shock* 2006; 25: 43-49

Belcher E, Mitchell J, Evans T. Myocardial dysfunction in sepsis: no role for NO? *Heart* 2002; 87: 507-509

Bell JK, Botos I, Hall PR, Askins J, Shiloach J, Segal DM, Davies DR. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 10976-1080

Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5

Bleharski JR, Kiessler V, Buonsanti C, Sieling PA, Stenger S, Colonna M, Modlin RL. A role for triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in host defense during the early-induced and adaptive phases of the immune response. *J Immunol* 2003; 170: 3812-3818

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101: 1644-1655

Bouchon A, Facchetti F, Weigand MA, Colonna M. TREM-1 amplifies inflammation and is a crucial mediator of septic shock. *Nature* 2001; 410: 1103-1107

Brunkhorst FM. Epidemiology, economy and practice - results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet). *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2006; 41: 43-44

Cario E, Brown D, Mckee M, Lynch-Devaney K, Gerken G, Podolsky DK. Commensal-associated molecular patterns induce selective toll-like receptor-trafficking from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am J Pathol* 2002; 160: 165-173

Carlson DL, Willis MS, White DJ, Horton JW, Giroir BP. Tumor necrosis factor- α -induced caspase activation mediates endotoxin-related cardiac dysfunction. *Crit Care Med* 2005; 33: 1021-1028

Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003; 35: 535-544

Chalfin DB, Holbein ME, Fein AM, Carlon GC. Cost-effectiveness of monoclonal antibodies to gram-negative endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis in ICU patients. *JAMA* 1993; 269: 249-254

Colonna M, Facchetti F. TREM-1 (triggering receptor expressed on myeloid cells): a new player in acute inflammatory responses. *J Infect Dis* 2003; 187: 397-401

Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 2004; 5: 975-979

Copray JC, Mantingh I, Brouwer N, Biber K, Kust BM, Liem RS, Huitinga I, Tilders FJ, van Dam AM, Boddeke HW. Expression of interleukin-1 β in rat dorsal root ganglia. *J Neuroimmunol* 2001; 118: 203-211

Cotton JM, Kearney MT, Shah AM. Nitric oxide and myocardial function in heart failure: friend or foe? *Heart* 2002; 88: 564-566

De Belder AJ, Radomski MW, Why HJ, Richardson PJ, Bucknall CA, Salas E, Martin JF, Moncada S. Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet* 1993; 341: 84-85

Dong LW, Wu LL, Ji Y, Liu MS. Impairment of the ryanodine-sensitive calcium release channels in the cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism during the hypodynamic phase of sepsis. *Shock* 2001; 16: 33-39

Drexler H, Kastner S, Strobel A, Studer R, Brodde OE, Hasenfuss G. Expression, activity and functional significance of inducible nitric oxide synthase in the failing human heart. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 955-963

Edmunds NJ, Lal H, Woodward B. Effects of tumour necrosis factor- α on left ventricular function in the rat isolated perfused heart: possible mechanisms for a decline in cardiac function. *Br J Pharmacol* 1999; 126: 189-196

Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* 1992; 257: 387-389

Flynn A, Chokkalingam MB, Mather PJ. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. *Heart Fail Rev* 2010; 6: 605-611

Frantz S, Ertl G, Bauersachs J. Mechanisms of disease: Toll-like receptors in cardiovascular disease. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2007; 4: 444-454

Frantz S, Kelly RA, Bourcier T. Role of TLR-2 in the activation of nuclear factor κ B by oxidative stress in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 2001; 276: 5197-5203

Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT, Kelly RA. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest* 1999; 104: 271-280

Fukuchi M, Hussain SN, Giaid A. Heterogeneous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure: their relation to lesion site and β -adrenergic receptor therapy. *Circulation* 1998; 98: 132-139

Gay NJ, Gangloff M, Weber AN. Toll-like receptors as molecular switches. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 693-698

Gewirtz AT, Navas TA, Lyons S, Godowski PJ, Madara JL. Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol* 2001; 167: 1882-1885

Ghiselli R, Giacometti A, Cirioni O, Mocchegiani F, Orlando F, D'amato G, Sisti V, Scalise G, Saba V. Cecropin B enhances betalactams activities in experimental rat models of gram-negative septic shock. *Ann Surg* 2004; 239: 251-256

Gibot S, Massin F, Le RP, Bene MC, Faure GC, Bollaert PE, Levy B. Surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1: expression patterns in murine sepsis. *Crit Care Med* 2005; 33: 1787-1793

Glenn TM, Lefer AM, Martin JB, Lovett WL, Morris JN Jr, Wangenstein SL. Production of a myocardial depressant factor in cardiogenic shock. *Am Heart J* 1971; 82: 78-85

Hack CE, Aarden LA, Thijs LG. Role of cytokines in sepsis. *Adv Immunol* 1997; 66: 101-195

Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, Thijs LG, Aarden LA. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood* 1989; 74: 1704-1710

Harrison DG. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest* 1997; 100: 2153-2157

Hawn TR, Verbon A, Lettinga KD, Zhao LP, Li SS, Laws RJ, Skerrett SJ, Beutler B, Schroeder L, Nachman A, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* 2003; 198: 1563-1572

Haywood GA, Tsao PS, von der Leyen HE, Mann MJ, Keeling PJ, Trindade PT, Lewis NP, Byrne CD, Rickenbacher PR, Bishopric NH, Cooke JP, McKenna WJ, Fowler MB. Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation* 1996; 93: 1087-1094

Hegde A, Uttamchandani M, Mochhala SM, Bhatia M. Plasma cytokine profiles in preprotachykinin-A knockout mice subjected to polymicrobial sepsis. *Mol Med* 2010; 16: 45-52

Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Gellert T, Dietrich H, Lipford G, Takeda K, Akira S, Wagner H, Bauer S. The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* 2003; 33: 2987-2997

Heyland DK, Hopman W, Coe H, Tranmer J, McColl MA. Long-term health-related quality of life in survivors of sepsis Short Form 36: a valid and reliable measure of health-related quality of life. *Crit Care Med* 2000; 28: 3599-3605

Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987-995

Jafri SM, Lavine S, Field BE, Bahorozian MT, Carlson RW. Left ventricular diastolic function in sepsis. *Crit Care Med* 1990; 18: 709-714

Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 197-216

Janssen BJ, De Celle T, Debets JJ, Brouns AE, Callahan MF, Smith TL. Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am J Physiol* 2004; 287: H1618-H1624

Joulin O, Petillot P, Labalette M, Lancel S, Neviere R. Cytokine profile of human septic shock serum inducing cardiomyocyte contractile dysfunction. *Physiol Res* 2007; 56: 291-297

Kan H, Finkel MS. Inflammatory mediators and reversible myocardial dysfunction. *J Cell Physiol* 2003; 195: 1-11

- Kawaguchi H, Shin WS, Wang Y, Inukai M, Kato M, Matsuo-Okai Y, Sakamoto A, Uehara Y, Kaneda Y, Toyo-Oka T. In vivo gene transfection of human endothelial cell nitric oxide synthase in cardiomyocytes causes apoptosis-like cell death Identification using Sendai virus-coated liposomes. *Circulation* 1997; 95: 2441-2447
- Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat Immunol* 2006; 7: 131-137
- Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S, Conway S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 2004; 5: 104-112
- Khachatryan ZA, Ktsoyan ZA, Manukyan GP, Kelly D, Ghazaryan KA, Aminov RI. Predominant role of host genetics in controlling the composition of gut microbiota. *PLoS One* 2008; 3: 3064
- Knapp S, Gibot S, de Vos A, Versteeg HH, Colonna M, van Der Poll T. Cutting edge: expression patterns of surface and soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in human endotoxemia. *J Immunol* 2004; 173: 7131-7134
- Knuefermann P, Nemoto S, Misra A, Nozaki N, Defreitas G, Goyert SM, Carabello BA, Mann DL, Vallejo JG. CD14-deficient mice are protected against lipopolysaccharide-induced cardiac inflammation and left ventricular dysfunction. *Circulation* 2002; 106: 2608-2615
- Knuefermann P, Sakata Y, Baker JS, Huang CH, Sekiguchi K, Hardarson HS, Takeuchi O, Akira S, Vallejo JG. Toll-like receptor 2 mediates *Staphylococcus aureus*-induced myocardial dysfunction and cytokine production in the heart. *Circulation* 2004; 110: 3693-3698
- Knuefermann P, Schwederski M, Velten M, Krings P, Ehrentraut H, Rudiger M, Boehm O, Fink K, Dreiner U, Grohe C, Hoeft A, Baumgarten G, Koch A, Zacharowski K, Meyer R. Bacterial DNA induces myocardial inflammation and reduces cardiomyocyte contractility: role of toll-like receptor 9. *Cardiovasc Res* 2008; 78: 26-35
- Kumar A, Paladugu B, Mensing J, Parrillo JE. Transforming growth factor- β 1 blocks in vitro cardiac myocyte depression induced by tumor necrosis factor- α , interleukin- 1β , and human septic shock serum. *Crit Care Med* 2007; 35: 358-364
- Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor α and interleukin 1β are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med* 1996; 183: 949-958
- Laduca JR, Gaspari AA. Targeting tumor necrosis factor α . New drugs used to modulate inflammatory diseases. *Dermatol Clin* 2001; 19: 617-635
- Lanone S, Mebazaa A, Heymes C, Henin D, Poderoso JJ, Panis Y, Zedd AC, Billiar T, Payen D, Aubier M, Boczkowski J. Muscular contractile failure in septic patients: role of the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2308-2315

Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, Lien E, Nilsen NJ, Espevik T, Golenbock DT. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* 2004; 5: 190-198

Lee J, Chuang TH, Redecke V, She L, Pitha PM, Carson DA, Raz E, Cottam HB. Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 6646-6651

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.*2003; 4: 530-538

Lim YC, Snapp K, Kansas GS, Camphausen R, Ding H, Luscinskas FW. Important contributions of P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated secondary capture to human monocyte adhesion to P-selectin, E-selectin, and TNF- α -activated endothelium under flow in vitro. *J Immunol* 1998; 161: 2501-2525

Liu S, Schreuer KD. G protein-mediated suppression of L-type Ca²⁺ current by interleukin-1 β in cultured rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1995; 268: H339-H349

Maass DL, White J, Horton JW. IL-1 β and IL-6 act synergistically with TNF- α to alter cardiac contractile function after burn trauma. *Shock* 2002; 18: 360-366

Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Huser N, Holzmann B, Stier A, Pfeffer K, Heidecke CD. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* 2004; 21: 505-511

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 2003; 348: 1546-1554

Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, Oshiumi H, Shingai M, Seto Y, Yamamoto A, Seya T. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* 2003; 171: 3154-3162

Meylan E, Tschopp J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger anti-viral responses. *Mol Cell* 2006; 22: 561-569

Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006; 442: 39-44

Moerer O, Quintel M. Sepsis in adult patients - definitions, epidemiology and economic aspects. *Internist* 2009; 50: 790-794

Moynagh PN. TLR signalling and activation of IRFs: revisiting old friends from the NF- κ B pathway. *Trends Immunol* 2005; 26: 469-476

Munt B, Jue J, Gin K, Fenwick J, Tweeddale M. Diastolic filling in human severe sepsis: an echocardiographic study. *Crit Care Med* 1998; 26: 1829-1833

- Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 173-182
- Neish AS, Gewirtz AT, Zeng H, Young AN, Hobert ME, Karmali V, Rao AS, Madara JL. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I κ B- α ubiquitination. *Science* 2000; 289: 1560-1563
- Nemoto S, Vallejo JG, Knuefermann P, Misra A, Defreitas G, Carabello BA, Mann DL. Escherichia coli LPS-induced LV dysfunction: role of toll-like receptor-4 in the adult heart. *Am J Physiol* 2002; 282: 2316-2323
- Niederbichler AD, Hoesel LM, Westfall MV, Gao H, Ipaktchi KR, Sun L, Zetoune FS, Su GL, Arbabi S, Sarma JV, Wang SC, Hemmila MR, Ward PA. An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction. *J Exp Med* 2006; 203: 53-61
- Opal SM, Cohen J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* 1999; 27: 1608-1616
- Oral H, Dorn GW, Mann DL. Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte. *JBiolChem* 1997; 272: 4836-4842
- Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, Udagawa J, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* 2003; 170: 3977-3985
- Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 13766-13771
- Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2010; 20: 87-103
- Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, Abraham E. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004; 279: 7370-7377
- Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W. A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. *J Clin Invest* 1985; 76: 1539-1553
- Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113: 227-242

- Patel D, Duke K, Light RB, Jacobs H, Mink SN, Bose D. Impaired sarcoplasmic calcium release inhibits myocardial contraction in experimental sepsis. *J Crit Care* 2000; 15: 64-72
- Pedersen G, Andresen L, Matthiessen MW, Rask-Madsen J, Brynskov J. Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. *Clin Exp Immunol* 2005; 141: 298-306
- Petnicki-Ocwieja T, Hrnecir T, Liu Y J, Biswas A, Hudcovic T, Tlaskalova-Hogenova H, Kobayashi KS. Nod2 is required for the regulation of commensal microbiota in the intestine. *Proc Natl Acad Sci* 2009; 106: 15813-15818
- Pfeiffer KA, Reinsberg J, Rahmun A, Schmolling J, Krebs D. Clinical application of maternal serum cytokine determination in premature rupture of membranes--interleukin-6, an early predictor of neonatal infection? *Acta Obstet Gynecol Scand* 1999; 78: 774-778
- Plitas G, Burt BM, Nguyen HM, Bamboat ZM, Dematteo RP. Toll-like receptor 9 inhibition reduces mortality in polymicrobial sepsis. *J Exp Med* 2008; 205: 1277-1283
- Poelaert J, Declerck C, Vogelaers D, Colardyn F, Visser CA. Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. *Intensive Care Med* 1997; 23: 553-560
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 1998; 282: 2085-2088
- Prinsen JH, Baranski E, Posch H, Tober K, Gerstmeyer A. Interleukin-6 as diagnostic marker for neonatal sepsis: determination of access IL-6 cutoff for newborns. *Clin Lab* 2008; 54: 179-183
- Rabuel C, Mebazaa A. Septic shock: a heart story since the 1960s. *Intensive Care Med* 2006; 32: 799-807
- Reddy RC, Chen GH, Tekchandani PK, Standiford TJ. Sepsis-induced immunosuppression: from bad to worse. *Immunol Res* 2001; 24: 273-287
- Remick DG. Cytokine therapeutics for the treatment of sepsis: why has nothing worked? *Curr Pharm Des* 2003; 9: 75-82
- Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs cecal ligation and puncture. *Shock* 2000; 13: 110-116
- Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001; 345: 1368-1377

Sands KE, Bates DW, Lancken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, Parsonnet J, Panzer R, Orav EJ, Snyderman DR, Black E, Schwartz JS, Moore R, Johnson BL Jr, Platt R. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997; 278: 234-240

Sarafidis K, Soubasi-Griva V, Piretzi K, Thomaidou A, Agakidou E, Taparkou A, Diamanti E, Drossou-Agakidou V. Diagnostic utility of elevated serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM)-1 in infected neonates. *Intensive Care Med* 2010; 36: 864-868

Schwartz SM, Duffy JY, Pearl JM, Nelson DP. Cellular and molecular aspects of myocardial dysfunction. *Crit Care Med* 2001; 29: 214-219

Shah AM, Spurgeon HA, Sollott SJ, Talo A, Lakatta EG. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca^{2+} in intact cardiac myocytes. *CircRes* 1994; 74: 970-978

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 335-376

Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001; 13: 933-940

Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002; 169: 10-14

Tao W, Deyo DJ, Traber DL, Johnston WE, Sherwood ER. Hemodynamic and cardiac contractile function during sepsis caused by cecal ligation and puncture in mice. *Shock* 2004; 21: 31-37

Tavener SA, Long EM, Robbins SM, Mcrae KM, van Remmen H, Kubes P. Immune cell Toll-like receptor 4 is required for cardiac myocyte impairment during endotoxemia. *Circ Res* 2004; 95: 700-707

Traeger T, Koerner P, Kessler W, Cziupka K, Diedrich S, Busemann A, Heidecke CD, Maier S. Colon ascendens stent peritonitis (CASP)-a standardized model for polymicrobial abdominal sepsis. *J Vis Exp* 2010; 46: 2299

Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999; 285: 248-251

Watkins LR, Maier SF, Goehler LE. Immune activation: the role of pro-inflammatory cytokines in inflammation, illness responses and pathological pain states. *Pain* 1995; 63: 289-302

Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *NEnglJMed* 1999; 340: 207-214

Wiersinga WJ, Wieland CW, Dessing MC, Chantratita N, Cheng AC, Limmathurotsakul D, Chierakul W, Leendertse M, Florquin S, de Vos AF, White N, Dondorp AM, Day NP, Peacock van der Poll SJ. Toll-like receptor 2 impairs host defense in gram-negative sepsis caused by *Burkholderia pseudomallei* (Meliodiosis). *PLoS Med* 2007; 4: 248

Winters BD, Eberlein M, Leung J, Needham DM, Pronovost PJ, Sevransky JE. Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med* 2010; 38: 1276-1283

Wu AH. Increased troponin in patients with sepsis and septic shock: myocardial necrosis or reversible myocardial depression? *Intensive Care Med* 2001; 27: 959-961

Wu LL, Ji Y, Dong LW, Liu MS. Calcium uptake by sarcoplasmic reticulum is impaired during the hypodynamic phase of sepsis in the rat heart. *Shock* 2001; 15: 49-55

Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, Susarla SM, Ulloa L, Wang H, Diraimo R, Czura CJ, Wang H, Roth J, Warren HS, Fink MP, Fenton MJ, Andersson U, Tracey KJ. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 296-301

Yasuda H, Leelahavanichkul A, Tsunoda S, Dear JW, Takahashi Y, Ito S, Hu X, Zhou H, Doi K, Childs R, Klinman DM, Yuen PS, Star RA. Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury. *Am J Physiol* 2008; 294: R1050-R1058

Zhang H, Wang HY, Bassel-Duby R, Maass DL, Johnston WE, Horton JW, Tao W. Role of interleukin-6 in cardiac inflammation and dysfunction after burn complicated by sepsis. *Am J Physiol* 2007; 292: H2408-H2416