

**Die Rolle des Darmes in der systemischen Inflammation:
Mediatorfreisetzung in der Endotoxinämie**

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

vorgelegt von: Bettina Maja Buchholz
aus: Paderborn
Erscheinungsjahr: 2005

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Jörg C. Kalff
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Putensen

Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2005

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Aus: Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie,
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Hirner

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Die inflammatorische Kaskade: SIRS, Sepsis und Multiorganversagen	5
1.2	Entwicklung und Kenntnisstand der Sepsisforschung.....	7
1.3	Die inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α	11
1.4	Hypothese und Fragestellung	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Tiere.....	13
2.2	Experimentelle Gruppen	13
2.3	Organentnahme und Präparation	13
2.4	Reverse-Transcription Polymerase-Chain-Reaction (RT-PCR)	15
2.4.1	RNA-Extraktion	16
2.4.2	cDNA-Synthese	17
2.4.3	Konventionelle RT-PCR.....	18
2.4.4	Real-time RT-PCR.....	20
2.5	Serumproteinspiegel portalvenös und caval	23
2.6	Histochemie der Darmmuskularis (MPO-Färbung)	24
2.7	Differentialanalyse des systemischen Blutes	25
2.8	Verwendete Chemikalien	25
2.9	Statistik der Datenanalyse	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Generelle Beobachtungen	27
3.2	Analyse der mRNA-Induktion.....	27
3.2.1	Konventionelle RT-PCR.....	27
3.2.2	Real-time RT-PCR.....	28
3.3	Serumproteinspiegel portalvenös und caval	33
3.4	Histochemie der Darmmuskularis (MPO-Färbung)	35

3.5	Differentialanalyse des systemischen Blutes	36
4	Diskussion.....	39
5	Zusammenfassung	53
6	Literatur.....	55
7	Danksagung.....	62
8	Lebenslauf	63

1 Einleitung

1.1 Die inflammatorische Kaskade: SIRS, Sepsis und Multiorganversagen

Das Multiorganversagen findet sich bei 15 % der Patienten der Intensivstationen und bleibt trotz großer Fortschritte der Intensivmedizin eine der führenden Todesursachen auf Intensivstationen (Nieuwenhuijzen et al., 1996a). Ist das Stadium des Multiorganversagens erreicht, so sind die Überlebenschancen trotz intensiver Therapie stark limitiert. Deitch beschrieb 1992 eine Mortalität des Multiorganversagens von nahezu 70 %, wobei das Multiorganversagen in 50 - 80 % als Todesursache auf einer chirurgischen Intensivstation verantwortlich war (Deitch, 1992). Neuere epidemiologische Studien berichteten zwar über eine fallende Mortalitätsrate von aktuell 53 % in Europa bei jedoch steigender Inzidenz der Sepsis (Sessler et al., 2004).

Bekannt in der Entwicklung des Multiorganversagens ist eine inflammatorische Kaskade mit einem Spektrum von Reaktionen des menschlichen Immunsystems auf eine Infektion. Die einzelnen Stadien können aufeinander folgen, beginnend mit der systemischen Entzündungsreaktion (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) über eine Sepsis und den septischen Schock bis hin zur Multiorgandysfunktion (MODS), oder unabhängig voneinander entstehen. Als auslösende Faktoren der systemischen Inflammation wurden die Endotoxinämie sowie Situationen ohne mikrobiologischen Nachweis eines Infektfokus (chirurgische Darmmanipulation, hämorrhagischer Schock, Ischämie-Reperfusion, Pankreatitis, mechanische Gewebstraumata) beschrieben (Goris, 1996). Unabhängig von der Ursache ist die nachfolgende inflammatorische Antwort qualitativ ähnlich und die assoziierte Morbidität und Mortalität vergleichbar.

Auf ein physisches Trauma folgt initial eine physiologische Reaktion mit Aktivierung des Immunsystems. Bei Verlust der lokalen Kontrolle über das aktivierte Immunsystem kann sich eine systemische Reaktion, welche sich klinisch als SIRS präsentiert, entwickeln (Davies und Hagen, 1997). Nach der Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine im Jahr 1991 ist SIRS als Reaktion auf einen unspezifischen Auslöser mit zwei oder mehr Veränderungen von

Temperatur ($> 38\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder $< 36\text{ }^{\circ}\text{C}$), Herzfrequenz (> 90 Schläge pro Minute), Atemfrequenz (> 20 Respirationen pro Minute oder $\text{pCO}_2 < 32\text{ mmHg}$) und des weißen Blutbildes ($> 12.0\text{ G/l}$ oder $< 4\text{ G/l}$) definiert.

Die Weiterentwicklung zu einer Sepsis bedarf einem dokumentierten infektiösen Prozess, bei einer schweren Sepsis zusätzlich mit hämodynamischen Veränderungen. Beim septischen Schock findet sich zusätzlich eine manifeste, persistierende Hypotonie trotz adäquatem Volumenersatz assoziiert mit Symptomen der Hypoperfusion (Rangel-Frausto et al., 1995).

Als klinisches Korrelat der exzessiven Immunantwort findet sich neben Tachypnoe, Tachykardie, Fieber und Leukozytose auch eine erhöhte Gefäßpermeabilität sowie disseminierte intravasale Koagulopathie. Mit dem Übergang einer hyperreaktiven Immunantwort in eine hyporeaktive Immunreaktion im dynamischen Zeitverlauf während der Sepsis wandeln sich die klinischen Symptome und es finden sich gehäuft Oedeme, Leukopenie, verminderte Zellfunktion der Immunzellen und Gewebsschädigung bis zum Multiorganversagen (Sessler et al., 2004).

Die Relevanz des SIRS in der heutigen Zeit lässt sich mit Daten aus der Italian Sepsis Study belegen, die Autoren fanden SIRS bei 58 % der im Zeitraum von einem Jahr untersuchten Intensivpatienten, Sepsis bei 16,3 %, schwere Sepsis bei 5,5 % und septischen Schock bei 6,1 % der Patienten (Salvo et al., 1995). In neueren epidemiologischen Untersuchungen in Nordamerika fand sich eine Inzidenz der Sepsis von 0,3 % der Gesamtbevölkerung. Die Mortalitätsrate der Sepsis lag bei 30 bis 40 %, im septischen Schock sogar bei 50 % (Cohen, 2002). Ursächlich fanden sich hauptsächlich pulmonale und abdominelle Infektionen sowie Infektionen des Harntraktes und des Blutes.

In 60 % der untersuchten Fälle der oben genannten epidemiologischen Untersuchungen konnte eine Infektion mit gram-negativen Erregern gefunden werden. Infektionen mit gram-negativen Erregern können vor allem ihren Ursprung im Darm nehmen, denn endoluminal finden sich mehr Bakterien als der Mensch Körperzellen besitzt (Alverdy et al., 2003). Der Darm scheint aber nicht nur als Infektionsquelle, sondern auch als Teil des Immunsystems eine große Rolle zu spielen. Ungefähr die Hälfte bis Zweidrittel der gesamten lymphatischen Zellen des Körpers sind als darmassoziiertes lymphatisches

Gewebe zusammengefasst (gut-associated lymphatic tissue, GALT) (James et al., 1988). Neben der Lokalisation lymphatischer Zellen in den Peyer'schen Plaques zeigten experimentelle Studien die Existenz eines residenten Netzwerkes von Makrophagen in der intestinalen Tunica muscularis (Kalff et al., 1998).

1.2 Entwicklung und Kenntnisstand der Sepsisforschung

Nach Baue beschreibt der Begriff Sepsis den physischen Status eines Lebewesens, macht jedoch keine Aussage über die Genese oder Diagnose der zugrundeliegenden Erkrankung. Trotzdem sollte die weitere Forschung zum Verständnis der Pathogenese der Sepsis eine herausragende Stellung einnehmen, um effiziente Therapieansätze zur Prophylaxe der Sepsis beziehungsweise bei bereits manifester Sepsis zu erarbeiten.

Bereits 1973 wurde durch Tilney et al. das Auftreten einer gleichzeitigen Dysfunktion mehrerer initial unbeteiligter Organe beschrieben, welches auf einen hämorrhagischen Schock durch hohe intraoperative Blutverluste bei rupturierten Aortenaneurysmen zurückgeführt wurde (Tilney et al., 1973). Kurz darauf vertrat Baue die Hypothese, dass generell ein schweres lokales Trauma zu einem Versagen entfernter Organe führen könne (Baue, 1975). Der Begriff Multiorganversagen (MOV) wurde zur Beschreibung dieses Syndroms durch Eisemann und Fry geprägt (Eiseman et al., 1977), (Fry et al., 1980), ursprünglich jedoch als Zeichen einer okkulten oder unkontrollierten Infektion angesehen (Fry et al., 1980), (Polk und Shields, 1977). Im Verlauf zeigte sich jedoch ein Auftreten von MOV auch in Abwesenheit von Infektionen, unter anderem bei mechanischen Traumata, Verbrennungen, akuter Pankreatitis sowie hämorrhagischem Schock.

Mit dem Fortschritt der Sepsisforschung mehrten sich die Hinweise darauf, dass der Darm eine große Rolle in der Entwicklung einer systemischen Infektion und somit in der Entstehung von Sepsis und Multiorganversagen spielen könnte. So zeigte sich in klinischen Studien eine Assoziation zwischen Darmdysfunktion und Infektion sowie Multiorgandysfunktion. In einer Podiumsdiskussion der Surgical Infection Society im

Jahre 1985 und in ihren späteren Publikationen bezeichneten Meakins und Marshall den Darm als Motor des Multiorganversagen in der systemischen Inflammation (Carrico et al., 1986), (Meakins und Marshall, 1986). Aufgrund experimenteller Daten wurde ab Mitte der 80-iger Jahre leitend durch die Forschergruppe um Deitch die Hypothese vertreten, dass eine para- oder transzelluläre Translokation von endoluminalen Bakterien und Bakterienbestandteilen beziehungsweise ihrer Endo- und Exotoxine für die Auslösung und Aufrechterhaltung der systemischen Inflammation anzuschuldigen sei. Die Translokation wurde durch den Zusammenbruch der Darmmukosabarriere (zum Beispiel nach splanchnischer Hypoperfusion durch hämorrhagischen Schock) ermöglicht (Alexander et al., 1990). Es konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Translokation durch eine endoluminale bakterielle Überwucherung bei intestinaler Stase, wie sie im Rahmen der Sepsis-induzierten Darmmotilitätsstörung oder bei einer Störung der normalen Darmflora vorkommt, begünstigt wird (Wells et al., 1992). Als Transportweg der translozierten Bakterien in die systemische Zirkulation wurde der portalvenöse Blutweg angenommen.

Jedoch konnten in klinischen Studien vitale Bakterien im portalvenösen Blut oder den mesenterialen Lymphknoten nicht nachgewiesen werden (Moore et al., 1991), (Peitzman et al., 1991). In Studien zur selektiven Darmdekontamination konnte zwar nachweislich die Inzidenz der infektiösen Komplikationen reduziert, jedoch keine signifikante Senkung der Mortalitätsraten bei Hochrisikopatienten erreicht werden (Reidy et al., 1990). Klinisch konnte zwar eine Assoziation von pathologischer bakterieller oder mykotischer Besiedlung des oberen Gastrointestinaltraktes mit der Entwicklung von Multiorganversagen aufgezeigt werden, wobei die pathologische Besiedlung das systemische mikrobielle Milieu widerspiegelte. Eine Kausalität des Verhältnisses zwischen pathologischer Darmbesiedlung und systemischer Infektion konnte aber nicht nachgewiesen werden (Marshall et al., 1993). Diese Ergebnisse stellten die Relevanz und Kausalität der bakteriellen Translokation in der Beteiligung des Darmes am Sepsisgeschehen in Frage. In einem Depletionsmodell von Makrophagen der Milz und Leber konnte gezeigt werden, dass nicht die bakterielle Translokation, sondern die ausgeprägte Aktivierung von Makrophagen mit einer erhöhten Mortalität assoziiert war (Nieuwenhuijzen et al., 1993). Die bakterielle Translokation oder Infektionen mit

Bakterien der Darmflora wurden nun als „Epiphänomen“ in kritischen Erkrankungsstadien gesehen (Nieuwenhuijzen et al., 1996b).

Es wurde die Hypothese erstellt, dass lokal im Darm produzierte Mediatoren verantwortlich seien und der Darm als Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus Zytokine freisetzt (Deitch et al., 1994), (Mainous et al., 1995). Gelangten die Zytokine in die systemische Zirkulation, konnten sie auch entfernte Organe schädigen. Hierdurch kam der Begriff der „Autointoxikation“ beziehungsweise der „autodestruktiven Entzündungsreaktion“ auf. Die proinflammatorischen und antiinflammatorischen Reaktionen würden sich gegenseitig verstärken und hierdurch einen Zustand zunehmender destruktiver immunologischer Dissonanz hervorrufen (Bone, 1996). Nun wurde zwar das inflammatorische, unkontrollierte Immunsystem als „Motor des Multiorganversagens“ angesehen, jedoch sei der Darm einer der Hauptantriebsquellen des Motors (Swank und Deitch, 1996). Auf zellulärer Ebene wurde ein residentes Netz aus Makrophagen in der zirkulären Tunica muscularis als eine Quelle der Zytokinfreisetzung identifiziert (Kalff et al., 1998).

Dieses residente Makrophagennetz ist unserer Anschauung nach durch einen potenten LPS-Stimulus beziehungsweise Exo- oder Endotoxine sowie nicht infektiöse Stimuli (Ischämie-Reperfusion, hämorrhagischer Schock, intestinale Manipulation) lokal aktivierbar. Über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren erfolgt die Induktion der vermehrten lokalen Sekretion inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und anderer kinetisch aktiver Mediatoren wie Prostaglandine (PGE) via Cyclooxygenase-2 (COX-2) und Stickstoffmonoxid (NO) via induzierbarer NO-Synthetase (iNOS). Diese triggern die systemische Inflammation und führen zu einer leukozytären Rekrutierung und Infiltration der Darmwandmuskularis über eine Aufregulierung der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und P-Selectin (Bauer et al., 2002). Aus der mit diesen Vorgängen korrelierenden biphasischen Muskelkontraktilitätshemmung der intestinalen Tunica muscularis resultiert eine intestinale Dysfunktion mit verlängertem intestinalem Transit (Kalff et al., 1999a). Die hierdurch hervorgerufene intestinale Stase und bakterielle Überwucherung führt zu einem weiteren Zusammenbruch der mukosalen Barriere und Translokation beziehungsweise parazellulärer Permeabilitäts-erhöhung für bakterielle Bestandteile und Toxine mit erneutem LPS-Stimulus (Deitch et al., 1994),

(Mainous et al., 1995), (Nieuwenhuijzen et al., 1996b). Somit entsteht eine Perpetuierung des Vorganges im Sinne eines Circulus vitiosus.

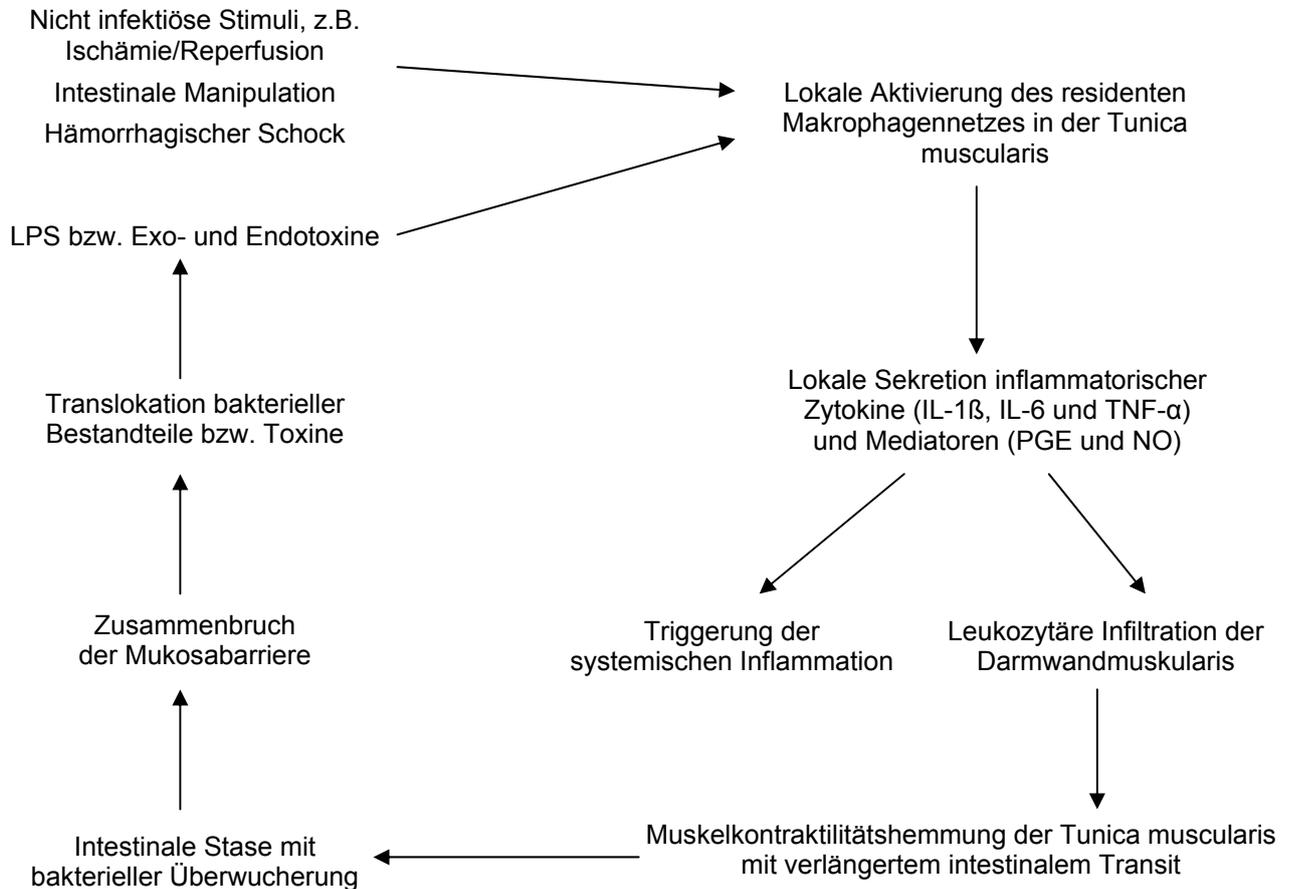


Fig. 1. Die Abbildung verdeutlicht den Circulus vitiosus in der Pathogenese des septischen Ileus.

Insgesamt trägt die lokale Produktion und Freisetzung inflammatorischer Zytokine (IL-1 β , IL-6 und TNF- α) sowie anderer Mediatoren (NO und PGE) zu einem Fortbestehen beziehungsweise Fortschreiten der systemischen Inflammation bei. Im hämorrhagischen Schock wurden erhöhte portalvenöse Level von IL-6 und TNF- α im Vergleich zu kardialen Zytokinspiegeln beschrieben als Hinweis auf den Transportweg der lokal produzierten Zytokine über das portalvenöse Gefäßsystem (Deitch et al., 1994). Ebenso wurde über eine signifikant höhere Bakteriämie portalvenös im Vergleich zur systemischen Zirkulation nach intraperitonealer Zyמושangabe berichtet (Mainous et al., 1995).

1.3 Die inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α

TNF- α wird von den Zellen des mononukleären Systems wie Monozyten und Gewebsmakrophagen produziert und bewirkt unter anderem die Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark sowie deren extravasale Transmigration und Aktivierung, aber auch die Differenzierung und Aktivierung der mononukleären Zellen selbst. Ferner induziert es neben anderen Faktoren wie LPS die Freisetzung von IL-1, wobei wiederum Monozyten und Gewebsmakrophagen die primäre Quelle darstellen.

Neben der membrangebundenen Form IL-1 α existiert die lösliche Form IL-1 β , beide verstärken die Synthese von Granulozyten/Makrophagen - Colony Stimulating Factor (GM-CSF) und hepatischen Akute-Phase-Proteinen sowie die Chemotaxis von aktivierten Leukozyten.

Das Zytokin IL-6 stimuliert B-Zellen und zytotoxische T-Zellen, wirkt zusammen mit IL-1 auf die Thymozytenproliferation und fördert synergistisch mit TNF- α die T-Zell-Proliferation sowie die Aktivierung und Akkumulation von polymorphonukleären Neutrophilen (PMN) (Davies und Hagen, 1997). IL-6 hat sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkungen.

1.4 Hypothese und Fragestellung

Zu den Gewebsmakrophagen als einer der Produktionsorte der inflammatorischen Zytokine gehören neben den alveolären Makrophagen, Kupffer-Zellen der Leber, zerebralen Gliazellen und peritonealen Makrophagen auch ein residentes Netz von Makrophagen in der Tunica muscularis des Intestinums (Kalff et al., 1998). In der durch Endotoxine verursachten Sepsis wird dem Darm eine Hauptrolle bei der Produktion inflammatorischer Mediatoren zugeschrieben (Mainous et al., 1995). Die inflammatorischen Mediatoren können über die systemische Zirkulation auch entfernte Organe schädigen. Damit nimmt der Darm eine besondere Bedeutung in der Entstehung einer systemischen Entzündungsreaktion mit Funktionseinschränkung multipler Organe, wie z.B. Lunge, Niere, Leber und Darm, bis hin zum Multiorganversagen ein.

Ziel dieser Arbeit war die weitere Klärung der Rolle des Darmes und speziell der Tunica muscularis in der systemischen Inflammation mit Endotoxinämie.

Die Untersuchungen sollten über die folgenden Fragestellungen Aufschluss geben und weitere Folgerungen ermöglichen:

1. Ist der Darm der „first responder“ auf einen inflammatorischen Stimulus? Gibt es also einen unterschiedlichen Zeitverlauf der Induktion und Produktion der inflammatorischen Zytokine in den einzelnen Organen und leitet der Darm die systemische Entzündungskaskade ein?
2. Ist der Darm der Hauptproduktionsort der inflammatorischen Zytokine und somit der „Dirigent im Orchester“ der systemischen Inflammation, d.h. unterhält und bestimmt hauptsächlich der Darm den weiteren Verlauf der systemischen Inflammation?
3. Besteht ein Unterschied zwischen den einzelnen Darmwandschichten getrennt in Mukosa und Muskularis?
4. Lässt sich das portalvenöse Blutgefäßsystem als Transportweg der lokal im Darm freigesetzten inflammatorischen Zytokine in die systemische Zirkulation nachweisen?

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Als Versuchstiere dienten männliche Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 8 bis 10 Wochen mit einem durchschnittlichen Gewicht von 250 Gramm. Die Tierversuche wurden nach den Richtlinien des Tierschutzgesetzes durchgeführt und der Tierversuchsantrag (23.203.2 BN 9, 3/98) von den zuständigen Stellen genehmigt. Die Ratten wurden in einem beheizten Raum mit 12-stündigem Hell-/Dunkel-Zyklus gehalten und mit kommerziellem Rattenfutter sowie Wasser ad libitum ernährt.

2.2 Experimentelle Gruppen

Den Ratten wurde einmalig 15 mg/kg Lipopolysaccharid (LPS, O111 : B4 Escherichia coli, Sigma L 4130) als Bolus intraperitoneal nach Desinfektion der Injektionsstelle unter kurzer offener Inhalationsnarkose mit Methoxyflurane verabreicht. Durch entsprechende Verdünnung der LPS-Stock-Lösung von 50 mg/ml mit Kochsalzlösung entsprach dies einem Volumen von 1,0 bis 1,1 ml pro Tier. Nach Beobachtung während der Aufwachphase wurden die Tiere in ihren Käfig zurückgesetzt. Als Kontrollgruppe dienten unbehandelte Tiere.

Die jeweiligen Blut- und Organentnahmen wurden bei den behandelten Tieren zu den Zeitpunkten 3, 6, 12 oder 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion beziehungsweise bei den unbehandelten Tieren direkt durchgeführt.

2.3 Organentnahme und Präparation

Die Ratten wurden mit Methoxyflurane inhalativ anästhesiert. Nach Rasur und Desinfektion des Abdomens erfolgte das zweischichtige Eröffnen des Abdomens durch eine mediane Laparotomie. Die linke Seite des Tieres wurde mit einer mit Krebs-Ringer-Puffer (KRP) getränkten Kompresse abgedeckt, danach wurde das Coecum und der gesamte Dünndarm schonend durch leichtes Schieben mit Watteträgern auf die linke Flanke des Tieres eventriert.

Nach separater Kanülierung der Vena portae und V. cava mit jeweiliger Blutentnahme wurde das Blut in ein vorgekühltes Eppendorfgesäß überführt und auf Eis gelagert beziehungsweise in ein EDTA-Röhrchen gegeben zur späteren Differentialblutanalyse.

Die mit Blut befüllten Eppendorfgesäße wurden in einer auf plus 4 °C vorgekühlten Zentrifuge bei 10.000 Umdrehungen pro Minute (U/min) für 10 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde in Form von Aliquots á 250 µl in sterile Tubes pipettiert und anschließend bis zur Durchführung des Zytokinnachweises mittels ELISA bei minus 20 °C aufbewahrt.

Es folgte in direktem Anschluss die Entnahme und Präparation des Intestinum, der mesenterialen Lymphknoten, der Leber und der Lunge.

Nach Durchtrennung des gastrooesophagealen Überganges und des Treitz'schen Bandes sowie der Mesenteriumswurzel wurde das gesamte gastrointestinale System als Einheit in auf Eis gelagerte, oxygenierte Pufferlösung (KRP) überführt. Zur Präparation der mesenterialen Lymphknoten wurde das von den Darmschlingen im Ganzen abgelöste Mesenterium auf einer feuchten Kompresse ausgelagert. Die Lymphknoten wurden durch ihre vom Fettgewebe unterschiedliche Konsistenz im Mesenterium identifiziert und einzeln separiert. Zwei definierte Leberlappen wurden separat aus der Abdominalhöhle entnommen und nach cranialer Verlängerung der medianen Laparotomie mit Eröffnung der Thoraxhöhle wurde die Entnahme beider Lungenflügel unter Durchtrennung der Trachea vorgenommen. Die Lungenhälften wurden von Trachea und Hauptbronchien sowie den Hilusstrukturen befreit.

Die weitere Präparation des gesamten Darmpaketes erfolgte in oxygenierter, gekühlter Pufferlösung (KRP). Nach Separation der Darmschlingen, gastroduodenaler und ileozökaler Abtrennung sowie Aufteilung des völlig entfalteteten Dünndarmes in jeweils 5 cm lange Stücke wurde ein definiertes, distales Stück Ileum für die histochemische Untersuchung separiert.

Die verbliebenen Darmstücke wurden zur Trennung der Darmwandschichten in Mukosa und Muskularis jeweils am proximalen und distalen Ende in einer mit Sylgard® gefüllten Schale aufgespannt und das Mesenterium ohne Eröffnung des Darmlumens abgetrennt. Die Darmstücke wurden auf einen der Lumenweite entsprechenden Stab aufgezogen

und nach vorsichtigem, longitudinalem Einkerbigen der Muskularis mit einer Pinzette wurde die Muskularis von der Mukosa zirkulär mechanisch in einem standardisierten Verfahren mit einem befeuchteten Watteträger abgetrennt. Nach Bearbeitung aller Darmteilstücke eines Tieres wurden die Mukosa- und Muskularisstücke jeweils zerkleinert und vermischt.

Alle Proben (*ME* Muskularis, *MC* Mukosa, *MLN* mesenteriale Lymphknoten, *LE* Leber, *LU* Lunge) wurden in sterilen Kryo-Tubes in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur späteren Analyse der mRNA-Induktion der Zytokine mittels RT-PCR wurden die Proben bei minus 80 °C aufbewahrt.

2.4 Reverse-Transcription Polymerase-Chain-Reaction (RT-PCR)

Die im Jahr 1985 von Kary Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion (PCR) dient zur spezifischen Darstellung bereits geringer Quantität von messenger RNA (mRNA), welche über eine Amplifizierung von copy-DNA (cDNA) erreicht werden kann.

Hierzu erfolgt zunächst nach unspezifischer Extraktion der gesamten mRNA der Gewebeprobe eine ebenso unspezifische Synthese der gesamten komplementären cDNA. Erst durch den Einsatz von für das gesuchte Endprodukt spezifischen Primern, welche Start und Stop der Amplifizierung definieren und aus 15-30 komplementären Basenpaaren zur gesuchten Genfrequenz bestehen, entsteht eine spezielle Auswahl des Endproduktes.

Die Auswahl der Primersequenzen erfolgte auf der Basis der in der NCBI-Genbank des National Institutes of Health (NIH) angegebenen mRNA-Sequenzen für Ratten der zu quantifizierenden Zytokinendprodukte (IL-1 β : GI „204905“, fwd 228-248, rev 404-384; IL-6: GI „2170752“, fwd 101-121, rev 287-268; TNF- α : GI „395369“, fwd 94-113, rev 302-283; GAPDH: GI „10190788“, fwd 1389-1408, rev 1570-1551). In der Überprüfung der PCR-Produkte mit einmaliger Sequenzierung (ABI Prism Sequence Detector, Model 310, Version 3.0) zeigte sich eine Übereinstimmung mit der erwarteten Nucleotidreihenfolge.

Zielgen	Primersequenz	Länge (bp)
IL-1 β	5' (forward): 5'-tctcacagcagcatctcgac-3'	20
	3' (reverse): 5'-catcatcccacgagtcacag-3'	20
	PCR-Produktgröße	177
IL-6	5' (forward): 5'-ccactgccttcctacttca-3'	20
	3' (reverse): 5'-acagtgcacatcatcgctgttc-3'	20
	PCR-Produktgröße	186
TNF- α	5' (forward): 5'-tgcctcagcctcttctcatt-3'	20
	3' (reverse): 5'-gcttggtggttgctacgac-3'	20
	PCR-Produktgröße	209
GAPDH	5' (forward): 5'-tgccactcagaagactgtgg-3'	20
	3' (reverse): 5'-caacggatacattgggggta-3'	20
	PCR-Produktgröße	182

Tabelle 1. Primersequenzen

2.4.1 RNA-Extraktion

Die Durchführung der totalen RNA-Extraktion wurde nach der Guanidinium-Thiocyanate-Phenolchloroform-Extraktionsmethode vorgenommen.

2.4.1.1 Homogenisierung

Zur schnellen und gründlichen Zerstörung der zellulären Strukturen als erster Schritt in der RNA-Isolation wurde jeweils 150 bis 300 Gramm Gewebe zur RNA-Extraktion eingesetzt und nach Hinzufügung von 1 ml RNAzol pro 100 mg Gewebe eine mechanische Homogenisierung (Polytron) durchgeführt.

2.4.1.2 Phasenseparation

Nach Durchmischung von 0.2 ml Chloroform (Sigma C 2432) pro 1 ml RNAzol mit der Probe und erneuter Kühlphase auf Eis für 15 Minuten wurden 2 ml der milchigen Flüssigkeit in einem sterilen Tube für 5 Minuten bei 12.000 U/min bei 4 °C zentrifugiert und hierdurch die RNA von der DNA und den Proteinen getrennt. Die wässrige Phase enthielt die RNA, während DNA and Protein in der Interphase and organischen Phase enthalten waren. Zur besseren Extraktion wurde eine kurze Inkubationszeit auf Eis eingehalten.

2.4.1.3 Präzipitation

Die so gewonnene RNA wurde nachfolgend in Isopropanol (Sigma I 9516) während einer Inkubation bei minus 20 °C über Nacht zur Präzipitation gebracht, erneut bei 12.000 U/min für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand durch Aspiration entfernt. Das verbleibende, weißliche RNA-enhaltende Pellet wurde danach mit 75%-igem Ethanol mehrfach gereinigt zur Entfernung verbliebener Salze. Nach Einbringen des getrockneten Pellets in Lösung in Diethylpyrocarbonate (DEPC) - H₂O wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei minus 80 °C aufbewahrt.

2.4.2 cDNA-Synthese

Vor Beginn der cDNA-Synthese wurde zunächst ein DNase-Verdau (DNase Kit, Ambion) der RNA-haltigen Proben durchgeführt, wodurch die Probe von eventuell vorhandener DNA-Verunreinigung befreit werden sollte.

Nach Zugabe des DNase-Puffers und der hochqualitativen, RNase-freien DNase zu der Probe wurde das Reagenziengemisch für 25 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Vor weiterer Verwendung der Proben wurde die DNase mittels DNase-Inaktivierungs-Reagent (Ambion) komplett deaktiviert.

Um jeweils gleiche Mengen an RNA für die cDNA-Synthese einzusetzen, wurde die RNA-haltige Lösung spektrophotometrisch (Bio-Rad Laboratories GmbH, Smart Spec TM 3000) qualifiziert und quantifiziert bei einer Absorption von 260 und 280 nm Wellenlänge

und hieraus die jeweils einzusetzende Menge an RNA errechnet (Werte aufgrund der großen Datenmenge nicht aufgeführt).

Die Reagentien der cDNA-Synthese wurden in einem "Master Mix" gepoolt, um einen gleichmäßigen Zusatz zu den jeweiligen Proben zu garantieren. Hierzu wurden definierte Volumina der M-MLV (Moloney - Murine Leukemia Virus) - Reverse Transcriptase beziehungsweise Super Script™ RT (200 U/μl, Gibco BRL, Life Technologies), 5 x First Strand Buffer der Reverse Transcriptase (Gibco BRL, Life Technologies), Dithiothreitol (DTT, 0.1 M, Gibco BRL, Life Technologies), Oligo-dT (Primer p(dT)₁₅ for cDNA synthesis, 8 nmol \cong 1 A₂₆₀ unit, Boehringer Mannheim GmbH), dNTP-Mix (100 mM, pH 7, Boehringer Mannheim GmbH), RNase-Inhibitor (20 U/μl, Promega, Madison WI USA) und DEPC H₂O eingesetzt.

Zur Überprüfung der effizienten, unspezifischen cDNA-Synthese wurde die DNA-Konzentration in jeder Probe spektrophotometrisch (Bio-Rad Laboratories GmbH, Smart Spec™ 3000) gemessen. So erfolgte zudem die Sicherstellung des Einsatzes gleicher DNA-Mengen in der nachfolgenden PCR (Werte aufgrund der großen Datenmenge nicht aufgeführt).

2.4.3 Konventionelle RT-PCR

Zur Überprüfung der cDNA-Synthese wurde zunächst eine konventionelle Reverse Transcriptase-PCR mit dem Primer Glycerinaldehyd-3-Phosphatase Dehydrogenase (GAPDH) als house keeping gene auf einem Thermocycler (Peltier Thermal Cycler PTC – 200, MJ Research, Biozym) mit nachfolgender Darstellung der PCR-Produkte auf einem Agarose-Gel (Sigma) zwischengeschaltet.

Der Primer-Mix, bestehend aus gleichen Konzentrationen von 3' und 5' Primer (200 μM, Gibco BRL), sowie der PCR-Mix, bestehend aus PCR-buffer 10 x (Perkin-Elmer), MgCl₂-Solution (Perkin Elmer), dNTP-Mix (Boehringer Mannheim GmbH) und rekombinanter Taq DNA-Polymerase (Gibco BRL, Life Technologies) wurden bis zur Nutzung auf Eis gelagert. Die Taq-Polymerase wurde als letztes zum Gemisch aus DEPC-H₂O, Primer-Mix, cDNA-Probe und PCR-Mix hinzugegeben, während der Lagerung auf dem Eis bestand aufgrund der Temperaturabhängigkeit noch keine Aktivität.

2.4.3.1 PCR-Bedingungen

Nach einer Denaturierung über eine Minute bei einer Temperatur von 94 °C folgte die Annealing-Phase von 1 Minute bei 57 °C sowie als Abschluss die Elongationsphase von 2 Minuten bei 72 °C

2.4.3.2 Elektrophoretische Analyse des PCR-Endproduktes

Nach 30 Zyklen erfolgte die Analyse des PCR-Endproduktes durch Elektrophorese auf einem Agarose-Gel, welches durch Erhitzen eines Gemisches aus Agarose (Sigma), TBE 10 x Puffer und Ethidiumbromid hergestellt wurde.

Nach vorheriger Durchmischung der Proben mit einem Ladepuffer (Nucleic Acid Sample Loading buffer 5 x, Bio Rad) wurden die Proben in die Geltaschen des Agarosegels pipettiert. Aufgrund der negativen Eigenladung der DNA wanderte die DNA vom negativen Pol zum positiven Pol unter einer Spannung von 100 Volt bei einer Stromstärke von 60 mA über 90 Minuten (Sub-Cell®GT, Electrophoresis System, Bio-Rad Laboratories GmbH). Als gleichzeitige positive Kontrolle diente das jeweilige Mitlaufen einer Basenpaarleiter, des weiteren wurde eine negative Kontrolle zur Aufdeckung von Kontamination mitgeführt.

Zum einem wurde zur Probenanfärbung Ethidiumbromid als Zusatz in der TBE-Laufpuffer-Lösung verwendet. Diese lichtempfindliche Chemikalie, welche an doppelsträngige DNA bindet, wurde anschließend mit UV-Licht der Wellenlänge 250 bis 360 nm detektiert.

Des weiteren wurde ein neues Verfahren mit Anfärbung der DNA-Banden mit der GelStar-Färbung eingeführt. Bei dem zur Probe hinzugegebenen GelStar (Nucleic Acid Gel Stain, 10 x DMSO, BMA, Rockland, USA) handelt es sich um eine lichtempfindliche, ebenfalls doppelsträngige DNA - bindende Chemikalie, die allerdings eine geringere Toxizität als Ethidiumbromid besitzt. Die Elektrophorese lief in der Dunkelheit unter einer Spannung von 90 Volt bei einer Stromstärke vom 60 mA über 70 Minuten. Unter der Verwendung des Dark Reader™ - Transluminator (Model DR-45 M, MoBiTec) wurden die angefärbten DNA-Banden nach Abschluss der Elektrophorese sichtbar gemacht.

2.4.4 Real-time RT-PCR

Auf der Suche nach alternativen Methoden zur hot-PCR mit radioaktivem Material wurden Echtzeit-PCR-Verfahren zur Quantifizierung von PCR-Produkten entwickelt. Hierbei handelt es sich um Systeme, die PCR-Produkte während ihrer Akkumulation detektieren: die real-time-Detektionssysteme besitzen neben dem Reaktionsmodul, in dem die PCR abläuft, ein Detektionsmodul, das kontinuierlich die Produktzunahme anhand der Fluoreszenzzunahme misst und eine Online-Detektion der PCR auf dem Monitor mit einer Gegenüberstellung von Zyklusnummer und Fluoreszenzanstieg anzeigt.

2.4.4.1 Semiquantitative Messung

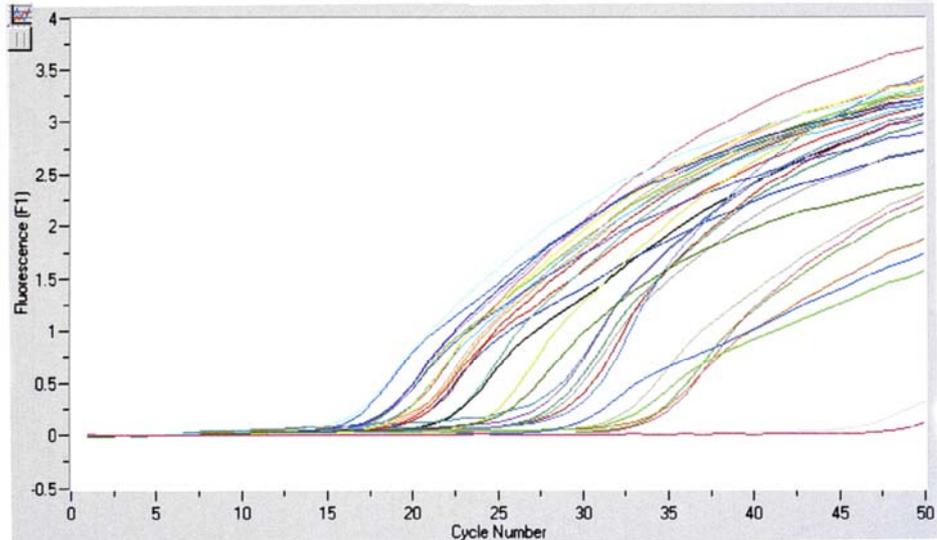
Im Rahmen dieser Arbeit wurde das LightCycler™ System (Qualitative and Quantitative real-time-PCR, Version 3.39, Roche Molecular Biochemicals) verwendet.

Im Vergleich zur konventionellen PCR wurden andere PCR-Bedingungen angewandt mit einer kürzeren Zeitdauer der Phasen (Denaturierung bei 95 °C für 1 Sekunde, Annealing bei dem Temperaturoptimum (T_m) der Primer für 10 Sekunden, Elongation bei 72 °C für 10 Sekunden).

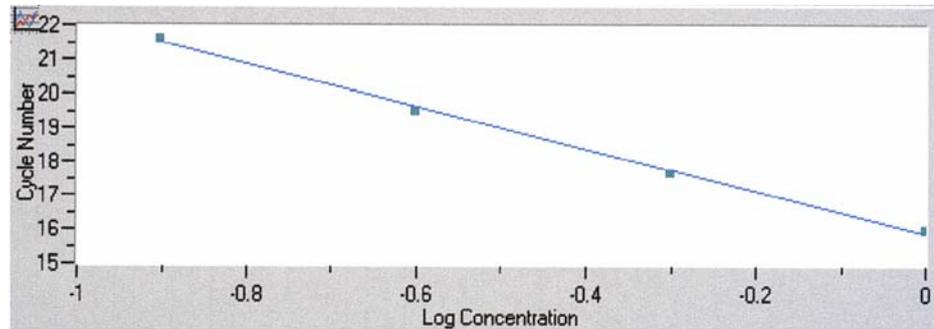
Zunächst erfolgte die Optimierung der Primer (TNF- α , IL-1 β , IL-6 und GAPDH) unter Verwendung verschiedener Konzentrationen von Magnesium-Chlorid ($MgCl_2$). Aufgrund der sauberen Schmelzkurve mit einem singulären Peak und dem besten Kurvenverlauf des PCR-Produktes fiel die Entscheidung bei allen Primern für die 2 millimolare $MgCl_2$ -Konzentration.

Das in den nachfolgenden Probenanalysen jeweils pro Probe eingesetzte Gesamtvolumen bestehend aus den Primern (forward und reverse je 5 pmol), 2 mM $MgCl_2$, dem Farbstoff SybrGreen, destilliertem und deionisiertem H_2O , cDNA und Master Mix (TrisHCl, BSA, dNTP, Taq-DNA-Polymerase, $MgCl_2$; (LightCycler™ Master Mix und LightCycler™ Optimisation Mix, Eurogentec, Belgium) betrug 20 μ l.

Fig. 2. Die Zunahme des jeweiligen PCR-Produktes nach Abtrennung der Basisfluoreszenzen wurde durch die ansteigende Kurve angezeigt, welcher je nach Höhe des Ausgangswertes des PCR-Produktes zu einem bestimmten Zyklus, dem sog. Thresholdzyklus C_T , geschah.



Dem Zyklus C_T wurde durch die Erstellung einer Standardkurve eine kalkulierte Konzentration zugeordnet.



Insgesamt fand in diesen Untersuchungen eine relative Quantifizierung zu einem housekeeping gene mit externen Standards Anwendung. Die kalkulierten Konzentrationen der Zytokin-mRNA wurden durch Bezugnahme auf das unter gleichen Reaktionsbedingungen ermittelte housekeeping gene GAPDH relativiert, um einen unterschiedlichen cDNA-Gehalt der Proben auszugleichen und eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen.

2.4.4.2 Schmelzkurvenanalyse

Zur Detektion des PCR-Produktes wurde der Farbstoff SybrGreen (Eurogentec, Belgium) eingesetzt. Hierbei handelt es sich um einen Fluoreszenz-Farbstoff, welcher unspezifisch mit Doppelstrang-DNA interkaliert und damit mit fortschreitender PCR einen messbaren Fluoreszenzanstieg produziert, da die Bindung an dsDNA die Fluoreszenz wesentlich verstärkt. Somit wurde die maximale Farbstoffbindung nach

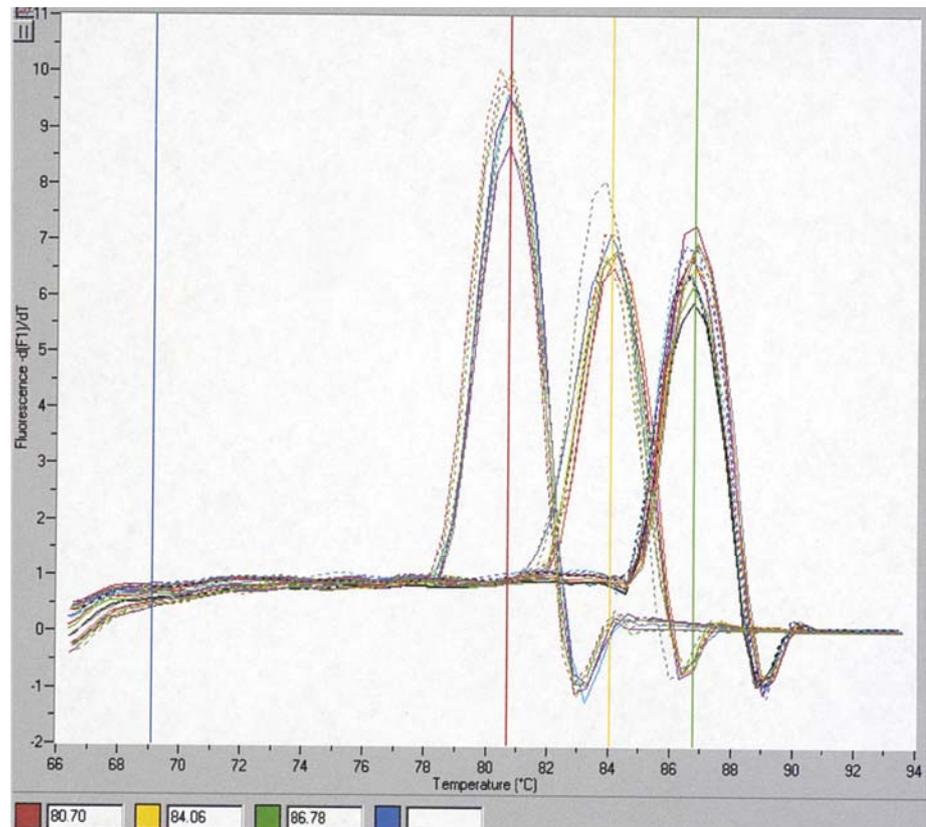
Abschluss der Elongationsphase erreicht und gemessen. Mit der nachfolgenden Denaturierung im nächsten Zyklus wurde auch der Fluoreszenzfarbstoff wieder freigesetzt und konnte von neuem an dsDNA gebunden werden.

Hiermit fehlte zunächst im Gegensatz zu alternativen Detektionsmethoden unter Einsatz von Fluoreszenz-markierten DNA-Hybridisierungs sonden, welche an die komplementären Regionen der Zielstrang-DNA binden und nach dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers funktionieren, der Nachweis der Spezifität des zu untersuchenden Templates.

Zur Differenzierung zwischen dem gesuchten Endprodukt und unerwünschten Produkten wurde deshalb nach abgeschlossener PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Beginnend mit niedrigen Temperaturen wurde die Temperatur in der Wärmekammer langsam erhöht und in Abständen von 0.2 °C jeweils die Fluoreszenz gemessen. Hierbei verloren die Moleküle temperaturabhängig ihre Doppelsträngigkeit und somit die Fluoreszenzaktivität (F 1) durch Freigabe des zuvor gebundenen Farbstoffes SybrGreen. Da kleinere Fragmente einen niedrigeren Schmelzpunkt aufweisen als größere PCR-Produkte, konnte aus der daraus abgeleiteten Temperaturabhängigkeit der Fluoreszenzsignalveränderung eine Unterscheidung zwischen gesuchtem spezifischem PCR-Produkt und unerwünschten Produkten vorgenommen werden. Die spezifische Schmelztemperatur war dabei als die Temperatur definiert, bei welcher 50 % der doppelsträngigen DNA eines bestimmten Moleküls einzelsträngig, also denaturiert wurden. Von der Schmelzkurve (F1 vs. Temperatur) wurde softwaregesteuert die erste Ableitung bestimmt (-dF/dT). Der Wendepunkt der Schmelzkurve beziehungsweise der Peak der ersten Ableitung lag jeweils an der produktspezifischen Schmelztemperatur.

Fig. 3. Dargestellt ist exemplarisch die Schmelzkurvenanalyse für GAPDH, IL-1 β und IL-6 3 Stunden nach LPS-Gabe in den Geweben Muskularis und Mukosa unter Gegenüberstellung der Fluoreszenz $-d(F1)/dT$ und der Temperatur in $^{\circ}C$. Die exakte Schmelztemperatur kann durch die manuelle Positionierung einer Geraden durch den Peak der ersten Ableitung ermittelt werden.



Die hauptsächlich einflussnehmenden Faktoren auf die spezifische Schmelztemperatur waren die Moleküllänge entsprechend der Nukleotidanzahl und die Konzentration der G/C-Bindungen innerhalb des Moleküls. Somit kann die Schmelzkurvenanalyse der real-time-PCR mit der Analyse der Basenpaarlänge des PCR-Produktes durch Elektrophorese auf dem Gel verglichen werden.

Insgesamt ließ sich so eine Bestätigung der PCR-Produkt-Identität bei bekannter spezifischer Schmelztemperatur sowie eine Unterscheidung von unspezifischen Produkten erreichen.

2.5 Serumproteinspiegel portalvenös und caval

Zur quantitativen in vitro-Bestimmung der inflammatorischen Zytokine im Rattenserum wurde das Cytoscreen Immunoassay Kit von Biosource für Rat TNF- α (#KRC3012), Rat Interleukin 1 β (#KRC0012) und Rat Interleukin 6 (#KRC0062) angewandt.

Sowohl die portalvenösen und cavalen Serumproben als auch die Standards mit bekannter Zytokinkonzentration und die negativen Kontrollen wurden nach Schema mit gleichem Gesamtvolumen verwendet. Es bildete sich ein Vierer-Sandwich aus einem zytokinspezifischen Antikörper, dem zugegebenen Zytokin-Antigen, einem ebenfalls zytokinspezifischen biotinylierten Antikörper und dem Enzym Streptavidin-Peroxidase. Die Streptavidin-Peroxidase wandelte eine hinzugefügte Substratlösung in ihrer Farbe enzymatisch um, die Katalyse wurde anschließend mit einer Stopplösung beendet.

Die Intensität des kolorierten Produktes war direkt proportional zu der vorhandenen Antigenkonzentration der eingesetzten Probe.

Die spektrophotometrische Analyse der Proben wurde unter Nutzung des Computerprogramms Easy Win Fitting mit dem ELISA-Reader (Plattenlesegerät Spectra Thermo, SLT Labinstruments Deutschland GmbH) durchgeführt. Die optische Dichte der verschiedenen Proben, gemessen durch die Absorption bei einer spezifischen Wellenlänge, konnte anhand der jeweils mitgeführten 8 Standardproben mit einer entsprechenden Antigenkonzentration korreliert werden.

Die Doppelbestimmung der Proben im gleichen Run diente der Aufdeckung von Pipettierfehlern. Alle Messungen, die unter der Nachweisgrenze lagen, erhielten den Wert 0 pg/ml zugeordnet.

Die Sensitivität der Assays, entsprechend dem minimal zu messenden Zytokinspiegel, wurde für Rat IL-1 β < 3 pg/ml, für Rat IL-6 < 8 pg/ml und für Rat TNF- α < 4 pg/ml angegeben.

Die Spezifität der Assays wurde nach Herstellerangaben mit verschiedenen Substanzen mit einer Konzentration von 10.000 pg/ml getestet, hierbei zeigte sich keine signifikante Kreuzreaktivität von IL-1 β , IL-6 und TNF- α .

2.6 Histochemie der Darmmuskularis (MPO-Färbung)

Das anfangs von den restlichen Dünndarmanteilen separierte Stück Ileum wurde in einer separaten Sylgard®-gefüllten Schale, welche mit kalter Pufferlösung (KRP) gefüllt und in einem Eisbad gelagert wurde, entlang der mesenteriumsnahe Darmwand aufgespannt. Das Darmlumen wurde mesenteriumsnahe auf ganzer Länge eröffnet, die

Darmwand zu einer Fläche ausgebreitet und mit kleinen Stahlnadeln unter Dehnung auf 150 % der Länge und 200 % der Breite des unfixierten Darmstückes befestigt. Anschließend wurde das Präparat mit 10 %-igem Formaldehyd (Merck) über 10 Minuten chemisch fixiert. Unter dem Präparationsmikroskop erfolgte die Herstellung der Muskularis-Whole-Mounts durch die komplette Entfernung der Mukosa und Submukosa. Anschließend wurde an der aufgespannten Muskularis eine Myeloperoxidase-Färbung zur Identifizierung des Neutrophileninfiltrates in der Muskularis durchgeführt. Hierzu wurde die Muskularis für 10 Minuten in eine Lösung aus 10 mg Hanker-Yates-Reagent (Sigma, H-7507) in 10 ml Pufferlösung (KRP) und Zugabe von 100 µl von 3%-iger H₂O₂-Lösung eingebracht.

Nach Aufbringen der Muskularis auf einen Objektträger erfolgte die Auszählung der angefärbten Zellen in der Muskularis unter 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop. Die Werte von jeweils 5 zufällig eingestellten Gesichtsfeldern wurden gemittelt.

Zusätzlich wurde eine photographische Dokumentation bei 40-facher, 100-facher und 200-facher Vergrößerung exemplarisch vorgenommen.

2.7 Differentialanalyse des systemischen Blutes

Das in ein EDTA-Röhrchen gegebene cavale Blut wurde bei + 4 °C gelagert bis zur maschinellen Analyse im Biochemischen Labor mittels Cell-Counter. Die dortigen Untersuchungen umfassten ein kleines Blutbild (Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, Thrombozyten) sowie ein Differentialblutbild (Neutrophile, Lymphozyten, Monozyten, Basophile, Eosinophile).

2.8 Verwendete Chemikalien

Der Krebs-Ringer-Puffer (KRP) wurde selbst hergestellt (Sigma, Na⁺ 120.8 mmol/l, K⁺ 5.901 mmol/l, Ca²⁺ 2.497 mmol/l, Mg²⁺ 1.196 mmol/l, Cl⁻ 134.096 mmol/l, HCO₃⁻ 15.498 mmol/l, H₂PO₄⁻ 1.128 mmol/l und Glucose 11.49 mmol/l) und die Flüssigkeit anschließend zur Oxygenierung und Etablierung eines pH von 7.3 bis 7.4 mit einem Gasgemisch von 97% O₂/ 3% CO₂ begast.

Zur Herstellung von RNAzol fanden 50 g Guanidine Thiocyanat, 0.5 g Natrium-Lauroyl Sarcosine, 2.5 ml einmolares Natriumcitrat, 100 ml Phenol, 10 ml zweimolares Natriumacetat sowie 0.7 ml β -Mercaptoethanol Verwendung. Die entstandene Lösung wurde mit Natriumcitrat auf einen pH-Wert von 7.0 titriert.

Diethyl-Pyrocabonate-Wasser (DEPC-H₂O) wurde unter dem Abzug in einem autoklaviertem Glasbehälter unter Zugabe von 1 ml Diethyl-Pyrocabonate (Sigma D-5758) zu 1 Liter deionisiertem Wasser gefertigt und nach 12-stündiger Wartezeit erneut autoklaviert.

Der Gebrauch von DEPC-H₂O als Lösungsmittel sollte eine RNase-Freiheit dieses Wassers sichern. DEPC reagiert mit Histidine von Restspuren von Protein und inaktiviert damit RNAsen. Ansonsten fand z.B. zur Herstellung des TBE-Puffers und anderer Lösungen mittels MilliQ™ System (Water Purification System, Millipore) gereinigtes und deionisiertes Wasser Verwendung.

Zur Fertigung des 10fachen TBE-Puffer wurden 108 g Trizma Base (Sigma T 8542), 55 g Boric Acid (Sigma B 6768) und 7.44 g EDTA (Sigma E 5134) in einem Endvolumen von 1 Liter mit deionisiertem H₂O vermengt, der mit einem pH-Meter (Fisher Scientific, Accumet Basic) gemessene pH der Lösung betrug 8.3.

2.9 Statistik der Datenanalyse

Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standard Error of the Mean (SEM) zusammengestellt. Zur statistischen Auswertung der Gruppen wurde die Varianzanalyse ANOVA (one-way Analysis of Varianz) mit dem post-hoc Dunnett Multiple Comparisons Test (Compare vs. Control) angewandt (Software InStat 3). Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ und Hochsignifikanz bei $p < 0.01$ angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Generelle Beobachtungen

Bei der Beobachtung der behandelten Tiere während der Wachphase zwischen intraperitonealer LPS-Injektion und Organentnahme waren gestäubtes Fell und die Lethargie der Tiere vor allem in den ersten 12 Stunden auffällig. Bei mehreren Tieren zeigten sich Sekretverkrustungen an Augen und Nase. Nach Eröffnung des Abdomens fanden sich gehäuft dilatierte Darmschlingen mit mukoidem Intestinalinhalt, Zeichen einer fibrinösen oder eitrigen Peritonitis bestanden nicht. Die Identifizierung der mesenterialen Lymphknoten fiel leichter bei Vergrößerung derselben im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Die intraperitoneale Bolusgabe von LPS in einer Dosis von 15 mg/kg Körpergewicht resultierte in keiner Letalität. Periinterventionelle Komplikationen wie Blutung oder Darmperforation traten nicht auf.

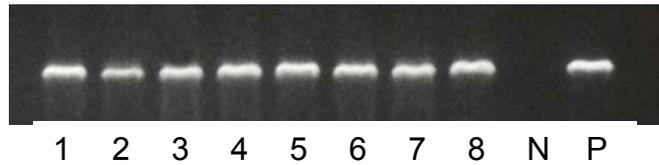
3.2 Analyse der mRNA-Induktion

Um die Beteiligung der einzelnen Organe und den Zeitverlauf der inflammatorischen Antwort in der Endotoxinämie zu untersuchen, wurde die RNA aus den verschiedenen Geweben (*ME* Muskularis, *MC* Mukosa, *MLN* mesenteriale Lymphknoten, *LE* Leber, *LU* Lunge) zu den Zeitpunkten 3, 6 und 12 Stunden nach LPS-Injektion beziehungsweise der Kontrolltiere extrahiert.

3.2.1 Konventionelle RT-PCR

In der qualitativen Analyse der GAPDH-mRNA mit Darstellung der Banden durch UV-Detektion der Ethidiumbromid-angefärbten Proben beziehungsweise Sichtbarmachung der GelStar-Färbung auf dem DarkReader zeigte sich bei allen Proben eine Bande auf der Höhe von 200 Basenpaaren, welches der erwarteten PCR-Produktgröße durch die Auswahl der GAPDH-Primer entsprach. Makroskopisch waren die Banden gleicher Intensität.

Fig. 4 A, B. Diese Abbildung zeigt beispielhaft die Ergebnisse der konventionellen GAPDH-PCR durch Analyse mittels Elektrophorese auf einem Agarosegel (Ethidium-bromid-Färbung).



1 – 8 = Proben, N = negative Kontrolle, P = positive Kontrolle.

3.2.2 Real-time RT-PCR

Zur weiteren Erfassung des quantitativen Anteils der einzelnen Organe an der gesamten Zytokinproduktion und der zeitlichen Korrelation der Zytokinproduktion wurde eine semiquantitative real-time RT-PCR mit Bestimmung der mRNA-Spiegel der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α in den verschiedenen Geweben (Muskularis, Mukosa, mesenteriale Lymphknoten, Leber und Lunge) durchgeführt.

3.2.2.1 Zytokinbezogene Analyse

In allen Organen fand sich eine niedrige Basisexpression der mRNA aller Zytokine, ausgenommen der auffällig erhöhten Basiswerte von IL-1 β in den mesenterialen Lymphknoten und der Lunge. 3 Stunden nach LPS-Injektion zeigte sich die maximale Steigerung der mRNA-Induktion aller Zytokine in allen Geweben ausgenommen den Werten für IL-6 und TNF- α in der Leber.

Im Vergleich der absoluten Zahlen des mRNA-Gehaltes des jeweiligen Zytokin in verschiedenen Geweben fand sich nach 3 Stunden für das Zytokin Interleukin-1 β die Reihenfolge Lunge ($88,96 \pm 14,59$) > Mesenteriale Lymphknoten ($35,49 \pm 8,66$) > Leber ($28,35 \pm 2,64$) > Muskularis ($11,87 \pm 3,33$) > Mukosa ($4,41 \pm 0,4$).

Für Interleukin-6 lagen die Werte in der Abfolge Muskularis ($22,83 \pm 1,8$) > Mesenteriale Lymphknoten ($22,88 \pm 20,26$) > Lunge ($13,25 \pm 12,12$) > Mukosa ($2,08 \pm 1,15$) > Leber ($0,62 \pm 0,35$) und für das Zytokin TNF- α bei Lunge ($10,03 \pm 3,09$) > Mesenteriale Lymphknoten ($8,33 \pm 1,6$) > Muskularis ($4,57 \pm 0,58$) > Mukosa ($4,15 \pm 1,47$) > Leber ($3,57 \pm 1,3$).

Statistische Hochsignifikanz konnte für die mRNA-Induktion der Zytokine IL-6 und TNF- α in der Muskularis sowie für IL-1 β in der Lunge und der Leber zum Zeitpunkt 3 Stunden

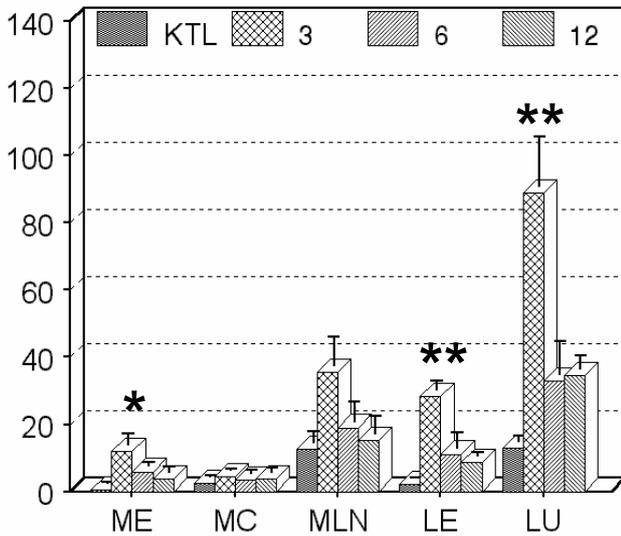
nach LPS-Stimulation nachgewiesen werden, statisch signifikant war die mRNA-Induktion drei Stunden nach LPS-Stimulation von IL-1 β in der Muskularis und von TNF- α in der Lunge. Zu dem Zeitpunkt 6 Stunden nach LPS-Gabe war eine persistierende mRNA-Induktion auf niedrigerem Niveau nachzuweisen, welche sich nach 12 Stunden den Basiswerten näherte.

Des Weiteren erfolgte aufgrund der unterschiedlichen Basiskonzentrationen der Zytokine in den Geweben die Ermittlung des Vielfachen des jeweiligen Kontrollwertes, um eine bessere Vergleichbarkeit und Wertung sowie eine Darstellung des Zeitverlaufes der mRNA-Induktion zu erreichen. Hierbei waren die mRNA-Spiegel des Zytokin IL-6 am deutlichsten in den Geweben gegenüber den Kontrollwerten erhöht (Muskularis 143-fach > Mukosa 113-fach > Lunge 35-fach > mesenteriale Lymphknoten 25-fach). Für die Leber ließ sich hinsichtlich des Vielfachen gegenüber den Kontrolltieren für IL-6 keine Aussage machen, da die Proben der Kontrolltiere aufgrund der Schmelzkurvenanalyse von der Auswertung ausgeschlossen werden mussten.

Die Induktion der mRNA-Spiegel für Interleukin-1 β war weniger ausgeprägt als für Interleukin-6 nachzuweisen mit 19-facher Erhöhung in der Muskularis, 13-facher Induktion in der Leber, 7-fachem Anstieg in der Lunge und 2- bis 3-facher Erhöhung in der intestinalen Mukosa und den mesenterialen Lymphknoten.

Die mRNA-Spiegel des Zytokines TNF- α zeigten insgesamt nur eine geringe Induktion zwischen dem 2-fachen und 7-fachen der Kontrollwerte in den untersuchten Geweben.

A m-RNA-Spiegel von IL-1 β
(in Relation zu GAPDH)



B m-RNA-Induktion von IL-1 β
versus Kontrolle

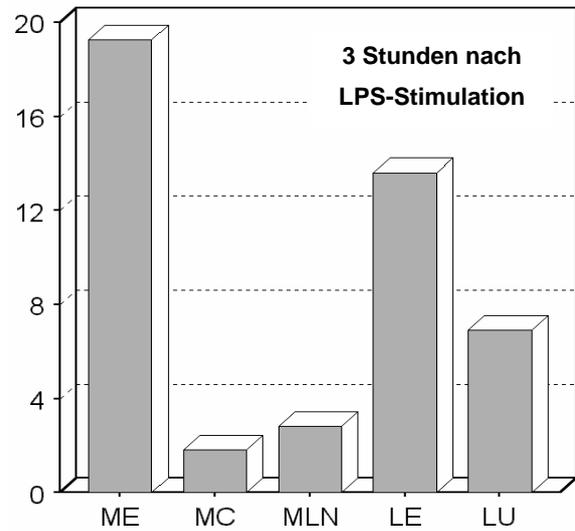
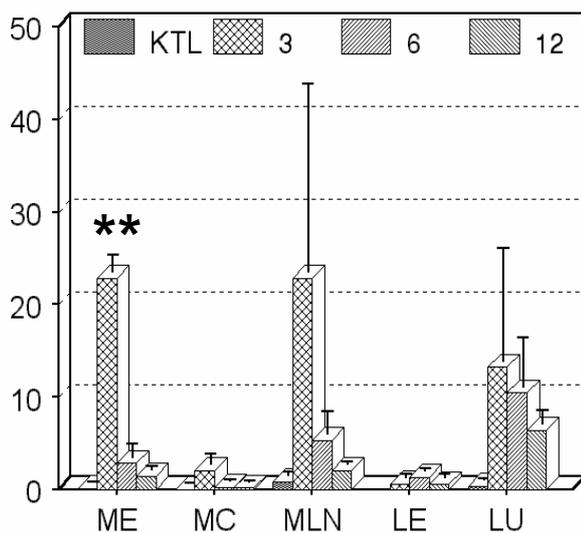


Fig. 5 A, B. Dargestellt sind die mRNA-Spiegel in allen Geweben (ME = Muskularis, MC = Mukosa, MLN = mesenteriale Lymphknoten, LE = Leber, LU = Lunge; KTL = Kontrolltiere) zu den verschiedenen Zeitpunkten (A) sowie das jeweilige Vielfache der mRNA-Spiegel gegenüber den Kontrollwerten (B) 3 Stunden nach LPS-Gabe für das Zytokin IL-1 β . Das Maximum der Induktion war in allen Geweben 3 Stunden nach LPS-Gabe zu verzeichnen, die höchste Induktion fand sich in der Darmmuskularis (Mittelwert \pm SEM, n = 3, * = p < 0,05, ** = p < 0,01).

A m-RNA-Spiegel von IL-6
(in Relation zu GAPDH)



B m-RNA-Induktion von IL-6
versus Kontrolle

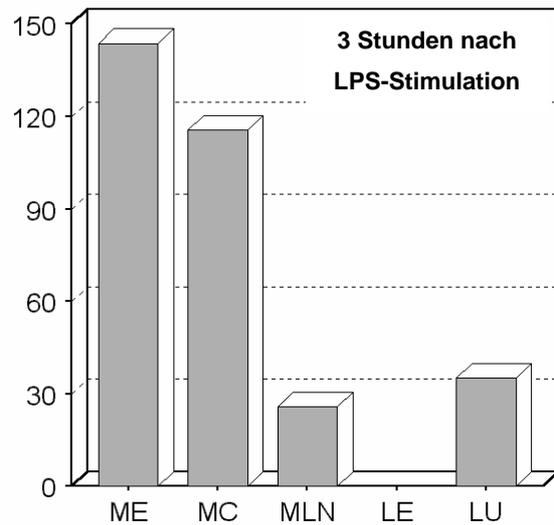


Fig. 6 A, B. Das Histogramm verdeutlicht die absoluten mRNA-Spiegel (A) in den verschiedenen Geweben (ME = Muskularis, MC = Mukosa, MLN = mesenteriale Lymphknoten, LE = Leber, LU = Lunge; KTL = Kontrolltiere) zu allen Zeitpunkten und stellt die Induktion der mRNA (B) gegenüber den Kontrollwerten für das Zytokin IL-6 3 Stunden nach LPS-Gabe dar (Mittelwert \pm SEM, n = 3, * = p < 0,05, ** = p < 0,01).

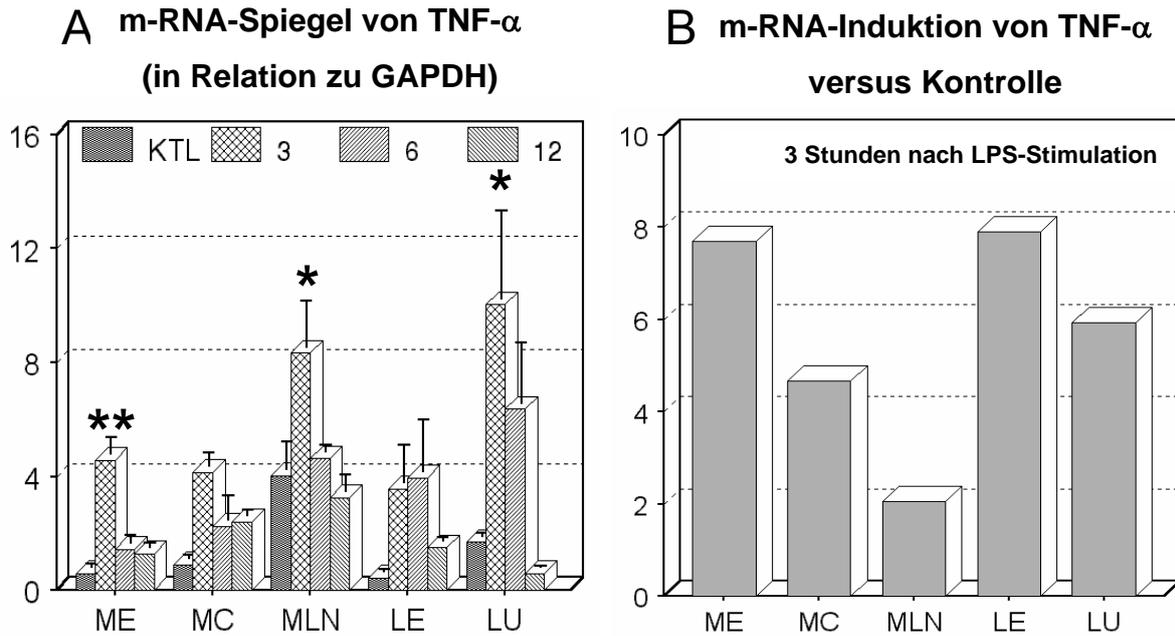


Fig. 7 A, B. Das Histogramm zeigt die Absolutwerte der mRNA-Induktion in Relation zu GAPDH (A) in den untersuchten Geweben (ME = Muskularis, MC = Mukosa, MLN = mesenteriale Lymphknoten, LE = Leber, LU = Lunge; KTL = Kontrolltiere) für das Zytokin TNF- α zu den verschiedenen Zeitpunkten nach LPS-Gabe sowie und das jeweilige Vielfache der mRNA-Spiegel gegenüber den Kontrollwerten (B) 3 Stunden nach LPS-Gabe in den untersuchten Geweben (Mittelwert \pm SEM, n = 3, * = p < 0,05, ** = p < 0,01).

3.2.2.2 Organbezogene Analyse

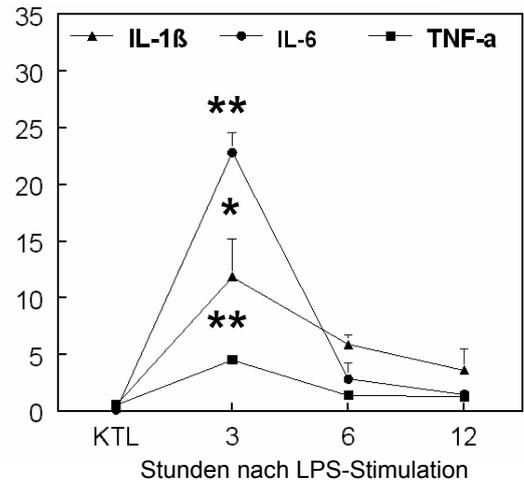
Unter dem Aspekt der organbezogenen Analyse der mRNA-Expression nach LPS-Stimulation war vor allem in der Lunge und den mesenterialen Lymphknoten eine hohe Basisexpression von IL-1 β auffallend.

Im Vergleich der Absolutwerte der Zytokine zum Zeitpunkt 3 Stunden nach LPS-Stimulation zeigten sich in der Lunge und Leber sowie mesenterialen Lymphknoten und Mukosa die höchsten mRNA-Spiegel für Interleukin-1 β unter den drei untersuchten Zytokinen. In der Muskularis externa war jedoch der mRNA-Spiegel für Interleukin-6 deutlich höher im Vergleich zu IL-1 β und TNF- α .

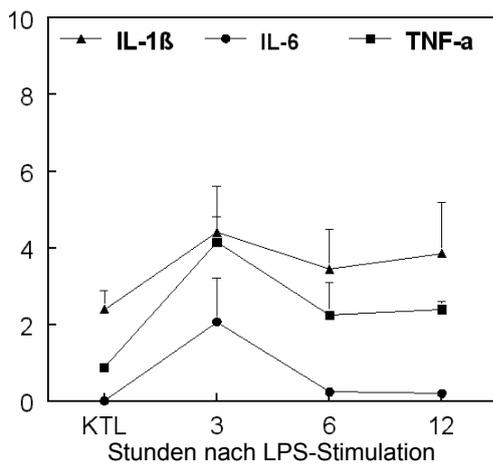
Die höchste Induktion 3 Stunden nach LPS-Stimulation war in der Muskularis sowohl für Interleukin-6 (143,7-fach) als auch für Interleukin-1 β (19,3-fach) zu verzeichnen. Aber auch in der Mukosa (115-fache Erhöhung von IL-6) und in der Lunge (35-fache Erhöhung von IL-6) zeigte sich eine hohe Reaktionsbereitschaft.

Fig. 8 A, B, C, D, E. Die organbezogene Analyse der mRNA-Induktion der Zytokine verdeutlicht das hohe Potential der intestinalen Muskularis als isolierter Darmwandschicht zur Reaktion auf inflammatorische Stimuli mit 19,3-facher Erhöhung des Interleukin-1 β und 143,7-facher Steigerung des Interleukin-6 3 Stunden nach LPS-Stimulation. Alle Zytokine zeigten in den untersuchten Geweben das Maximum nach 3 Stunden, zu den Zeitpunkten 6 und 12 Stunden nach LPS-Gabe war im allgemeinen eine persistierende mRNA-Induktion auf niedrigerem Niveau nachzuweisen (A = Muskularis, B = Mukosa, C = mesenteriale Lymphknoten, D = Leber, E = Lunge; KTL = Kontrolltiere). (Mittelwert \pm SEM, n = 3, * = p < 0,05, ** = p < 0,01).

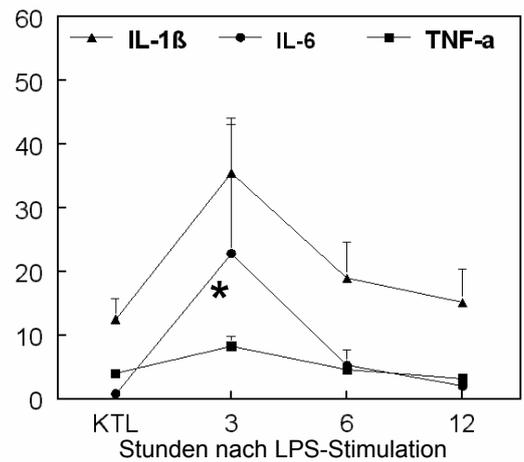
A Muskularis



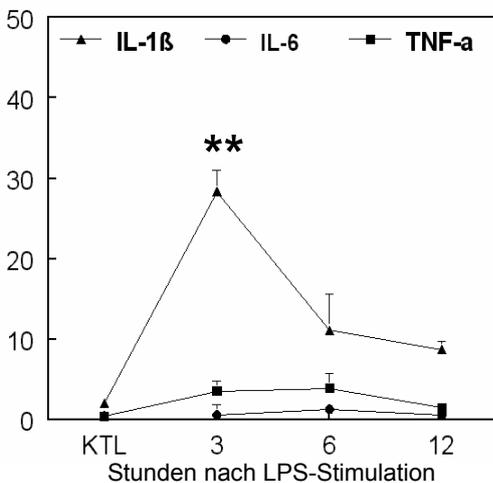
B Mukosa



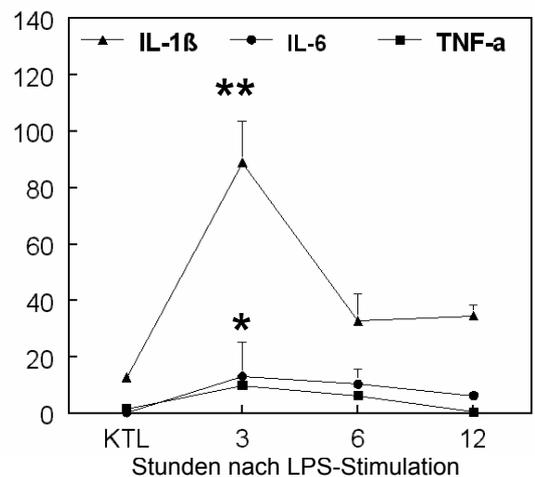
C Mesenteriale Lymphknoten



D Leber



E Lunge



3.3 Serumproteinspiegel portalvenös und caval

Die Messung der Serumproteinspiegel der inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α mittels ELISA im portalvenösen und cavalen Blut sollte die Freisetzung der Zytokine aus dem lokalen Milieu sowie den Transportweg nachweisen, wobei die Messung zu unterschiedlichen Zeitpunkten den zeitlichen Verlauf der Zytokinproduktion widerspiegelte.

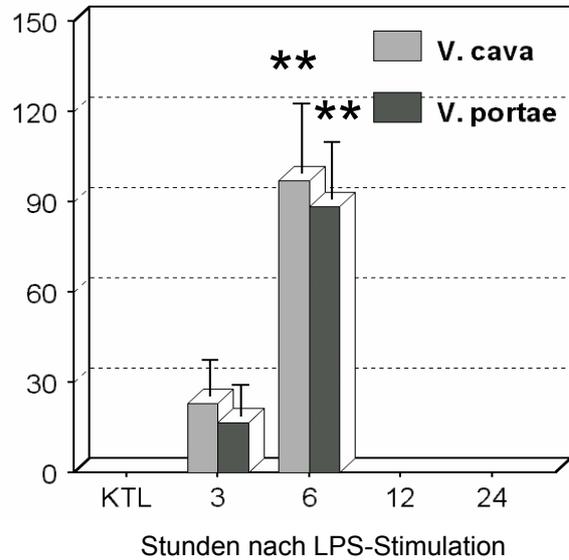
Die Serumproteinspiegel sowohl im portalvenösen als auch im cavalen Blut erreichten für IL-6 ihr Maximum nach 3 Stunden (17.710 pg/ml \pm 1.833 pg/ml beziehungsweise 17.875 pg/ml \pm 1.562 pg/ml) und für IL-1 β nach 6 Stunden (16,5 pg/ml \pm 10,1 pg/ml beziehungsweise 23 pg/ml \pm 12 pg/ml) und waren signifikant gegenüber Kontrollen mit minimalen, nicht messbaren Konzentrationen erhöht. Es zeigte sich ein rascher Abfall auf nicht nachweisbare Werte zu den Zeitpunkten 12 und 24 Stunden nach LPS-Injektion. Für den Zeitpunkt 3 Stunden sind die Werte für TNF- α (441,6 \pm 294,5 beziehungsweise 432,2 pg/ml \pm 295,5 pg/ml) aufgeführt, aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nicht verwertbar. Bei einem für die Transkription der induzierten mRNA sehr frühen Zeitbereich wurde angenommen, dass das Maximum des Serumproteinspiegels von TNF- α zwischen 3 und 6 Stunden lag bei wieder abfallenden Zytokinspiegeln nach 6 Stunden.

Vergleicht man die Absolutwerte aller inflammatorischen Zytokine so war die maximale Induktion von IL-6 im Vergleich zu IL-1 β 184-fach und zu TNF- α 40-fach höher.

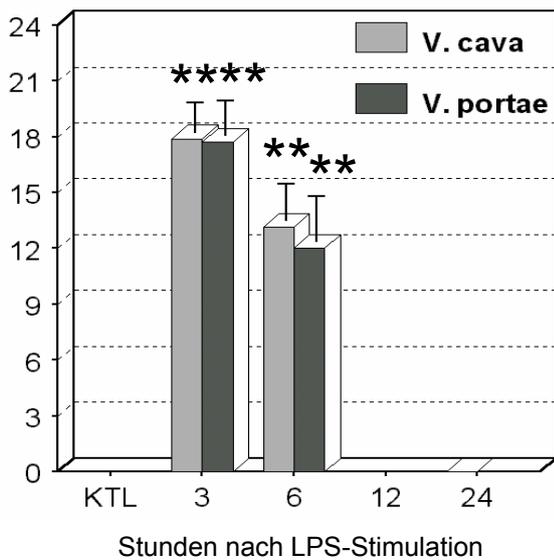
Die Gegenüberstellung der Werte des portalvenösen und cavalen Blutes ließ für alle Zytokine und zu allen Zeitpunkten keine statistischen Unterschiede erkennen.

Fig. 9 A, B, C. In der Analyse der Serumproteinspiegel der Zytokine fand sich die maximale Erhöhung für IL-1 β (A) 6 Stunden und für IL-6 (B) 3 Stunden nach LPS-Stimulation (KTL = Kontrolltiere). Das gemessene Maximum des Serumproteinspiegels von TNF- α (C) lag bei 3 Stunden nach LPS-Injektion. Die Absolutwerte (pg/ml) von IL-6 waren im Vergleich zu IL-1 β 184-fach und zu TNF- α 40-fach erhöht. Es fanden sich keine statistisch nachweisbaren Unterschiede zwischen systemischem und portalvenösem Blut (Mittelwert \pm SEM, n = 3, * = p < 0,05).

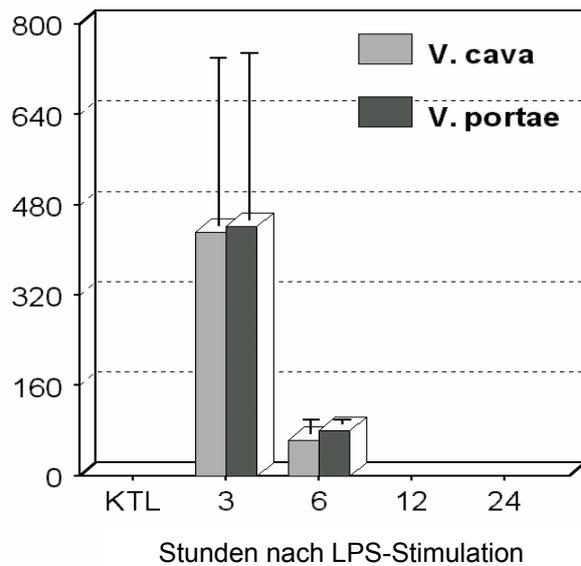
A Serumproteinspiegel IL-1 β (pg/ml)



B Serumproteinspiegel IL-6 (ng/ml)



C Serumproteinspiegel TNF- α (pg/ml)



3.4 Histochemie der Darmmuskularis (MPO-Färbung)

Nach LPS-Stimulation mit Aufregulierung der inflammatorischen Zytokine folgt das Auftreten einer lokalen inflammatorischen Reaktion durch Chemotaxis. Zum histochemischen Nachweis von polymorphonukleären Zellen (PMN), welche dieses Entzündungsinfiltrat repräsentierten, wurde eine Myeloperoxidase-Färbung der Darmwandmuskularis (Whole-Mounts) durchgeführt. Die residenten Makrophagen wurden hierdurch nicht erfasst.

Hierbei zeigte sich eine beginnende Infiltration 6 Stunden nach LPS-Injektion mit $4,2 \pm 0,2$ Zellen pro Gesichtsfeld gegenüber Kontrollwerten mit $1,8 \pm 0,4$ Zellen pro Gesichtsfeld. Das Erreichen des statistisch signifikanten Maximalwertes war nach 12 Stunden mit $14,2 \pm 0,6$ Zellen pro Gesichtsfeld zu verzeichnen.

Polymorphonukleäre inflammatorische Infiltration der intestinalen Muskularis (Zellen pro Gesichtsfeld)

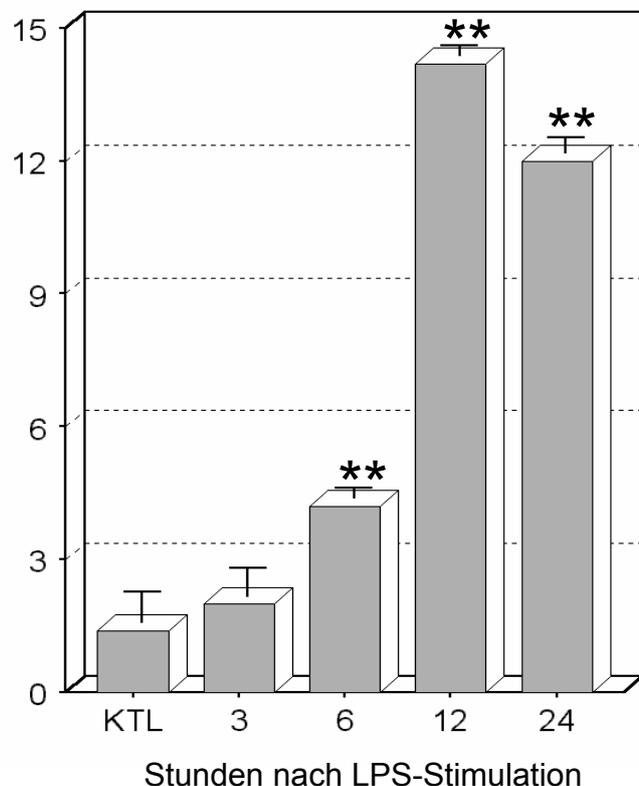


Fig. 10. Die histochemischen Untersuchungen an der Tunica muscularis mittels Myeloperoxidase-Färbung zeigten ein statistisch hochsignifikantes Maximum des inflammatorischen Infiltrates polymorphonukleärer Zellen 12 Stunden nach LPS-Injektion (Zellen pro Gesichtsfeld bei 200-facher Vergrößerung), (Mittelwert \pm SEM, n = 5, ** = p < 0,01), (KTL = Kontrolltiere).

Nach 24 Stunden zeigte sich eine Persistenz des inflammatorischen Infiltrates in der intestinalen Tunica muscularis, jedoch mit einem geringeren Leukozytenvorkommen mit $12 \pm 0,7$ Zellen pro Gesichtsfeld. Zusätzlich war mit zunehmender Infiltrationsdichte das Phänomen der Degranulation der MPO-positiven Zellen zu beobachten.

Kontrolle



24 Stunden nach LPS-Stimulation



Fig. 11. Die mikroskopischen Photos der Darmwandmuskularis eines Kontrolltieres sowie eines Tieres 24 Stunden nach LPS-Stimulation veranschaulichen die Zelldichte des polymorphonukleären Infiltrates in der intestinalen Muskularis.

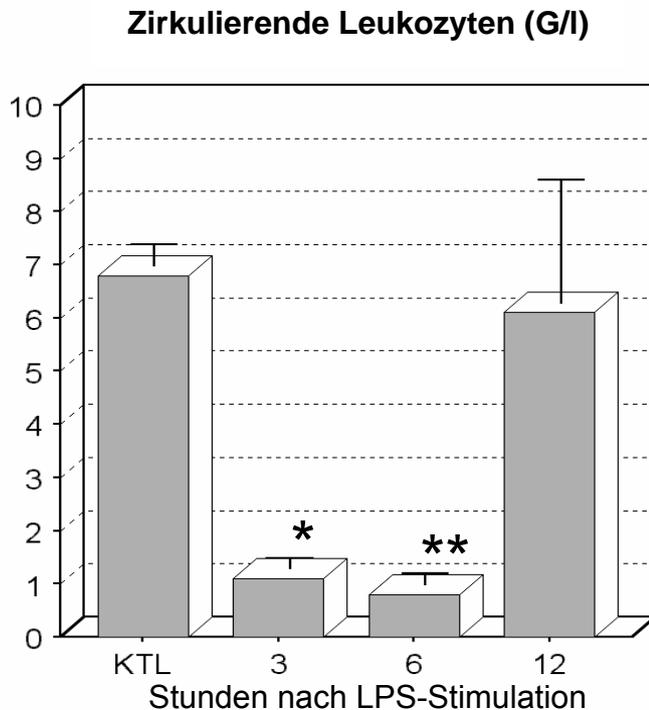
3.5 Differentialanalyse des systemischen Blutes

In der Analyse des roten Blutbildes der Versuchstiere zeigten sich die Parameter Hämoglobin und Hämatokrit, Erythrozyten, MCV und MCH während des gesamten Zeitverlaufes nach intraperitonealer LPS-Injektion unverändert zu den Werten der Kontrolltiere. Bei den Thrombozyten war nach 3 und verstärkt nach 6 Stunden (Kontrolle $820,5 \text{ G/l} \pm 115,5 \text{ G/l}$ vs. LPS $359 \text{ G/l} \pm 38,3 \text{ G/l}$) ein statistisch nicht signifikanter Abfall zu verzeichnen. Ein Tier zeigte zum Zeitpunkt von 12 Stunden eine weitere Verstärkung der Thrombopenie, bei den beiden anderen Tieren stiegen die Thrombozytenwerte wieder an.

Die stärkeren Veränderungen waren in der Betrachtung der Daten des weißen Blutbildes zu vermerken. Erwartungsgemäß fand sich eine hochsignifikante Leukopenie, die bereits schon bei 3 Stunden mit $1,1 \text{ G/l} \pm 0,3 \text{ G/l}$ gegenüber Kontrollwerten von $6,8 \text{ G/l} \pm 0,4 \text{ G/l}$ deutlich war und ihren Peak von $0,8 \text{ G/l} \pm 0,3$ nach 6 Stunden erreichte ($p <$

0,01). Nach 12 Stunden war eine Rückkehr zu den Werten der Kontrolltiere zu verzeichnen.

Fig. 12. Das Histogramm zeigt die signifikanten Veränderungen im systemischen Blut im Sinne einer Leukopenie (G/l) mit einer maximalen Ausprägung 6 Stunden nach intraperitonealer LPS-Injektion (Mittelwert \pm SEM, n = 3, * = < 0,05, ** = p < 0,01).



In der weiteren Auswertung der Leukozytensubpopulationen (Angabe in Prozent der Leukozytengesamtzahl) zeigte sich eine ausgeprägte Neutrophilie mit einem Maximum von 72 % \pm 0,6 % bei 6 Stunden (Kontrolle 7,5 % \pm 1,6 %) sowie konkordant hierzu eine Lymphopenie mit einem Minimum von 14,3 % \pm 4,1 % nach 3 Stunden (Kontrolle 83,2 % \pm 2,8 %). Die Neutrophilie und Lymphopenie waren ebenfalls statistisch signifikant (p < 0,01).

Monozyten und Basophile waren zu keinem Zeitpunkt signifikant verändert, die Population der Eosinophilen war zu den Zeitpunkten 3 und 6 Stunden deutlich, jedoch statistisch nicht signifikant erhöht.

Zirkulierende Neutrophile und Lymphozyten (%)

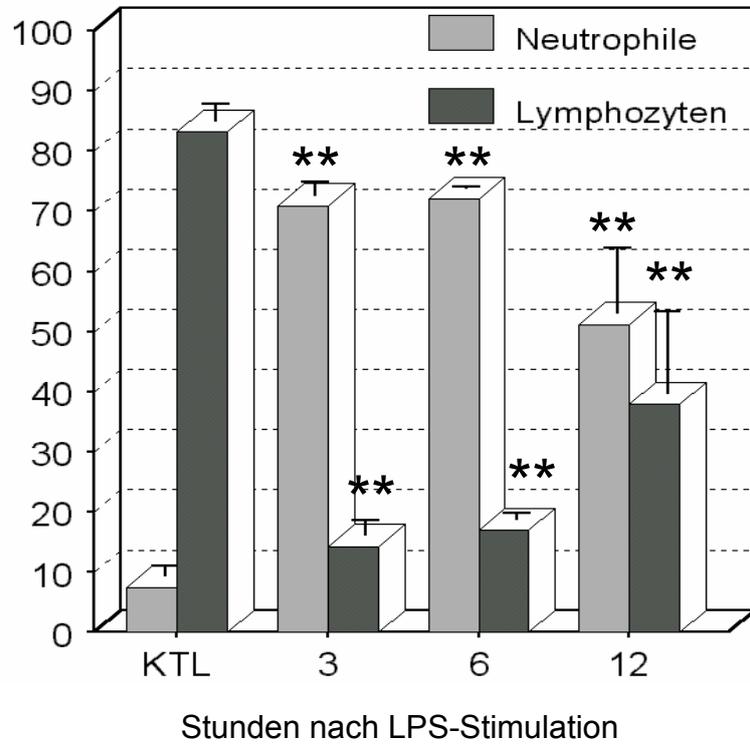


Fig. 13. Das Histogramm verdeutlicht die hochsignifikante Neutrophilie und Lymphopenie mit einem Peak bei 3 bis 6 Stunden nach LPS-Gabe der systemisch zirkulierenden Leukozytensubpopulationen (Angabe in % der Leukozytengesamtzahl, Mittelwert \pm SEM, n = 3, ** = p < 0,01), (KTL = Kontrolltiere).

4 Diskussion

In der durch Endotoxine verursachten Sepsis wird dem Darm eine bedeutende Rolle zugesprochen, er soll wesentlich an der Produktion inflammatorischer Mediatoren beteiligt sein. Der örtliche und zeitliche Ablauf der systemischen Ausbreitung der Sepsis ist jedoch weiterhin ungeklärt.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Rolle des Darmes im systemischen Entzündungsgeschehen weiter zu klären. Vor allem sollte die Induktion und systemische Freisetzung bekannter inflammatorischer Mediatoren untersucht werden und mit der lokal im Darm ablaufenden Entzündungsreaktion korreliert werden. Es wurde eine semiquantitative Bestimmung der mRNA der inflammatorischen Mediatoren (IL-1 β , IL-6 und TNF- α) im Darm und den mesenterialen Lymphknoten sowie in anderen Organen (Leber und Lunge) durchgeführt. Insbesondere wurde untersucht, ob der Darm im Vergleich zu anderen Organen zeitlich früher auf einen inflammatorischen Stimulus reagiert und ob sich quantitative Unterschiede in der Zytokinproduktion der einzelnen Organe zeigen. Dieses könnte Hinweise darauf geben, ob der Darm als „first responder“ und als Hauptproduktionsort dann die weitere systemische Entzündungskaskade in den anderen Organen leitet und unterhält. Zur genaueren Betrachtung wurde nicht der Darm allgemein analysiert, sondern eine Unterteilung in die Darmwandschichten Muskularis und Mukosa vorgenommen. Der Vergleich der Zytokinspiegel auf Proteinebene im systemischen und portalvenösen Blut sollte des weiteren Aufschluss über einen Transportweg der lokal produzierten Zytokine in den systemischen Kreislauf geben.

Die Untersuchungen zeigten, dass es in der systemischen Inflammation zu einer raschen Aktivierung aller Organe kommt. Eine zeitlich frühere Aktivierung des Darmes im Vergleich zu den anderen Organen und damit eine leitende Stellung des Darmes in der systemischen Inflammation konnte nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte jedoch gezeigt werden, dass der Darm und prädominant die Tunica muscularis eine quantitativ bedeutende Quelle inflammatorischer Mediatoren darstellen. Es besteht ein bisher vernachlässigtes, hohes Potential zur Reaktion auf inflammatorische Stimuli durch eine frühzeitige Aufregulierungskapazität in der Sepsis. In den hier durchgeführten Untersuchungen fand sich Interleukin-6 als das bedeutendste

„Indikator“-Zytokin der drei untersuchten Zytokine für eine lokale intestinale Aufregulation im Rahmen einer systemischen Inflammation.

Die fehlenden Unterschiede zwischen den Serumproteinspiegeln der Zytokine Interleukin-1 β , Interleukin-6 und TNF- α zwischen systemischem und portalvenösem Blut sowie die relativ hohen mRNA-Spiegel in den mesenterialen Lymphknoten implizieren die Lymphwege als alternativen Verbreitungsweg für die lokal intestinal produzierten Zytokine (Deitch, 2001).

Die genauen Pathomechanismen, die Funktion und das Ausmaß der Beteiligung der einzelnen Organe am Gesamtgeschehen der systemischen Inflammation mit SIRS, Sepsis, septischem Schock und Multiorganversagen sind komplex und in ihren Einzelheiten nur zum Teil verstanden. Unbestritten und evident ist jedoch die ökonomische und schicksalhafte Bedeutung der Krankheitsbilder, denn trotz hocheffektiver Antibiotikatherapie und supportiver Behandlung konnte keine signifikante Reduktion der Mortalitätsrate des Multiorganversagens von bis zu 75 % in den letzten 2 Dekaden erreicht werden (Livingston und Deitch, 1995). Die Inzidenz des Multiorganversagens bleibt hoch, Cumming et al. fanden in ihren Analysen von Patienten mit schweren Verbrennungen in 17,6 % ein Multiorganversagen und in 28 % eine Entwicklung von schwerer Multiorgandysfunktion (Cumming et al., 2001). Weiterführend wird in der Literatur eine Mortalitätsrate abhängig von der Anzahl der involvierten Organe und ihrer zeitlichen Persistenz beschrieben mit einer 60%-igen Mortalität bei einem Versagen von 2 Organen über mehr als 3 Tage und sogar einer 90%-igen Mortalität bei einem Funktionsverlust von mehr als 3 Organen über 3 Tage (Murray und Coursin, 1993). Insgesamt waren diese hohen Mortalitätsraten erklärbar durch das Auftreten von Organdysfunktionen des kardiovaskulären, gastrointestinalen, hepatischen, hämatopoetischen, pulmonalen und renalen Systems unabhängig von dem primär erkrankten Organ. Insbesondere in Bezug auf das Versagen des gastrointestinalen Systems wurden bei Untersuchungen an Multiorganversagen verstorbenen Patienten eine Häufigkeit von 68 % angegeben (Sheridan et al., 1998).

Bereits vor Entwicklung eines Multiorganversagens kommt es häufig zum Auftreten eines sepsis-induzierten, paralytischen Ileus, wobei im Darm generierte Zytokine und

kinetisch aktive Mediatoren, welche zu einer Beeinträchtigung der koordinierten, propulsiven intestinalen Peristaltik führen, als Hauptfaktoren angeschuldigt werden (Eskandari et al., 1999a). Regelmäßig kommt es in der Inflammation zu einem Zusammenbrechen der intestinalen mukosalen Barriere mit Translokation bakterieller Bestandteile und erhöhter parazellulärer Permeabilität (Fink, 1994). Dieses wird gefördert durch eine intestinale Stase mit bakterieller Überwucherung der ohnehin intraluminal vorhandenen großen Anzahl von bakteriellen Organismen im paralytischen Ileus (Bauer et al., 2002). Pathogenetisch ist diese Abfolge auch für Vorgänge ohne detektierbare Bakteriämie wie hämorrhagischem Schock, Ischämie-Reperfusion und intestinaler Manipulation beschrieben (Goris, 1996). Die zunächst lokal ablaufenden Entzündungsreaktionen können bei Fortschreiten sowie Kontrollverlust der Inflammation die Organgrenzen überschreiten und durch Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren eine systemische Entzündungsreaktion hervorrufen. In der Sepsis scheinen die Organe somit simultan als Ziel und Quelle der unkontrollierten Inflammation sowohl „Opfer“ als auch „Täter“ zu sein. So konnte zum Beispiel für die Lunge bereits nachgewiesen werden, dass einerseits zirkulierende Immunzellen und Zytokine an der akuten pulmonalen Dysfunktion beteiligt sind, andererseits die Lunge selbst potente Quelle inflammatorischer und prokoagulatorischer Zytokine ist (Happel et al., 2004).

In den vorliegenden Untersuchungen wurde bei Ratten durch eine intraperitoneale Bolusgabe von LPS eine Endotoxinämie induziert und nachfolgend die mRNA-Induktion inflammatorischer Zytokine zu unterschiedlichen Zeitpunkten detektiert. Untersucht wurden die Organe Lunge, Leber sowie die mesenterialen Lymphknoten und der Darm separiert in die Darmwandschichten Muskularis und Mukosa. Die Mukosa hat als endoluminal zugewandte Schicht zwar häufig direkten Kontakt zu Fremddantigenen, wird jedoch in der Sepsis durch Schädigung und Zerstörung funktionell beeinträchtigt. In der Tunica muscularis wurde dagegen ein residentes Netz an Makrophagen, welche als Produktionsorte inflammatorischer Zytokine bekannt sind, identifiziert (Kalff et al., 1998). Insgesamt macht das darmassoziierte lymphatische Gewebe (gut associated lymphatic tissue, GALT) ungefähr die Hälfte bis Zweidrittel des gesamten lymphatischen Gewebes des Körpers aus (James et al., 1988).

Als Sepsismodell mit Induktion einer Inflammation sind mehrere Methoden bekannt, neben der intraperitonealen LPS-Applikation existiert die Option einer Sepsisinduktion über die zökale Ligatur und Punktion (Cecal Ligation and Puncture, CLP) sowie eine durch Stentung des Colon ascendens hervorgerufene Peritonitis (Colon Ascendens Stent Peritonitis, CASP). Da experimentell erfolgreiche Immunotherapien der Sepsis mit Blockierung von Zytokinen in klinischen Studien nicht reproduzierbar waren, wurde das Modell der intraperitonealen LPS-Applikation als nicht valide zur klinischen Situation der Sepsis kritisiert.

Die intraperitoneale Applikation ist ein experimentell etabliertes Sepsismodell mit intraabdominalem Ursprungsort der Infektion. In Studien zum Vergleich der Methoden zeigten sich für LPS und CLP gleiche Mortalitäts- und Morbiditätsraten. Es wurde jedoch ein differierender Zeitverlauf und eine unterschiedlich hohe Induktion der inflammatorischen Zytokine nachgewiesen, wobei LPS das absolut höhere Maximum der plasmatischen und peritonealen Mediatorspiegel für TNF-alpha, IL-1, IL-6 sowie der Chemokine KC und MIP-2 nach 1,5 bis 4 Stunden verursachte, während die Mediatorspiegel nach CLP ihr Maximum erst verzögert nach 8 Stunden erreichten (Remick et al., 2000). Es besteht im Modell der CLP jedoch eine hohe Variabilität des Ausmaßes der inflammatorischen Induktion je nach Anzahl der Punktionen und der zur Punktion verwendeten Nadelgröße (Otero-Antón et al., 2001) sowie des Abstandes zwischen Bauhin'scher Klappe und Lokalisation der Ligatur (Singleton und Wischmeyer, 2003), welche die Vergleichbarkeit von Studien untereinander erschwert. In der CASP-Methode wird ein Stent über eine chirurgisch gesetzte Inzision in das Colon ascendens inseriert mit der Folge einer Peritonitis, da endoluminale Bakterien kontinuierlich in die Peritonealhöhle gelangen (Maier et al., 2004). Das Ausmaß der Peritonitis sowie allgemein der Entzündungsreaktion ist vom Stentdurchmesser abhängig.

Im Rahmen des übergreifenden Projektes gab es 3 Ansatzpunkte: die systemische Inflammation in der Endotoxinämie, ein lokales Trauma mittels standardisierter intestinaler Manipulation nach Laparotomie sowie ein peripheres Trauma durch Fraktur und Osteosynthese eines langen Röhrenknochens. Sowohl für die CLP-Methode als auch für die CASP-Methode ist als Zugang zur Bauchhöhle eine Laparotomie und somit additiv zur intraabdominellen Infektion ein chirurgisches Trauma notwendig. Somit kam in dieser Arbeit bewusst die intraperitoneale LPS-Applikation als Modell eines primär im

Abdomen stattfindenden Sepsisherde zur Anwendung, um ein systemisches Trauma in Abgrenzung von den weiteren oben genannten separaten Untersuchungen zu setzen und gleichzeitig die hohe Variabilität der anderen Methoden zu vermeiden.

Es zeigte sich eine messbare Basisexpression aller Zytokine in allen Geweben der unbehandelten Kontrolltiere. Auffällig hoch waren die Basiswerte für IL-1 β in der Lunge und in den mesenterialen Lymphknoten. Die hohen Basiskonzentrationen auch für IL-6 und TNF- α in der Lunge könnten konstitutiv für das in einer großen Kontaktfläche mit der Umwelt stehende Organ und damit ständigem Antigenkontakt sein, ggf. aber auch durch eine Reizung durch das eingesetzte Inhalationsnarkotikum Methoxyflurane bedingt sein. Dieses wurde jedoch verwendet, da das Hauptaugenmerk der Untersuchungen in der Analyse des Darmes lag und es die geringste Beeinflussung der Darmmotilität gegenüber anderen Narkotika haben soll. Bestätigt wurden vor allem die hohen Werte des Zytokin IL-1 β in aktiviertem Lungengewebe durch Untersuchungen von Pugin et al., die in der bronchoalveolären Lavage von ARDS-Patienten eine prädominante Rolle von IL-1 auf alveolarem Level beschrieben (Pugin et al., 1996). Dass es bei einer ebenfalls großen Austauschfläche im Darm nicht zu einer hohen Basisexpression von IL-1 β kommt, ließe sich dadurch erklären, dass bei intakter Mukosa die von endoluminal aufgenommenen Antigene abtransportiert werden ohne in Kontakt zur Muskularis und damit zum residenten Makrophagennetz zu kommen. Die Reaktion auf Antigene würde auch nicht in der Mukosa direkt, sondern erst nachfolgend in einer nachgeschalteten Station erfolgen. Da die Werte in den mesenterialen Lymphknoten ebenfalls deutlich erhöht sind, könnte dies auf den Lymphweg als Transportweg der intestinal aufgenommenen Antigene hindeuten. Die Sterilität der intestinalen Lymphe wird auf ein Herausfiltern der translozierenden Endotoxinen oder Bakterien in den mesenterialen Lymphknoten oder sogar bereits in der Darmwand zurückgeführt (Deitch, 2002).

Als Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus zeigten alle untersuchten Organe eine frühe, zeitgleiche mRNA-Induktion zum Zeitpunkt 3 Stunden nach LPS-Gabe. In bisher nicht veröffentlichten Daten (Kalff et al.) fand sich korrelierend zu diesem Zeitpunkt auch in polymorphonukleären Zellen des Knochenmarks eine mRNA-

Induktion. Eine frühzeitige Aktivierung des Darmes vor anderen Organen konnte somit weder in der Muskularis noch in der Mukosa nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein unterschiedlicher zeitlicher Verlauf der Aktivierung der Organe früher als 3 Stunden nach LPS-Gabe vorliegt.

Es zeigte sich eine Erhöhung der absoluten mRNA-Induktion 3 Stunden nach LPS-Injektion für alle Zytokine in allen Geweben ausgenommen der Werte für IL-6 und TNF- α in der Leber. Die Muskularis zeigte ein hohes inflammatorisches Potential mit einer statistisch hochsignifikanten Steigerung der Absolutwerte für IL-6 und TNF- α . Für das Zytokin IL-1 β fand sich der höchste Absolutwert entsprechend der hohen Basiswerte in der Lunge. Allgemein war die mRNA-Induktion zum Zeitpunkt 6 Stunden nach LPS-Gabe rückläufig und persistierte nach 12 Stunden auf niedrigerem Niveau in nahezu allen Organen. Ähnliche Resultate zeigten sich in experimentellen Studien von Remick et al. im Jahr 2000, die Forschergruppe wies das Maximum der Zytokinspiegel von TNF-alpha, IL-1 und IL-6 im Plasma sowie in peritonealer Flüssigkeit zwischen 1,5 und 4 Stunden nach intraperitonealer LPS-Gabe nach mit verminderter Induktion der Zytokinspiegel nach 8 Stunden (Remick et al., 2000).

Da die in vivo und in vitro Präparation bereits einen potenten Stimulus zur Aktivierung des Immunsystems darstellt, musste zur Einordnung der mRNA-Induktion ein Vergleich mit Kontrolltieren vorgenommen werden. Im Vergleich des Vielfachen des jeweiligen Kontrollwertes fand sich das Zytokin IL-6 als der bedeutendste Marker für die lokale Reaktion auf eine systemische Inflammation, denn die mRNA-Spiegel waren am deutlichsten in den Geweben gegenüber den Kontrollwerten erhöht. Zudem zeigte sich, dass unter den untersuchten Geweben die Muskularis als Produktionsort für die reaktive Ausschüttung der untersuchten Zytokine eine herausragende Stellung einnimmt mit einem hohen Reaktionspotential, denn in der Muskularis war sowohl für Interleukin-1 β als auch Interleukin-6 die höchste Induktion zu verzeichnen. Aber auch in der Mukosa und in der Lunge war für IL-6 ein hohes Potential zur Reaktion auf inflammatorische Stimuli zu verzeichnen.

Für die Leber lässt sich hinsichtlich des Vielfachen gegenüber den Kontrolltieren für IL-6 keine Aussage machen, da die Proben der Kontrolltiere aufgrund der Auswertung der Schmelzkurvenanalyse ausgeschlossen werden mussten. Dieses könnte bei niedriger

initialer Menge des Zielgenes durch Primer-Dimere verursacht sein, welche entsprechend ihrer geringen Basenpaarlänge schneller in die Einzelstrangform übergehen und dabei einen breiteren Peak verursachen. Des Weiteren kommt eine ungenügende RNA-Extraktion beziehungsweise Herstellung der cDNA des gesuchten PCR-Endproduktes in Betracht.

Die zum Teil niedrige statistische Signifikanz in der Analyse der mRNA-Induktion ist mitbegründet in der kleinen Anzahl der Tiere pro Gruppe und hohen Standardabweichung, welche in der zeitlich unterschiedlichen Aktivierung einzelner Zellen liegen kann.

Resultierend aus dem Zeitverlauf mit dem Maximum der mRNA-Induktion vor histochemisch nachweisbarer inflammatorischer Infiltration der intestinalen Muskulatur musste die reaktive Aufregulierung der inflammatorischen Zytokine auf Transkriptionsebene in residenten Zellen der Muskelschicht, die zur Synthese dieser Zytokine fähig sind, hervorgerufen worden sein. Diese fungieren als Trigger der systemischen Inflammation als Reaktion auf intestinale Manipulation und bakterielle Stimulation beziehungsweise Translokation. In der Veröffentlichung von Kalff et al. wurde der immunhistochemische Nachweis von bereits fetal vorhandenen, ein residentes Netzwerk formenden Makrophagen, die in einer primären Kultur glatter Muskulatur in einem Verhältnis von 1 : 15 zu den Muskelzellen standen, erbracht (Kalff et al., 1998). Diese waren nachweislich durch potente Stimuli rasch aktivierbar (Kalff et al., 1999a).

Makrophagen können über 100 verschiedene Substanzen, unter anderem Prostaglandine, Leukotriene, Zytokine und Stickstoffmonoxid (NO) sezernieren (Nathan, 1987). Neben den hier untersuchten inflammatorischen Mediatoren sind die oben genannten von Makrophagen in der Inflammation sezernierten Mediatoren bekannt für die Beeinflussung der glatten Muskelfunktion und sind somit an der Pathogenese des Sepsis-induzierten paralytischen Ileus beteiligt (Eskandari et al., 1999b).

Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine niedrige basale Expression von induzierbarer NO-Synthase (iNOS) nach LPS-Stimulation signifikant mit einer 20-fachen Erhöhung über Werte von Kontrolltieren gesteigert wurde und mit einer 68 %-igen

Reduktion spontaner Muskelaktivität in vitro 12 Stunden nach LPS-Injektion einhergehend, welche nach selektiver Blockade der induzierbaren NO-Synthase teilreversibel war (Eskandari et al., 1999a). Die nachweisbare höhere Sensitivität der zirkulären intestinalen Muskelschicht korrelierte mit der Prädominanz des immunhistochemischen Nachweises von iNOS in dem dichten Netz der residenten Makrophagen der Muskularis in der zirkulären Muskelschicht. Ähnliche Resultate konnten Cullen et al. 1999 in einer LPS-induzierten Endotoxinämie mit signifikantem Anstieg der Enzymaktivität der induzierbaren und konstitutiven Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS und cNOS) in der glatten Muskulatur des Jejunums und Ileums via Aufregulation des Enzyms auf Proteinebene belegen. In den gleichen Untersuchungen konnte die Dysregulation des intestinalen Transit durch die Gabe von Oxyhämoglobin, einem Neutralisator für NO, normalisiert werden. Somit wurde NO neben der Funktion der endogenen Vasodilatation im Rahmen der endotoxin-induzierten Hypotension eine bedeutende Rolle in der Beeinflussung der Muskelkontraktilität zugesprochen (Cullen et al., 1999). Weiterführend belegten Kalff et al. im Jahr 2000, dass in iNOS-knockout-Mäusen eine signifikant geringere Leukozyteninfiltration nach chirurgischer Manipulation eintritt und eine Beeinflussung der Muskelkontraktilität ausbleibt (Kalff et al., 2000). Neben NO gelten zudem über eine Koinduktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2) ebenfalls aus der Darmwand freigesetzte Prostaglandine als wesentlicher Faktor in der Verursachung von reduzierter intestinaler Muskelkontraktilität und verzögertem intestinalen Transit nach chirurgischer Manipulation (Schwarz et al., 2001). COX-2 spielt als induzierbares Enzym auch in der frühen inflammatorischen Phase eine Rolle, denn es kann über LPS, Wachstumsfaktoren und inflammatorische Zytokine getriggert werden. Zudem entwickeln Cox-2-defiziente Knock-out-Mäuse leichter Infektionen (Schwarz et al., 2002).

Der Wirkmechanismus von LPS auf zellulärer Ebene der mononukleären Zellen ist weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. LPS, welches einem Glykolipid der äußeren Bakterienmembran entspricht, wird an das Lipopolysaccharide-binding-Protein (LBP) gebunden. LBP katalysiert als Akute-Phase-Protein in niedrigen Konzentrationen den Transfer zum zellulären LPS-Rezeptor der mononukleären Zellen (Monozyten und Makrophagen) (Zweigner et al., 2001). Hierbei triggert LPS eine physikalische Nähe

zwischen dem membrangebundenen CD14 und dem signaltransduzierenden Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), aufgrund derer eine nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B und dessen induzierter Expression der Zielgene stattfindet (Jiang et al., 2000). Die Analyse von Knock-out Mäusen zeigten, dass der Signalweg über TLR4-MyD88 essentiell für die Antwort auf eine LPS-Stimulus ist (Nomura et al., 2000). Nomura und Sato wiesen in ihren Publikationen allerdings auch nach, dass mit LPS vorbehandelte Makrophagen auf eine erneute LPS-Stimulation in einer zeit- und dosisabhängigen Weise mit einer verminderten TNF- α -Produktion reagierten. Dieser als LPS-Toleranz beschriebene Mechanismus wurde primär auf eine nachweisbare verminderte membranständige Expression des TLR4-MD2-Komplexes zurückgeführt (Nomura et al., 2000), (Sato et al., 2000). Ferner konnte nachgewiesen werden, dass aus der Kombination eines milden intestinalen Traumas und einer niedrigen Dosis exogenen LPS eine synergistische Inflammation mit Induktion einer intestinalen Paralyse resultiert (Schwarz et al., 2000). Bei einer zeitlich versetzten Vorbehandlung mit einer funktionell unbedeutenden LPS-Dosis vor chirurgischer Manipulation blieb die Alteration des intestinalen Transit jedoch aus.

Der Signaltransduktion und Aktivierung auf Transkriptionsebene mit Bindung der Transkriptionsfaktoren an DNA-Promoter-Regionen folgt die Transkription und Translation, wobei in der systemischen Inflammation ein Teil der humoralen Immunabwehr aus der Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α besteht. Diese lokal produzierten Zytokine werden in die systemische Zirkulation transportiert. Im hämorrhagischen Schock mit splanchnischer Hypoperfusion wurden erhöhte Werte des Zytokins IL-6 portalvenös nachgewiesen (Deitch et al., 1994). Es galt zu prüfen, ob das portalvenöse Blutgefäßsystem auch in der systemischen Inflammation als Transportweg für die lokal intestinal produzierten Zytokine fungiert.

In dieser Arbeit zeigte sich im Nachweis der Zytokine auf Proteinebene ein singulärer Peak für IL-6 nach 3 Stunden beziehungsweise IL-1 β nach 6 Stunden mit hochsignifikanter Steigerung gegenüber Kontrollen mit minimalen, nicht messbaren Konzentrationen. In der Analyse für TNF- α fand sich ein Peak bei 3 Stunden, die Werte waren aufgrund der hohen Standardabweichung jedoch nicht verwertbar. Bei einem für

die Translation der induzierten mRNA sehr frühen Zeitbereich wurde angenommen, dass das Maximum der Serumproteinspiegel aller Zytokine zwischen 3 und 6 Stunden lag. Es zeigte sich ein rascher Abfall auf unterhalb der Nachweisgrenze liegende Werte zu den Zeitpunkten 12 und 24 Stunden nach LPS-Injektion. Diese Ergebnisse wiesen aufgrund des Zeitverlaufes erneut darauf hin, dass die Zytokine durch residente Zellen generiert wurden vor der Entstehung einer signifikanten lokalen Leukozyteninfiltration.

Im Vergleich der Absolutwerte fand sich eine deutliche Dominanz des Zytokins IL-6 gegenüber dem maximalen Serumproteinspiegel für IL-1 β und für TNF- α . Die maximale Induktion von IL-6 war im Vergleich zu IL-1 β 184-fach und zu TNF- α 40-fach höher. Hiermit bestätigt sich in Übereinstimmung mit den Daten der mRNA-Induktion die prädominante Rolle von IL-6 unter den 3 untersuchten Zytokinen im Rahmen einer LPS-induzierten Endotoxinämie.

Die Gegenüberstellung der Werte des portalvenösen und cavalen Blutes ließ für alle Zytokine und zu allen Zeitpunkten keine statistischen Unterschiede erkennen. Das zeitlich parallele Auftreten und die identischen Konzentrationen der Zytokine im portalen und systemischen Blut lassen eine hämatogene Verbreitung dieser lokal produzierten Mediatoren nicht nachweisen.

Ein alternativer Verteilungsweg für die systemische Verbreitung der Zytokine wäre die direkte Aufnahme der Mediatoren in die Lymphwege. In den mesenterialen Lymphknoten ließen sich relativ hohe absolute mRNA-Spiegel nachweisen, die mRNA-Induktion im Vergleich zu Kontrolltieren war jedoch im Vergleich mit den anderen Geweben sowohl für IL-6 und TNF- α am niedrigsten. Die Lunge ist das erste Organ, welches von der über den Venenwinkel einfließenden intestinalen Lymphe aus dem Ductus thoracicus durchströmt wird. Hieraus zieht Deitch die Schlussfolgerung, dass sich die häufige Rate von ARDS im Beginn des MOV über eine durch eine hohen Gehalt von (endogenen oder exogenen) Entzündungsmediatoren in der intestinalen Lymphe erklären lässt (Deitch, 2001). Die Exposition von endothelialen Zellkulturen mit nach hämorrhagischem Schock gewonnener mesenterialer Lymphe, nicht jedoch mit portalem Blutplasma bewirkte eine Erhöhung der Zellpermeabilität (Magnotti et al., 1998). Als weiterer Hinweis darauf, dass lokal im Darm produzierte Faktoren über die mesenteriale Lymphe in die systemische Zirkulation gelangen, konnte gezeigt werden, dass durch

Ligatur des Ductus thoracicus eine Lungengewebsschädigung mit Apoptose und Neutrophileninfiltration nach hämorrhagischem Schock (Magnotti et al., 1998) sowie auf molekularer Ebene die Aufregulation von ICAM-1 in pulmonalen, hepatischen und intestinalen Endothelzellen und von P-Selectin in pulmonalen und hepatischen Endothelzellen nach kombiniertem Trauma/Hämorrhagischem Schock verhindert wurde (Xu et al., 2004).

Nach intestinaler Manipulation wurde ein postoperativer transientser luminolymphatischer Weg mit vorübergehend erhöhter Mukosapermeabilität durch den Nachweis von zuvor intraluminal applizierten Mikrosphären (0.8 µm) in die Lymphwege gezeigt, welche nach extraintestinaler Phagozytose ortsunabhängig in den infiltrierenden Monozyten der Tunica muscularis beobachtet wurden. Die Unterbindung der Lymphwege durch Ligatur des infradiaphragmalen Ductus thoracicus verhinderte das Auftreten von Mikrosphären-beladenen Phagozyten in der Tunica muscularis, ein Leukozyteninfiltrat der Tunica muscularis war jedoch unverändert nachweisbar (Schwarz et al., 2002).

Als weitere Möglichkeit kommt die Exsudation der Mediatoren nach intraperitoneal über das Mesothel der Serosa (viszerales Peritoneum) in Betracht, ähnlich den Vorgängen einer Peritonealdialyse. Serosal besteht nur einer geringe Barrierefunktion des Mesothels durch Poren und Interzellularspalten. In dem Peritoneum parietale stehen spezialisierte Einmündungsöffnungen (Stomata) von direkt aus dem Peritonealmesothel abzweigenden Lymphkapillaren in kontinuierlicher Verbindung mit der Bauchhöhle (Fleischhauer und Drenckhahn, 1994). Beide Alternativen würden zu erhöhten Mediatorspiegeln in der Cisterna chyli als Kollekte des Truncus lumbalis dexter und sinister sowie des Truncus intestinalis führen.

Des Weiteren wurde die LPS-induzierte leukozytäre Rekrutierung in die zirkuläre Tunica muscularis untersucht. Bei den hier angewandten Untersuchungen nach einmaliger intraperitonealer Bolusgabe von LPS erfolgt neben einer direkten Aktivierung zirkulierender Leukozyten auch eine Stimulation der residenten Makrophagen der Tunica muscularis.

Als ursächlich für die Leukozytenrekrutierung wird derzeit die Aktivierung der bereits oben erwähnten intestinalen mononukleären Zellen, welche als ausgedehntes

residentes Netzwerk innerhalb der intestinalen Tunica muscularis mit einer Densität von 156.5 ± 5.12 Zellen/mm² existieren und ontogenetisch durch Absiedlung zirkulierender Monozyten entstehen, angesehen. Neben der vorherrschenden Population von Makrophagen wurden eine Ansammlung weiterer Leukozyten in der intestinalen Muskulatur nachgewiesen, unter anderem dendritische Zellen, Neutrophile, Mastzellen, natürliche Killer-Zellen und T-Zellen (Kalff et al., 1998). Als höchst potente Abwehrzellen des Immunsystems sind sie unter anderem durch bakterielle Stimulation und die Verletzung der Integrität der Gewebe aktivierbar in ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation, Phagozytose und Synthese inflammatorischer Mediatoren. In der intestinalen Muskulatur umzirkeln sie die Gefäße und könnten so via Mediatoren die Aufregulation von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 und P-Selectin) des Endothels steuern. Nach Blockade des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und der leukozytären Liganden CD11a und CD 18 mit selektiven Antikörpern blieb die massive leukozytäre Rekrutierung über die leukozytären Liganden LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18) sowie nachfolgend die reduzierte Kontraktilität der jejunalen Muskulatur aus (Kalff et al., 1999b). Generell kann das Adhäsionsmolekül ICAM-1 (CD54) durch Zytokine (IL-1, TNF- α , IFN γ), freie Radikale und LPS induziert werden, P-Selectin wird zum Beispiel durch Stimuli wie LPS und TNF- α aufreguliert.

In der mikroskopischen Analyse der Tunica muscularis von Kontrolltieren fand sich nur eine sehr geringe Anzahl polymorphonukleärer Zellen. Nach bereits statistisch signifikanter leukozytärer Infiltration der intestinalen Tunica muscularis zum Zeitpunkt 6 Stunden nach LPS-Injektion erreichte die Rekrutierung der Leukozyten ihr Maximum nach 12 Stunden mit durchschnittlich 14 Zellen pro Gesichtsfeld im histochemischen Nachweis. Die zu beobachtende Degranulation der infiltrierenden Zellen könnte einer parakrinen Freisetzung von Mediatoren wie NO, Prostaglandinen, Sauerstoffradikalen und Histaminen entsprechen, welche umliegende Muskelzellen in ihrer Funktion beeinflussen.

Bei gleichem Zeitverlauf der leukozytären Infiltration handelt es sich bei der LPS-induzierten Chemotaxis jedoch nur um eine milde inflammatorische Antwort im Vergleich zum direkten mechanischen Trauma in dem Modell der chirurgischen Manipulation mit einer Dichte der infiltrierenden Zellen von $105,3 \pm 5,18$ nach 24 Stunden (Kalff et al.,

1999a). Die Ergebnisse verdeutlichen dennoch, dass es in der Endotoxinämie zu einer lokalen Entzündungsreaktion mit leukozytärer Infiltration in die Darmwandmuskularis kommt. Dass diese vergesellschaftet ist mit einem in vivo verlängerten Transit durch Muskelkontraktionshemmung wurde in der Literatur unter Durchführung von Tierexperimenten mehrfach beschrieben (Kalff et al., 1999a). Ähnliche Resultate mit Aktivierung residenter Makrophagen der Muskularis externa, Induktion und Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6, TNF- α) und kinetisch aktiven Mediatoren (COX-2) sowie Rekrutierung von Leukozyten konnte auch an intraoperativ entnommenen humanem Gewebe gezeigt werden (Kalff et al., 2003).

LPS ist als potenter Agonist zur Induktion einer systemischen Inflammation auch mit direkter Aktivierung der zirkulierenden Leukozyten bekannt (Cohen, 2002), (Jiang et al., 2000), (Zweigner et al., 2001) und bewirkt somit Veränderungen des roten und weißen Blutbildes. Bei relevanten Infektionen kommt es üblicherweise zur Ausbildung einer Leukozytose mit klassischer Linksverschiebung sowie Thrombozytose, welche bei Aggravierung des Krankheitsbildes mit SIRS, Sepsis und septischem Schock häufig zu einer entgegengesetzten Veränderung des Blutbildes mit Leukopenie und Thrombopenie im Rahmen der Myelosuppression umschlägt.

In der Analyse des Blutbildes zeigt die Entwicklung einer klinisch bekannten Leukopenie mit signifikant erhöhtem Neutrophilenanteil hierbei an, dass die zunächst lokale Entzündungsreaktion mit Zytokinfreisetzung unter LPS-Stimulation und nachfolgender muskulärer Rekrutierung verschiedener Leukozytenpopulationen systemische Auswirkungen nahm und so die Persistenz beziehungsweise Progression der systemischen Inflammationskaskade leitete.

Die hierbei zeitlich auftretende Differenz einer frühen systemischen Leukopenie nach 3 Stunden vor nachweisbarer signifikanter Leukozyteninfiltration in der Muskularis zu 6 beziehungsweise maximal zu 12 Stunden nach LPS-Gabe könnte durch den Vorgang der Extravasation mit Adhäsion, Rolling und transendothelialer Migration der Blutgefäße bedingt worden sein mit nachfolgender Unterteilung des intravasalen Blutpools in einen zirkulierenden Anteil und einen marginalen, mit der Blutabnahme nicht mehr erreichbaren Anteil. Aus Studien zur in vivo Analyse der Mikrozirkulation mittels

Intravital-Mikroskopie ist bekannt, dass die Leukozyten-Endothel-Interaktion vorwiegend in den postkapillären Venulen stattfindet (Schaser et al., 2000). Bereits 2 Stunden nach einem definierten Weichteiltrauma erhöht sich die Zahl rollender Leukozyten von normalerweise 20 % auf 50 % des totalen intravasalen Leukozytenflusses sowie die Anzahl der permanent endothelial adhärenenten Leukozyten von 180/m² auf 900/m² der endothelialen Oberfläche (Schaser et al., 2004). Des weiteren befinden sich von der Gesamtzahl der Lymphozyten eines Körpers nur 2 % intravasal mit kontinuierlichem Austausch zwischen intra- und extravasalem Anteil (Pabst, 1994), so dass eine Verminderung beziehungsweise Blockade der physiologischen Rezirkulation via Lymphwege aus dem extravasalem Lymphozytenanteil auch ohne Veränderung der transendothelialen Migration eine Verminderung des intravasalen Anteils bewirken würde.

5 Zusammenfassung

Nach wie vor besteht eine signifikante Morbidität und Mortalität des sepsisinduzierten paralytischen Ileus sowie des Multiorganversagens, wobei die exakten Pathomechanismen noch nicht vollständig geklärt sind.

Der Darm nimmt eine besondere Bedeutung in der Entstehung einer systemischen Entzündungsreaktion mit Funktionseinschränkung multipler Organe wie zum Beispiel Lunge, Niere, Leber und Darm, bis hin zum Multiorganversagen ein. Bei Kontrollverlust über eine lokale Entzündungsreaktion werden die Organgrenzen mit Freisetzung inflammatorischer Mediatoren überschritten und eine unkontrollierte systemische Inflammation kann entstehen. Hierbei stellen die einzelnen Organe sowohl Ziel als auch Quelle der Inflammation dar, bei Perpetuierung des Vorganges mit Dysbalance zwischen antiinflammatorischen und proinflammatorischen Mediatoren kann sich ein Multiorganversagen entwickeln. Ziel dieser Untersuchungen war es, die Rolle des Darmes in einer abdominell-vermittelten Sepsis mit Definition der zeitlichen und örtlichen Ausbreitungsmechanismen weiter zu klären. Insbesondere wurde untersucht, ob der Darm sich in seiner zeitlichen Aktivierung von anderen Organen unterscheidet und somit eine leitende Position („first responder“) einnimmt. Des Weiteren wurde analysiert, ob der Darm den Hauptproduktionsort für inflammatorische Zytokine darstellt und hierdurch den weiteren Verlauf der systemischen Inflammation hauptsächlich unterhält und lenkt. Die Darmwandschichten wurden in Muskularis und Mukosa getrennt untersucht. Die Untersuchungsergebnisse sollten zudem Hinweise auf einen möglichen Transportweg der lokal intestinal produzierten Zytokine in die systemische Zirkulation geben. Methodisch wurde zur Induktion einer originär abdominellen Sepsis die intraperitoneale LPS-Applikation gewählt, andere etablierte Optionen wie zökale Ligatur und Punktion (cecal ligation and puncture, CLP) oder durch Colonstentung induzierte Peritonitis (Colon ascendens stent peritonitis, CASP) kamen aufgrund der gewünschten Abgrenzung zu einem chirurgischen Trauma nicht zur Anwendung.

In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich eine zeitgleiche inflammatorische Reaktion auf den systemischen Stimulus durch alle Organe. Es fand eine zeitlich korrelierende Aktivierung der polymorphonukleären Zellen sowohl in den zirkulierenden Leukozyten als auch im Knochenmark statt. Eine mögliche Ursache hierfür ist, dass der

Zeitpunkt für den Darm als „first responder“ mit einer früheren Aktivierung der inflammatorischen Antwort im Darm als in den anderen Organen verpasst wurde und demnach früher als 3 Stunden nach Stimulation liegt. Andererseits ist es wahrscheinlich, dass der Darm in der systemischen Inflammation zeitgleich mit den anderen Organen aktiviert wird. Die Hypothese, dass die Inflammation aus dem Intestinum geleitet und gesteuert wird, konnte nicht bewiesen werden.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen zeigte sich im Darm aber ein hohes Potential auf inflammatorische Stimuli zu reagieren. Hierbei stellen der Darm und prädominant die Tunica muscularis eine quantitativ bedeutende Quelle inflammatorischer Mediatoren durch eine frühzeitige Induktionskapazität in der Sepsis dar. Der Darm ist somit an der Initiierung und Aufrechterhaltung der systemischen Inflammation beteiligt. Hervorzuheben ist die bisher vernachlässigte, jedoch bedeutende Immunkompetenz der Tunica muscularis. In den hier durchgeführten Untersuchungen stellte sich Interleukin-6 als das bedeutendste „Indikator“-Zytokin der drei untersuchten Zytokine für eine lokale intestinale Aufregulation im Rahmen einer LPS-induzierten systemischen Inflammation dar.

Die frühzeitige mRNA-Induktion und Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren scheint in der initialen Phase durch das Netzwerk residenter Makrophagen oder anderer ortsständiger Zellen (z.B. Muskelzellen) verursacht, denn das chemotaktisch angelockte Entzündungsinfiltrat entsteht erst sekundär mehrere Stunden nach dem Peak der mRNA-Induktion der inflammatorischen Mediatoren. Das leukozytäre Infiltrat in der Tunica muscularis kann allerdings zur Aufrechterhaltung der Inflammation beitragen. Die zeitliche Verzögerung zwischen Auftreten der sepsis-induzierten systemischen Leukopenie und Maximum des leukozytären Infiltrates der Darmwand kann durch den Vorgang der Extravasation der Leukozyten mit Adhäsion, Rolling und transendothelialer Migration der Blutgefäße erklärt werden.

Die fehlenden Unterschiede zwischen den Serumproteinspiegeln der Zytokine Interleukin-1 β , Interleukin-6 und TNF- α zwischen systemischem und portalvenösem Blut sowie die relativ hohen mRNA-Spiegel in den mesenterialen Lymphknoten implizieren die Lymphwege als alternativen Verbreitungsweg für die lokal produzierten Zytokine.

6 Literatur

1. Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, Pyles T, Childress CP, Ash SK. The Process of Microbial Translocation. *Ann Surg* 1990; 212:496-512
2. Alverdy JC, Laughlin RS, Wu L. Influence of the critically ill state on host-pathogen interactions within the intestine: Gut-derived sepsis redefined. *Crit Care Med* 2003; 31:598-607
3. Baue AE. Multiple, progressive, or sequential system failure: a syndrome of the 1970's. *Arch Surg* 1975; 110:779-781
4. Bauer AJ, Schwarz NT, Moore BA, Türler A, Kalff JC. Ileus in critical illness: mechanisms and management. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8:152-157
5. Bone RC. Immunologic Dissonance: A Continuing Evolution in Our Understanding of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and the Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996; 125:680-687
6. Carrico CJ, Meakins JL, Marshall JC, Fry DE, Maier RV. Incidence and Problems of Multiple-Organ-Failure Syndromes. In: Multiple-Organ-Failure Syndrome, Panel Discussion - Surgical Infection Society 1985. *Arch Surg* 1986; 121:196-197
7. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420:885-891
8. Cullen JJ, Mercer D, Hinkhouse M, Ephgrave KS, Conklin JL. Effects of endotoxin on regulation of intestinal smooth muscle nitric oxide synthase and intestinal transit. *Surgery* 1999; 125:339-344
9. Cumming J, Purdue GF, Hunt JL, O'Keefe GE. Objective Estimates of the Incidence and Consequences of Multiple Organ Dysfunction and Sepsis after Burn Trauma. *J Trauma Inj Infect Crit Care* 2001; 50:510-515
10. Davies MG, Hagen P-O. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 1997; 84:920-935

11. Deitch EA. Multiple Organ Failure - Pathophysiology and Potential Future Therapy. *Ann Surg* 1992; 216:117-134
12. Deitch EA. Role of the gut lymphatic system in MOF. *Curr Opin Crit Care* 2001; 7:92-98
13. Deitch EA. Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: What is important in human beings? *Surgery* 2002; 131:241-244
14. Deitch EA, Xu D-Z, Franko L, Ayala A, Chaudry IH. Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock* 1994; 1:141-145
15. Eiseman B, Beart R, Norton L. Multiple organ failure. *Surg Gynecol Obstet* 1977; 144:323-326
16. Eskandari MK, Kalff JC, Billiar TR, Lee KKW, Bauer AJ. LPS-induced muscularis macrophage nitric oxide suppresses rat jejunal circular muscle activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 1999a; 277:G478-G486
17. Eskandari MK, Kalff JC, Lee KKW, Bauer AJ. Lipopolysaccharide activates jejunal muscularis macrophages and suppresses circular muscularis activity. *Transplant Proc* 1999b; 30:2670
18. Fink MP. Effect of Critical Illness on Microbial Translocation and Gastrointestinal Mucosa Permeability. *Semin Respir Infect* 1994; 9:256-260
19. Fleischhauer K, Drenckhahn D. Struktur des Bauchfells und funktionelle Anatomie der Bauchhöhle. In: Drenckhahn D, Zenker W, eds. *Benninghoff Anatomie Band 1 - Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen*. München - Wien - Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1994:849-852
20. Fry DE, Pearlstein L, Fulton RL, Polk HC. Multiple System Organ Failure: The Role of Uncontrolled Infection. *Arch Surg* 1980; 115:136-140

21. Goris RJA. MODS/SIRS: Result of an Overwhelming Inflammatory Response? *World J Surg* 1996; 20:418-421
22. Happel KI, Nelson S, Summer W. The Lung in Sepsis: Fueling the Fire. *Am J Med Sci* 2004; 328:230-237
23. James SP, Zeitz M, Kanof M, Kwan WC. Intestinal lymphocyte populations and mechanisms of cell-mediated immunity. *Immunol Allergy Clin North Am* 1988; 8:369-391
24. Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Lipopolysaccharide Induces Physical Proximity Between CD14 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Prior to Nuclear Translocation of NF- κ B. *J Immunol* 2000; 165:3541-3544
25. Kalff JC, Buchholz BM, Eskandari MK, Hierholzer C, Schraut WH, Simmons RL, Bauer AJ. Biphasic response to gut manipulation and temporal correlation of cellular infiltrates and muscle dysfunction in rat. *Surgery* 1999a; 126:498-509
26. Kalff JC, Carlos TM, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Surgically Induced Leukocytic Infiltrates Within the Rat Intestinal Muscularis Mediate Postoperative Ileus. *Gastroenterology* 1999b; 117:378-387
27. Kalff JC, Schraut WH, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Postoperative Intestinal Smooth Muscle Dysfunction in Rodents. *Gastroenterology* 2000; 118:316-327
28. Kalff JC, Schwarz NT, Walgenbach KJ, Schraut WH, Bauer AJ. Leukocytes of the intestinal muscularis: their phenotype and isolation. *J Leukoc Biol* 1998; 63:683-691
29. Kalff JC, Türler A, Schwarz NT, Schraut WH, Lee KKW, Tweardy DJ, Billiar TR, Simmons RL, Bauer AJ. Intra-Abdominal Activation of a Local Inflammatory Response Within the Human Muscularis Externa During Laparotomy. *Ann Surg* 2003; 237:301-315
30. Livingston DH, Deitch EA. Multiple Organ Failure: A Common Problem in Surgical Intensive Care Unit Patients. *Ann Med* 1995; 27:13-20

31. Magnotti LJ, Upperman JS, Xu D-Z, Lu Q, Deitch EA. Gut-Derived Mesenteric Lymph but not Portal Blood Increases Endothelial Cell Permeability and Promotes Lung Injury After Hemorrhagic Shock. *Ann Surg* 1998; 228:518-527
32. Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, Huser N, Holzmann B, Stier A, Pfeffer K, Heidecke K-D. Cecal Ligation and Puncture versus Colon Ascendens Stent Peritonitis: Two Distinct Animal Models for Polymicrobial Sepsis. *Shock* 2004; 21:505-511
33. Mainous MR, Ertel W, Chaudry IH, Deitch EA. The Gut: A Cytokine-Generating Organ In Systemic Inflammation? *Shock* 1995; 4:193-199
34. Marshall JC, Cristou NV, Meakins JL. The Gastrointestinal Tract: The "Undrained Abscess" of Multiple Organ Failure. *Ann Surg* 1993; 218:111-119
35. Meakins JL, Marshall JC. The gastrointestinal tract: the 'motor' of MOF. In: Multiple-Organ-Failure Syndrome, Panel Discussion - Surgical Infection Society 1985. *Arch Surg* 1986; 121:197-201
36. Moore FA, Moore EE, Poggetti R, McAnena OJ, Peterson VM, Abernathy CM, Parsons PE. Gut bacterial translocation via the portal vein: a clinical perspective with major torso trauma. *J Trauma* 1991; 31:629-638
37. Murray MJ, Coursin DB. Multiple Organ Dysfunction Syndrome. *Yale J Biol Med* 1993; 66:501-510
38. Nathan CF. Secretory Products of Macrophages. *J Clin Invest* 1987; 79:319-326
39. Nieuwenhuijzen GAP, Deitch EA, Goris RJA. Infection, the Gut and the Development of the Multiple Organ Dysfunction Syndrome. *Eur J Surg* 1996a; 162:259-273
40. Nieuwenhuijzen GAP, Deitch EA, Goris RJA. The relationship between gut-derived bacteria and the development of the multiple organ dysfunction syndrome. *J Anat* 1996b; 189:537-548

41. Nieuwenhuijzen GAP, Haskel Y, Lu Q, Berg RD, Rooijen Nv, Goris RJA, Deitch EA. Macrophage Elimination Increases Bacterial Translocation and Gut-Origin Septicemia but Attenuates Symptoms and Mortality Rate in a Model of Systemic Inflammation. *Ann Surg* 1993; 218:791-799
42. Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S. Endotoxin Tolerance in Mouse Peritoneal Macrophages Correlates with Down-Regulation of Surface Toll-Like Receptor 4 Expression. *J Immunol* 2000; 164:3476-3479
43. Otero-Antón E, González-Quintela A, López-Soto A, López-Ben S, Llovo J, Pérez LF. Cecal Ligation and Puncture as a Model of Sepsis in the Rat: Influence of the Puncture Size on Mortality, Bacteremia, Endotoxemia and Tumor Necrosis Factor Alpha Levels. *Eur Surg Res* 2001; 33:77-79
44. Pabst R. Integration der verschiedenen Organe in das Immunsystem. In: Drenckhahn D, Zenker W, eds. Benninghoff Anatomie Band 1 - Makroskopische Anatomie, Embryologie und Histologie des Menschen. München - Wien - Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1994:753-755
45. Peitzman AB, Udekwu AO, Ochoa J, Smith S. Bacterial Translocation in Trauma Patients. *J Trauma* 1991; 31:1083-1087
46. Polk HC, Shields CL. Remote organ failure: A valid sign of occult intra-abdominal infection. *Surgery* 1977; 81:310-313
47. Pugin J, Ricou B, Steinberg KP, Suter PM, Martin TR. Proinflammatory Activity in Bronchoalveolar Lavage Fluids from Patients with ARDS, a Predominant Role for Interleukin-1. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1850-1856
48. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The Natural History of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). *JAMA* 1995; 273:117-123

49. Reidy, John J., Ramsey G. Clinical trials of selective decontamination of the digestive tract: Review. *Crit Care Med* 1990; 18:1449-1456
50. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide versus cecal ligation and puncture. *Shock* 2000; 13:110-116
51. Salvo I, de Cian W, Musicco M, Langer M, Piadena R, Wolffler A, Montani C, Magni E. The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med* 1995; 21:S244-S249
52. Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Mühlradt PF, Takeda K, Akira S. Synergy and Cross-Tolerance Between Toll-Like Receptor (TLR) 2- and TLR 4-Mediated Signaling Pathways. *J Immunol* 2000; 165:7096-7101
53. Schaser K-D, Bail HJ, Schewior L, Stover JF, Melcher I, Haas NP, Mittlmeier T. Acute effects of N-acetylcysteine on skeletal muscle microcirculation following closed soft tissue trauma in rats. *J Ortho Res* 2004; 23:231-241
54. Schaser K-D, Vollmar B, Menger MD, Schewior L, Kroppenstedt SN, Raschke M, Lübke AS, Haas NP, Mittlmeier T. In Vivo Analysis of Microcirculation following Closed Soft-Tissue Injury. *J Bone Joint Surg Am* 2000; 82-A:69
55. Schwarz NT, Beer-Stolz D, Simmons RL, Bauer AJ. Pathogenesis of Paralytic Ileus: Intestinal Manipulation Opens a Transient Pathway Between the Intestinal Lumen and the Leukocytic Infiltrate of the Jejunal Muscularis. *Ann Surg* 2002; 235:31-40
56. Schwarz NT, Kalff JC, Türler A, Engel BM, Watkins SC, Billiar TR, Bauer AJ. Prostanoid Production Via COX-2 as a Causative Mechanism of Rodent Postoperative Ileus. *Gastroenterology* 2001; 121:1354-1371
57. Schwarz NT, Simmons RL, Bauer AJ. Minor intraabdominal injury followed by a low dose LPS administration act synergistically to induce ileus. *Neurogastroenterol Motil* 2000; 11:288

58. Sessler CN, Perry JC, Varney KL. Management of severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care* 2004; 10:354-363
59. Sheridan RL, Ryan CM, Yin LM, Hurley J, Tompkins RG. Death in the burn unit: sterile multiple organ failure. *Burns* 1998; 24:307-311
60. Singleton KD, Wischmeyer PE. Distance of Cecum Ligated Influences Mortality, Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-6 Expression following Cecal Ligation and Puncture in the Rat. *Eur Surg Res* 2003; 35:486-491
61. Swank GM, Deitch EA. Role of the Gut in Multiple Organ Failure: Bacterial Translocation and Permeability Changes. *World J Surg* 1996; 20:411-417
62. Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP. Sequential System Failure after Rupture of Abdominal Aortic Aneurysms: An Unsolved Problem in Postoperative Care. *Ann Surg* 1973; 178:117-122
63. Wells CL, Barton RG, Wavatne CS, Dunn DL, Cerra FB. Intestinal Bacterial Flora, Intestinal Pathology, and Lipopolysaccharide-Induced Translocation of Intestinal Bacteria. *Circ Shock* 1992; 37:117-123
64. Xu D-Z, Lu Q, Adams CA, Issekutz A, Deitch EA. Trauma-hemorrhagic shock-induced up-regulation of endothelial cell adhesion molecules is blunted by mesenteric lymph duct ligation. *Crit Care Med* 2004; 32:760-765
65. Zweigner J, Gramm H-J, Singer OC, Wegscheider K, Schumann RR. High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes. *Blood* 2001; 98:3800-3808

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. J.C. Kalff für die freundliche Überlassung und fachliche Betreuung des Themas sowie für seine entscheidende wissenschaftliche Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Die Zusammenarbeit war durch wertvolle Anregungen und seine große Hilfsbereitschaft geprägt.

Bei Herrn Prof. Dr. A. Hirner bedanke ich mich für die freundliche Unterstützung und die Möglichkeit, die Promotion neben meiner klinischen Arbeit an der Chirurgischen Klinik der Universität Bonn erfolgreich abschließen zu können.

Ferner danke ich Herrn A.J. Bauer, PhD, und Herrn PD Dr. med. N.T. Schwarz für die kompetente Einführung in die Grundlagen der Forschungsarbeit und die umfassende Betreuung zu Beginn meiner wissenschaftlichen Tätigkeit, welche ich dank Herrn Prof. Dr. med. J.C. Kalff teilweise an der University of Pittsburgh, Pennsylvania, USA, absolvieren durfte.

Mein Dank gilt ferner auch den Mitarbeitern der Sektion Forschung der Chirurgischen Klinik der Universität Bonn sowie Herrn Dr. René H. Tolba für die vielen wertvollen Ratschläge und Hilfestellungen zur praktischen Durchführung der Versuche und Analysen.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch meiner Familie, insbesondere meinem Vater, dessen Beistand und Unterstützung mir auch außerhalb des wissenschaftlichen Bereiches schon während meines Studiums immer gewiss war.