**Universitätsklinik Ulm**
**Zentrum für Chirurgie**
**Klinik für Allgemein-, Viszeral- und**
**Transplantationschirurgie**
**Ärztliche Direktorin: Prof. Dr. med. Henne-Bruns**

# Expression der mRNA der Toll-like Rezeptoren TLR2 und TLR4 bei Sepsis und großen abdominalchirurgischen Eingriffen, sowie deren Bezug zur Endotoxintranslokation, zur Akute-Phase Reaktion und die Veränderung der peripheren Leukozytenpopulationen

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**
**der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

**vorgelegt von Katja Utz**
**geboren in Geislingen an der Steige**
**2008**

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Klaus Buttenschön

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Marion Schneider

Tag der Promotion: 30. Mai 2008

Meinen Eltern gewidmet.

## Inhaltsverzeichnis

**Abkürzungsverzeichnis**

**1 Einleitung.....1**

1.1 Das angeborene Immunsystem.....1

1.2 Endotoxin.....2

1.3 Biologische Aktivität und Signaltransduktion des Endotoxins.....3

1.4 Toll-like Rezeptoren.....7

1.4.1 Endotoxintoleranz.....8

1.5 Akute-Phase Reaktion.....8

1.6 Leukozyten (Periphere Mononukleäre Zellen und Granulozyten).....13

1.7 Hypothesen.....14

1.8 Fragestellungen und Endziele der Arbeit.....15

**2 Patienten, Methoden und Material.....18**

2.1 Patienten.....18

2.1.1 Patienten mit abdominalchirurgischen Operationen.....18

2.1.2 Patienten mit Sepsis.....20

2.2 Gesunde Probanden (Kontrollgruppe).....22

2.3 Methodik.....22

2.3.1 Entnahme der Blutproben und Verarbeitung.....22

2.3.2 Aufbereitung der Blutproben.....23

2.3.3 Bestimmung der Endotoxinkonzentration mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test.....24

2.3.4 Endotoxininaktivierungskapazität.....25

2.3.5 Bestimmung der Plasmaspiegel von IL-1β, IL-6 und TNFα.....26

2.3.6 Bestimmung der Plasmaspiegel von CRP, Haptoglobin, Transferrin, Albumin und Orosomucoid (AAG).....26

2.3.7 Separierung mononukleärer Zellen aus Vollblut über einen Ficollgradienten.....27

2.3.8 MRNA-Expression der TLR2 und TLR4.....28

2.3.9 Differenzierung der peripheren Leukozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie (FACS)-Analyse.....36

2.3.10 Statistik.....44

2.3.11 Ethikkommission.....44

**3 Ergebnisse.....45**
3.1 Endotoxin und Endotoxininaktivierungskapazität.....45
3.1.1 Patienten mit Abdominaloperationen.....45
3.1.2 Patienten mit Sepsis.....46
3.2 Zytokine und Akute-Phase Proteine.....47
3.2.1 IL-1, IL-6 und TNF-Konzentrationen im Plasma.....47
3.2.2 C-reaktives Protein (CRP), Haptoglobin, Alpha-1-Acid-Glycoprotein (AAG), Albumin und Transferrin.....55
3.2.3 Relation zwischen den Zytokinen IL-6, IL-1, TNF und Endotoxinämie beziehungsweise Endotoxininaktivierungskapaztät.....60
3.2.4 Relation zwischen Endotoxinämie beziehungsweise IL-6-Konzentration einerseits und Konzentration der Proteine der Akute-Phase andererseits.....60
3.3 mRNA-Expression von TLR2 und TLR4.....61
3.4 Differenzierung der peripheren Leukozytensubpopulationen mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS)-Analyse und automatischer Zählkammer.....66
**4 Diskussion.....72**
4.1 Diskussion der Fragestellungen.....72
4.1.1 Endotoxintranslokation.....72
4.1.2 Zytokinliberation durch LPS im Vollblut.....74
4.1.3 Endotoxintranslokation und Akute-Phase Reaktion.....79
4.1.4 Toll-like Rezeptoren.....85
4.1.5 Änderung der prozentualen Zusammensetzung der peripheren Leukozytensubpopulationen, postoperativ bei Patienten mit abdominalchirurgischen Operationen und bei Patienten mit Sepsis.....93
**5 Zusammenfassung.....96**
**6 Literaturverzeichnis.....98**
**Danksagung.....115**

**Abkürzungen**

| | |
|---|---|
| AAG (Orosomucoid) | Alpha-1-Acid Glycoprotein, (Alpha-1-Saures-Glycoprotein) |
| ACCP | American College of Chest Physicians |
| ADC | Analog Digital Converter (Analog-/Digitalwandler) |
| ALI | Acute lung injury |
| ARDS | Adult respiratory distress syndrome |
| bp | base pair |
| BPI | Bactericidal permeability increasing protein |
| CCE | Cholecystektomie |
| CCL | Cholecystolithiasis |
| CD | Cluster of differentiation |
| CSF | Colony stimulating factor |
| CRP | C-reaktives Protein |
| d | Tag |
| dCTP | 2'-Desoxy-Cytidin-5'-Triphosphat |
| DNA (DNS) | Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| dNTP | Desoxynucleotid-triphosphate |
| ds | Doppelstrang |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| ELISA | Enzym linked immunsorbent assay |
| EU | Endotoxin Unit |
| FACS | Fluorescence Activated Cell Sorting (Fluoreszenzaktivierte Zellanalyse) |
| FITC | Fluoreszein |
| FSC | Forward Scatter |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase |
| h | Stunde |
| Hb | Hämoglobin |

| | |
|---|---|
| HLA-DR | humane Leukozyten Antigene |
| Hsp60 | Heat shock protein 60 |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| IRAK | IL-1 receptor-associated kinase |
| LAL | Limulus-Amöbozyten-Lysat |
| LAM | Lipoarabinomannan |
| LBP | Lipoprotein bindendes Protein |
| LPB | Lipoprotein B |
| lfd.Nr. | laufende Nummer |
| LP | Lipopeptide/Proteine |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LTS (LTA) | Lipoteichonsäure (Lipoteichoic acid) |
| m | männlich |
| MG | Molekulargewicht |
| min | Minute |
| MPCR | Multiplex polymerase chain reaction |
| mRNA | messenger Ribonucleic acid |
| NF-κB | Nuclear factor kappa B |
| MDTT | microsomal triglyceride transfer protein |
| MyD88 | Myeloid differentiation factor 88 |
| PAMM (PAMP) | Pathogenassozierte molekulare Muster (Pathogen associated molecular patterns) |
| PBGD | Porphobilinogen Dehydrogenase |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PE | R-Phycoerythrin |
| PerCP | Peridin-Chlorophyll-a-Protein |
| PMN | Periphere polymorphkernige neutrophile Granulozyten |
| PMZ (PBMC) | Periphere mononukleäre Zellen (Periphere blood mononuclear cells) |
| PGN | Peptidoglykan |
| pp | pylorus preserving |
| rhu TNF | recombinant human tumor necrosis factor |

| | |
|---|---|
| RNA (RNS) | Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure) |
| RT | reverse Transkriptase |
| S. aureus | Staphylococcus aureus |
| SIRS | systemic inflammatory response syndrome |
| sCD14 | soluble CD14 |
| SAA | Serum Amyloid A |
| SCCM | Society of Critical Care Medicine |
| SSC | Side Scatter |
| TEA | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TIR | Toll/IL-1-Rezeptor |
| TIRAP | TIR-domaine-containing adapter protein |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| TNF | Tumor-Nekrose Faktor |
| TRAF6 | TNF receptor associated factor 6 |
| vs | versus |
| w | weiblich |
| Z.n. | Zustand nach |

# 1 Einleitung

## 1.1 Das angeborene Immunsystem

Die Elemente der Immunabwehr werden in zwei Systeme unterteilt: In das „angeborene“ und das „erworbene Immunsystem“. Das angeborene Immunsystem ist viel älter als die erworbene Immunabwehr und hat sich als erste Verteidigung gegen eindringende Mikroorganismen entwickelt [Knapp et al. 2002], [Lien u. Ingalls 2002]. Die Möglichkeit, in den Körper eindringende Mikroorganismen aufzuspüren und angemessen darauf zu reagieren und dadurch Infektionen unter Kontrolle zu halten, ist für das Überleben von größter Bedeutung. Im Falle einer Sepsis kann jedoch eine verstärkte Immunreaktion zu einer überwältigenden Entzündungsreaktionen und damit zu einer erhöhten Morbidität und Mortalität führen [Lien u. Ingalls 2002]. Mikrobielle Erreger und deren Produkte führen bei polymikrobieller Sepsis zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch Signalrezeptoren der Toll-like-Rezeptoren (TLR). Dies führt zu einer überschießenden Produktion von Entzündungsmediatoren, wodurch entzündliche Organschäden ausgelöst werden können [Holzmann et al. 2003]. Janeway und Medzhitov haben eine Reihe von Definitionen vorgeschlagen, um eine Beschreibung für die Bestandteile des angeborenen Immunsystems zu formulieren. Prinzipiell gibt es zwei Muster von Rezeptoren: Jene, die Phagozytose vermitteln und jene, die zur Aktivierung proinflammatorischer Signalwege führen [Aderem et al. 2000]. Zellen, die die angeborene Immunabwehr vermitteln, exprimieren eine Reihe von Rezeptoren, die pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMM) (pathogen associated molecular patterns, PAMP) erkennen und später in eine Kaskade von Immunantworten münden, die eine Entzündungsreaktion auslösen [Knapp et al. 2002]. Die TLRs sind ein wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems, die bestimmte strukturelle Muster auf Mikroorganismen erkennen [Beutler 2003 a] [Murphy et al. 2000]. Die zentrale Bedeutung der TLRs liegt in ihrer Eigenschaft begründet, die Erkennung mikrobieller Strukturen in zelluläre Signale zu übersetzen, die ihrerseits akute Abwehrleistungen einleiten und die nachfolgende Aktivierung von humoraler und zellulärer Immunität steuern, über die Produktion von verschiedenen proinflammatorischen Substanzen [Holzmann et al. 2003], [Knapp et al. 2002], [Triantafilou u. Triantafilou 2002].

Diese TLRs und ihre Wege der Signaltransduktion sind in vielen Lebewesen, wie zum Beispiel Säugetieren, Fruchtfliegen und Pflanzen vertreten. Zehn Mitglieder der TLR- Familie wurden beim Menschen identifiziert und viele von ihnen scheinen verschiedene mikrobiologische Produkte, darunter Lipopolysaccharide, bakterielle Lipoproteine, Peptidoglykane und bakterielle DNA zu erkennen [Holzmann et al. 2003], [Lien u. Ingalls 2002]. Eine Schlüsselrolle in der Aktivierung des angeborenen Immunsystems spielt Endotoxin.

### 1.2 Endotoxin

Endotoxine sind Hauptbestandteile der äußeren Zellwand Gram-negativer Bakterien [Beutler 2003 b]. Endotoxine werden von lebenden Bakterien spontan abgegeben und nach Zelltod und Lyse der Bakterien in großen Mengen freigesetzt. Strukturelle und chemische Analysen zeigten, dass es sich dabei um Lipopolysaccharide handelte [Beutler 2003 b], [Rietschel 1987], [Rietschel et al. 1996] [Rietschel et al. 1982], [Rietschel et al. 1991], [Westphal et al. 1954]. Endotoxine bestehen aus drei Hauptkomponenten, dem inneren Lipid A, dem intermediären R-Core Oligosaccharid (= core region) und dem äußeren O-Polysaccharid (= O-specific chain, Oberflächenantigen) [Beutler et al. Feb. 2003] (Abb. 1-1). Der essentielle Bestandteil, der die Interaktion mit dem angeborenen Immunsystem steuert, ist Lipid A [Beutler 2003 b], [Rietschel 1987] (Abb. 1-1).

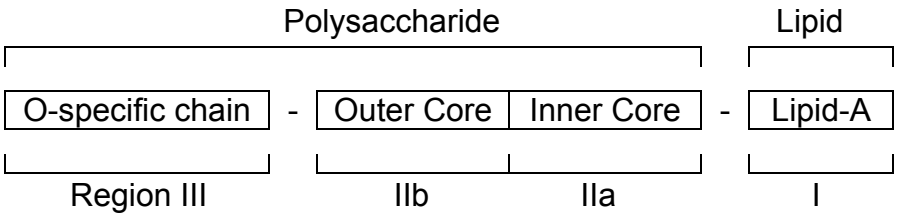



**Abbildung 1-1**
Schematischer Aufbau eines Lipopolysaccharidmoleküls mit den drei Komponenten Lipid A, intermediäre Polysaccharidkette (core region) und äußere Polysaccharidkette (O-specific chain) [Rietschel et al. 1993].

Die Erkennung von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS) über das angeborene Immunsystem kann eine unkontrollierte Ausschüttung von Zytokinen und etwas verzögert von Akute-Phase Proteinen zur Folge haben. Daraus können wiederum starke Entzündungsreaktionen resultieren, die die Funktion aller Organsysteme beeinträchtigen können. Die wohl bekanntesten Wirkungen sind Fieber, Entzündung, Leukopenie oder Leukozytose (konzentrationsabhängig), Blutdruckabfall, Herz-Kreislaufversagen, Diarrhoe, Aktivierung des Gerinnungs-, Komplement- und Immunsystems bis hin zum septischen Schock und Organversagen [Triantafilou u. Triantafilou 2002], [Beutler 2003 a], [Beger 1987], [Beger et al. 1982], [Beger et al. 1981], [Berger et al. 1995], [Berger et al. 1991], [Berger et al. 1992], [Berger et al. 1997], [Deitch 1990 b], [Deitch et al. 1992], [Deitch et al. 1990], [Glauser et al. 1991].

## 1.3 Biologische Aktivität und Signaltransduktion des Endotoxins

Endotoxin ist eine Substanz die bereits in extrem niedrigen Konzentrationen wirksam ist (unter 1 nM). Deshalb geht man davon aus, dass LPS mit hochaffinen Rezeptoren interagiert und so eine transmembranäre Signaltransduktion ausgelöst wird.
Im Blut binden Endotoxine an Proteine und bilden Komplexe. Dabei handelt es sich u.a. um die Akute-Phase Proteine Lipopolysaccharid-bindendes Protein (LPB), das bactericidal-permeability-increasing protein (BPI), das lösliche CD14

(sCD14, soluble CD14), Transferrin und $\alpha_2$-Makroglobulin [Berger et al. 1987], [Berger et al. 1988], [Berger et al. 1990], [Fenton et al. 1998], [Grunwald et al. 1993], [Schumann 1995], [Tobias 1997]. CD14 erkennt Zellwandbestandteile Gram-positiver Bakterien (Peptidoglykane, Lipoteichonsäure (LTS)) und Gram-negativer Bakterien (Lipopolysaccharide (LPS)), sowie Mykobakterien und endogene Phospholipide [Axtelle et al. 2001], [Hubacek et al. 2000], [ Landmann et al. 2000]. Die LPS getriggerte Reaktion der Säugetierzellen, läuft über eine Interaktion von LPS mit Lipopolysaccharid-bindendem-Protein (LPB) im Serum und anschließend mit CD14. CD14 funktioniert nur als Ligand-bindendes Protein (LPS oder LPS-LPB-Komplexe), das keine Signaltransduktion auslöst, weil es ein mit Glycophosphatidylinositol verankertes Protein ist und nur in der äußeren Zellwand sitzt. Mehrere Beweise führen zu der Annahme, das LPS mit einem oder mehreren transmembranären Rezeptor(en) interagiert, der/bzw. die für die Signaltransduktion verantwortlich ist/sind [Triantafilou u. Triantafilou 2002].
Acht Jahre nachdem die Bedeutung von CD14 und LPB entdeckt wurde, kam es zur Identifizierung des transmembranären Proteins, das zusammen mit CD14 eine Signaltransduktion auslöst, die zu einer durch LPS induzierten Zellaktivierung führt [Beutler 2003 b]. Der Impuls für diesen Fortschritt ging von zwei Entdeckungen aus: Die Rolle der Toll-like-Rezeptoren (TLRs) im angeborenen Immunsystem von Drosophila und die Identifikation von TLR, als das Gen welches für die LPS-Antwort bei natürlichen Maus-Mutanten verantwortlich ist [Beutler 2003 b]. Toll-Rezeptorproteine sind an der dorsoventralen Entwicklung in der Embryogenese von Drosophila beteiligt [Aderem et al. 2000], [Beutler 2003 b], [Schuster et al. 2000]. Die Bindung von LPS oder anderen Zellwandbestandteilen an CD14 bewirkt eine Signaltransduktion über die TLRs, resultierend in einer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und in der Auslösung einer systemischen Entzündungsreaktion. [Axelle et al. 2001], [Knapp et al. 2002], [Lein u. Ingalls 2002]. TLR4 ist die entscheidende transmembranäre Komponente der LPS-Signaltransduktion [Beutler et al. 2000]. Toll-like Rezeptoren sind aus einer extrazellulären Domäne, die aus Leuzin-reichen Repeats besteht, sowie einer zytoplasmatischen Domäne, die wegen ihrer Homologie zum IL-1-Rezeptor als TIR-(Toll/IL-1-Rezeptor-)Domäne bezeichnet wird, aufgebaut [Holzmann et al. 2003 ], [Naik et al. 2001], [Muzio et al. 2001], [Schuster et al.2000]. Die Diversität der Spezies liegt in den extrazellulären Domänen der membrangebundenen Rezeptoren. Durch verschiedene Mitglieder der Toll-Familie wird eine stereotype

Signal-Antwort ausgelöst [Muzio et al. 2001]. Das heißt, die Mechanismen, durch die ein Signal ausgelöst wird sind verschieden, während die zytoplasmatische Domäne für die Signaltransduktion gleich bleibt [Ozinsky et al. 2000].

### 1.3.1 Signaltransduktion

Durch eine extrazelluläre Komplexbildung zwischen Ligand und Rezeptor (z.B. LPS mit TLR oder IL-1 mit IL-1 R1) wird ein transmembranäres Signal ausgelöst. und über den intrazellulären TIR-Abschnitt das Adapter-Molekül MyD88 rekrutiert [Burns et al. 2003], [Holzmann et al. 2003], [Wesche et al. 1997].
MyD88 besteht aus einer N-terminalen Death-Domäne und einer C-terminalen TIR-Domäne. Mit Letzterer bindet es an die TIR-Domäne von Toll-like-Rezeptoren. Als nächster Schritt werden über die Death-Domäne Kinasen der IRAK-Familie an den Signalkomplex rekrutiert. IRAK-4 scheint dabei von zentraler Bedeutung zu sein [Holzmann et al. 2003]. Die Signaltransduktrionskette mündet dann über TRAF6 in den MAP-Kinasen-Signalweg und in der Aktivierung von NF-κB-Transkriptionsfaktoren [O'Neill et al. 2003] (Abb. 1-2).

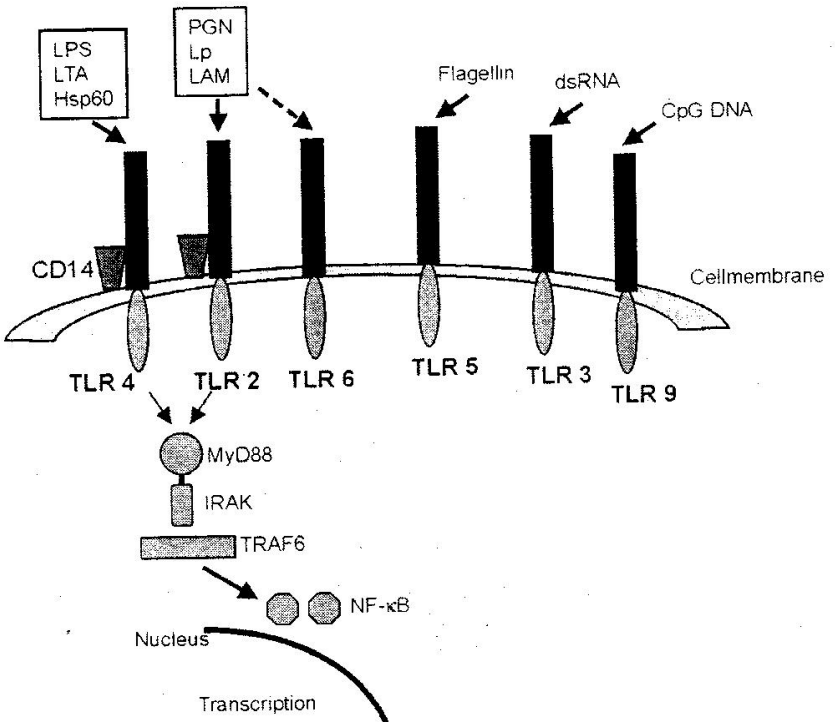



**Abbildung 1-2** Transkriptionsaktivierung durch Toll-like Rezeptoren (TLR) führen über das Adapterprotein Myeloid differentiation factor 88 (MyD88), IL-1 receptor-associated kinase (IRAK) und TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) zu einer Aktivierung von Nuclear factor kappa B (NF-κB). LPS, Lipopolysaccharid; LTA, Lipoteichoic acid; Hsp60, Heat shock protein 60; PGN, Peptidoglykan; LP, Lipopeptide/Proteine; LAM, Lipoarabinomannan; dsRNA, Doppelstrang-Ribonukleinsäure [Knapp et al.2002].

Diese Signalwege sind mehr als 100 Millionen Jahre alt, und ihre Entwicklung reicht bis vor die Trennung der Tier- und Pflanzenwelt [Belvin et al. 1996], [O'Neil et al. 1998]. Es gibt auch Signalwege, die für einzelne TLRs spezifisch sind. So bindet das Adapterprotein TIRAP spezifisch an TLR4 [Holzmann et al. 2003 (Abb.1)].

## 1.4 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren sind die Säugetier-Homolge der Toll-Rezeptoren von Drosophila [Supajatura et al. 2001]. Janeway und Kollegen fanden auf der Suche nach dToll-verwandten Proteinen das erste menschliche Homolog zu Drosophila-Toll, später TLR4 genannt [Supajatura et al. 2002]. TLR4, der entscheidende Sensor für Endotoxin in heutigen Säugetieren, tauchte bereits vor 180 Millionen Jahren auf [Du et al. 2000], [Zhang et al. 2000]. Bei den TLRs handelt es sich um phylogenetisch alte Rezeptoren, die pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMM) erkennen [Akira et al. 2000]. Als Antwort auf die Erkennung mikrobieller Komponenten induzieren TLRs die Expression zahlreicher Gene, die u.a. für inflammatorische Zytokine (wie z.B. IL-1, IL-6, IL-8) Chemokine und antimikrobielle Peptide kodieren und deren Funktion in einer schnellen Immunabwehr liegt [Supajatura et al. 2002]. TLRs spielen darüber hinaus eine zentrale Rolle bei der Aktivierung und Reifung dentritischer Zellen (Aktivierung des kostimulierenden Moleküls B7.1, das zur Differenzierung naiver T-Zellen notwendig ist) [Qureshi et al. 1999].

Die Familie der Toll-like-Rezeptoren umfasst 10 Mitglieder, wobei bis auf TLR7, TLR8 und TLR10 für jeden Rezeptor eine Rolle in der Erkennung mikrobieller Strukturen nachgewiesen werden konnte [Beutler et al. 2000], [Imler et al. 2000], [Lien u. Ingalls], [Read et al. 2001].

TLR4, das mit seinem Korezeptor MD-2 exprimiert wird, wurde als Rezeptor für LPS Gram-negativer Bakterien identifiziert [Read et al. 2001]. An der Erkennung von LPS durch TLR4/MD-2 ist auch CD14 beteiligt. TLR2 wird als Heterodimer mit TLR1 oder TLR6 auf der Zelloberfläche exprimiert [Zhang et al. 2000].

Diese Rezeptoren sind an der Erkennung eines breiten Spektrums mikrobieller Komponenten wie Peptidoglycan, bakteriellen und mykoplasmalen Lipoproteinen, Lipoteichonsäuren und Oberflächenproteinen von Hefen beteiligt [Akira et al. 2000], [Beutler et al. 2001], [Ingalls et al. 2000], [Lien u. Ingalls 2002], [Read et al. 2001], [Supajatura et al. 2002], [Triantafilou u. Triantafilou 2002]. TLR5 erkennt bakterielles Flagellin, TLR3 und TLR9 werden durch virale RNS oder bakterielle DNS-Strukturen aktiviert. Des Weiteren können auch Hitzeschockproteine und Fragmente der Hyaluronsäure, die bei Zell- oder Gewebezerstörung freigesetzt werden, Immunzellen über TLR4 und TLR2 stimulieren. TLRs sind somit in der Lage auch endogene Gefahrensignale zu detektieren und dadurch eine

Aktivierung des Immunsystems auszulösen [Holzmann et al. 2003]. Die breite Spezifität der TLRs ist wahrscheinlich die Konsequenz einer Interaktion zwischen den verschiedenen TLRs [Ozinsky et al. 2000], [Read et al. 2001].
Unterschiedliche PAMM (pathogen-assoziierte molekulare Muster) werden von verschiedenen Kombinationen von TLRs erkannt, was bedeutet, dass ein riesiges kombinatorisches Repertoire existiert, die große natürliche Viefalt an unterschiedlichen pathogenen Mustern zu unterscheiden [Holzmann et al. 2003].

### 1.4.1 Endotoxintoleranz

Als Endotoxintoleranz wird der Zustand von Makrophagen bezeichnet, nach einer Erststimulation durch LPS nicht mehr auf eine Zweitstimulation durch LPS antworten zu können. Die Toleranzinduktion beschränkt sich dabei nicht auf die TLR4-vermittelte LPS-Antwort. So vermindert die LPS-Toleranz auch die Reaktion auf andere TLRs, während Agonisten für TLR2 oder TLR5 ebenfalls ein Toleranzphänomen auslösen können [Holzmann et al. 2003]. Die Induktion der Toleranz ist folglich für mehrere TLRs möglich, sodass der Mechanismus vermutlich an der gemeinsamen Signaltransduktionskette angreift [Beutler 2003 b], [Holzmann et al. 2003]. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die Aktivität der IRAK-Kinase [Li et al. 2000].

## 1.5 Akute-Phase Reaktion

Endotoxine sind potente Trigger der Akute-Phase Reaktion und führen sowohl lokal als auch systemisch zur Produktion von pro- und auch antiinflammatorischen Zytokinen und Proteinen (z.B. TNF, IL-1, IL-6, TGF-β, Interferon, LBP, BPI, CRP, Haptoglobin, SAA) [Dinarello 2000], [Gabay et al. 1999].
Zytokine sind interzellulär signalgebende Polypeptide, die durch aktivierte Zellen produziert werden. Sie haben viele, zum Teil redundante Funktionen.
Entsprechend ist die Reaktion eines Organismus auf einen bestimmten Reiz, trotz immer erkennbarer stereotyper Reaktionen, individuell. Die klinische Relevanz der Endotoxinämie auf den Verlauf der Akute-Phase Reaktion ist noch mangelhaft beschrieben.

Akute-Phase Proteine sind in der Lage Endotoxin zu binden. Eine solche Funktion wurde für $\alpha_1$-saures Glycoprotein, $\alpha_1$-Antitrypsin, Transferrin, LBP (LPS bindendes Protein) und $\alpha_2$-Makroglobulin beschrieben [Berger et al. 1987], [Berger et al. 1988 a], [Berger et al. 1988 b], [Berger et al. 1990], [Fenton et al. 1998], [Fukui et al. 1994], [Grunwald et al. 1993], [Schumann 1995], [Schumann 1997], [Schumann et al. 1990], [Tobias et al. 1997]. Die Akute-Phase Reaktion kann Konzentrationsänderungen vieler Plasmaproteine, bekannt als Akute-Phase Proteine verursachen, sowie Änderungen physiologischer, biochemischer und metabolischer Regelvorgänge bewirken [Gabay et al. 1999]. Ein Akute-Phase Protein ist definiert als ein Protein, dessen Plasmakonzentration während einer Entzündung um mindestens 25 % ansteigt (positives Akute-Phase Protein: z.B. CRP, SAA, Komplement, Fibrinogen, Haptoglobin, LBP) oder abfällt (negatives Akute-Phase Protein: z.B. Albumin, Transferrin, Faktor XII) [Gabay et al. 1999], [Morley et al. 1984]. Die Konzentrationsänderung beruht hauptsächlich auf der Änderung der Syntheseleistung in der Leber (Hauptstimulator ist IL-6). Das Ausmaß des Anstiegs schwankt zwischen 50 % (Caeruloplasmin) und 1000% (CRP und SAA). In der Regel führen Infektionen, Trauma, Operationen, Verbrennungen, Gewebeuntergang, verschiedene Immunerkrankungen und fortgeschrittene Krebsstadien zu substantiellen Veränderungen der Akute-Phase Parameter. Mäßige Veränderungen verursachen z.B. schwere körperliche Belastung, Hitzschlag, und Geburt, während psychischer Stress sowie verschiedene psychiatrische Erkrankungen nur geringe Veränderungen bewirken [Gabay et al. 1999]. Obwohl meistens die Konzentrationen mehrerer Akute-Phase Parameter erhöht sind, steigen nicht immer alle gleichförmig an. So kann Fieber ohne CRP-Erhöhung vorkommen oder eine Diskordanz zwischen verschiedenen Akute-Phase Proteinen bestehen [Gabay et al. 1999]. Ursache dieser individuellen Regelungen sind Unterschiede der Zytokinproduktionsmuster oder deren Modulation durch unterschiedliche pathophysiologische Bedingungen [Gabay et al. 1999], [Novotny et al. 2005].

**Tabelle 1-1** Bedeutung der Zytokine und Akute-Phase Proteine, die in der Arbeit untersucht wurden.

| **Akute-Phase Proteine** | **Definition** | **Wirkung** |
|---|---|---|
| CRP<br>C-reaktives Protein<br>(Capsel-reaktives Protein) | Wird als klassischer Vertreter der Akute-Phase Reaktion in der Leber synthetisiert. | C-reaktives Protein wird bei bakteriellen Infektionen vor allem durch Interleukin-6 (IL-6) stimuliert. Es ist ein Opsonin, welches das Komplementsystem aktivieren kann. |
| AAG (Alpha-1-Acid Glycoprotein) | Synthese in der Leber. Positives Akute-Phase Protein. | Die Alpha-1-Acid Glycoprotein (AAG)-Produktion wird vor allem durch Glukokortikoide, Interleukin-6, Interleukin-1β und Tumornekrose-faktor-α (IL-6, IL-1β und TNFα) angeregt. Es wirkt immunmodulatorisch. Es fördert das Fibroblastenwachstum und interagiert mit Kollagen. |
| Haptoglobin | In der Leber gebildetes den $\alpha_2$-Globulinen zugehöriges Glykoprotein des Blutplasmas (ferner in Speichel, Liquor, Galle, Synovialflüssigkeit und Harn) | Antioxidans mit antiinflammatorischer Wirkung. Schützt damit vor reaktiven Sauerstoffradikalen und unterstützt die Wundheilung durch Stimulation der Angiogenese. Bildet mit freiem Hämoglobin (Hb) stabile Hämoglobin (Hb)-Haptoglobin (Hp)-Kolmplexe. Normwert im Serum: 0,65-1,8 g/l. Erhöhte Werte bei Entzündung und bösartigen Tumoren.<br>Erniedrigte Werte bei Leber-parenchymschaden und Hämolyse. |
| Transferrin | In der Leber gebildetes Glykoprotein (Molekular-gewicht (MG) um 90000). Elektrophoretisch in der Fraktion der Betaglobuline lokalisiert. | Transporteiweiß für Eisen.<br>Verminderung: u.a. bei infektiösen und neoplastischen Erkrankungen.<br>Erhöhung u.a. bei Eisenmangel und in der Schwangerschaft.<br>Normwert im Serum: 2-4 g/l. |

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 1-1

| | | |
|---|---|---|
| Albumine | In der Leber synthetisierte, gut wasserlösliche globuläre Proteine (Molekulargewicht (MG) ca. 66000) mit einem hohen Gehalt an schwefelhaltigen Aminosäuren, machen als Serumalbumin ca. 52-62% des Gesamteiweißes im Blutplasma aus. | Vor allem Regelung des intravasalen onkotischen Drucks. Transportprotein für wasserunlösliche Stoffe (z.B. Bilirubin, freie Fettsäuren). |
| **Interleukine/ Zytokine** | Zu den Zytokinen gehörende Substanzen, die als Signalstoffe des Immunsystems (Schema) wirken. | Als Mediatorsubstanzen verantwortlich für Induktion und Verlauf der T-Zell-vermittelten zytotoxischen Immunreaktion, sowie der B-Zell-Aktivierung (Antikörperproduktion). |
| IL-1 (Interleukin-1) | (lymphocyte-activating factor)<br>Wird von Makrophagen gebildet. Eine der vielseitigsten Mediatorsubstanzen des Immunsystems. Peptid mit einem Molekulargewicht (MG) von 17000. Kommt in zwei Formen mit identischen Funktionen vor: Interleukin-1α (IL-1α) und Interleukin-1β (IL-1β). | Wirkt über einen Rezeptor auf Zielzellen ein, bewirkt eine Proliferation oder Stimulation zur Proteinsynthese. |
| IL-6 (Interleukin-6) | Wird von aktivierten T-Zellen, Makrophagen, Fibroblasten und Endothel-zellen gebildet.<br>Glykoprotein mit einem Molekulargewicht (MG) von 21000. | Wesentliche Funktion als „colony stimulating factor“ (CSF). Wachstumsfaktor für Plasmazellen, Keratinozyten und Mesangiumzellen. Induziert die Synthese von Akute-Phase Proteinen. |

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 1-1

| | | |
|---|---|---|
| TNF (Tumornekrosefaktor) | Zu den Zytokinen gehörender, von Zellen des Makrophagen-/Monozyten-Systems Tumornekrosefaktor-α (TNFα) bzw. aktivierten T-Zellen (Tumornekrosefaktor (TNFβ) = Lymphotoxin) gebildeter oder gentechnisch hergestellter recombinant human tumor necrosis factor (rhu TNF). | Tumornekrosefaktor-α (TNFα): Zentraler Mediator der systemischen Entzündungs- und Immunreaktion mit Wirkung auf eine Vielzahl von Targetzellen (Granulozyten, Endothelzellen, Hepatozyten, Hypothalamus, Fett- u. Muskelzellen, Monozyten/Makrophagen). Geringe Konzentrationen dienen der physiologischen Abwehr von Infektionen. Zytolytische bzw. zytostatische Wirkung auf Tumorzellen. Tumornekrosefaktor-β (TNFβ) wirkt überwiegend als lokaler Entzündungsmediator (Leukozytenadhäsion und Migration, funktionelle Aktivierung neutrophiler Granulozyten). Wirkt zytotoxisch auf einige Tumorzellinien. |

## 1.6 Leukozyten (Periphere Mononukleäre Zellen und Granulozyten)

Leukozyten, die sogenannten weißen Blutkörperchen werden in drei Hauptgruppen unterteilt: Die Granulozyten und die mononukleären Leukozyten (bestehend aus Monozyten und Lymphozyten). Diese drei Gruppen können wiederum in weitere Untergruppen unterteilt werden [Nussler et al. 1999]. Lymphozyten greifen in die Immunantwort ein, indem sie als natürliche Killerzellen Zytokine sezernieren und als spezielle Killerzellen infizierte Zellen töten und als B-Lymphozyten Antikörper bilden. Monozyten/Makrophagen synthetisieren ebenfalls zahlreiche Zytokine und eliminieren Pathogene [Nussler et al. 1999]. Die Population der Granulozyten setzt sich aus den neutrophilen (polymorphkernigen, polymorphmononuclear (PMN)), den basophilen und den eosinophilen Granulozyten zusammen. Den Hauptteil bilden die neutrophilen Granulozyten [Nussler et al. 1999]. Die Monozyten können in zwei Subpoplulationen (1 und 2) unterteilt werden, wobei die erste Population die kleinere ist, die gerade aus dem Knochenmark kommt. Die zweite Monozytensubpopulation stellt die größere und reifere dar, mit mehr Fähigkeit zur Phagozytose. Sie steht kurz davor ins Gewebe abzuwandern [Wang et al. 1992].
Die Leukozyten zirkulieren im peripheren Blut und kommen auch im Gewebe vor (Makrophagen). Diese Migration ins Gewebe kann durch eine lokale Entzündung aber auch generalisiert bei einer Sepsis gefördert werden [Toft et al. 1994].
Die Leukozyten haben eine unterschiedlich lange Lebensdauer. Deren Zelltod wird durch die Apoptose bestimmt. Sepsis oder Trauma haben einen Einfluß auf die Lebensdauer der Leukozyten [Harter et al. 2002], [Toft et al. 1994], [Toft et al. 2002], [Weber et al. 2004]. Einen Einfluß auf die Apoptose haben unterschiedliche Faktoren, wie Medikamente, Sauerstoff, LPS und Nährstoffe [Weber et al. 2004]. Es wird eine reduzierte Apoptose neutrophiler Granulozyten während der Sepsis diskutiert, mit einer Zunahme des prozentualen Anteils im peripheren Blut und einer daraus resultierendenen überschießendenen zerstörerischen Funktion dieser Zellen während der Entzündungsreaktion [Harter et al. 2002]. Das Immunsystem reagiert auf das vorhanden sein eines septischen Fokus laut Maier et al. mit einer biphasischen Antwort: In der ersten Phase (SIRS), (systemic inflammatory response syndrome) kommt es demnach innerhalb von Stunden zu einer massiven Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, wie TNFα, IL-1β und Interferon-$\gamma$ (INF$\gamma$). Die zweite Phase der Immunantwort ist gekennzeichnet durch

eine kompensatorische Gegenregulation mit relativem Überwiegen antiinflammatorischer Zytokine, wie Interleukin-10 (IL-10), Reduktion monozytärer HLA-DR-Expression und Apoptose peripherer Immunzellen (Immunparalyse) [Maier et al. 2005].

## 1.7 Hypothesen

1. Das Ausmaß der Endotoxinämie hängt von der Art und der Dauer der Erkrankung ab.

2. Nach Endotoxintranslokation und durch zusätzliche LPS-Stimulation kommt es zu einer Änderung der Zytokinfreisetzung.

3. Die Endotoxinämie korreliert mit der Fähigkeit des Plasmas Endotoxin zu inaktivieren und den Konzentrationen der Proteine der Akute-Phase.

4. Große abdominalchirurgische Operationen beeinflussen die Expression der mRNA von TLR2 und TLR4.

5. Die Expression der mRNA von TLR2 und TLR4 bei Patienten, die an einer Sepsis leiden, unterscheidet sich von der Expression gesunder Probanden.

6. Es kommt zu einer Veränderung der prozentualen Zusammensetzung der peripheren Leukozytenpopulationen bei Patienten mit großen abdominalchirurgischen Eingriffen und bei Patienten mit Sepsis.

## 1.8 Fragestellungen und Einzelziele der Arbeit

Zur Überprüfung der Hypothesen wurden folgende Fragen formuliert:

1. Zu Hypothese 1:

Wie häufig ist die Endotoxintranslokation bei schweren Erkrankungen, wie z.B. Sepsis und bei großen abdominalchirurgischen Operationen?

*In vitro* und tierexperimentell konnten viele biologische Wirkungen des Endotoxins charakterisiert werden. Beim Menschen ist aber die Endotoxintranslokation noch nicht generell akzeptiert und die Inzidenz sowie der Verlauf der Endotoxinämie noch nicht vollständig geklärt. Ziel der Arbeit war es, die Kinetik der Endotoxinämie perioperativ bei Patienten mit großen abdominalchirurgischen Eingriffen und bei Patienten mit Sepsis zu quantifizieren.

2. Zu Hypothese 2:

Ändert sich durch die Endotoxintranslokation die Fähigkeit der immunkompetenten Zellen, Zytokine nach Stimulation mit LPS freizusetzen?

Endotoxine können über eine Kaskade biochemischer Reaktionen zu Veränderungen führen, die mit der Pathogenese des ARDS/ALI in Verbindung gebracht werden (Vasodilatation, erhöhte Gfäßpermeabilität, hämodynamische Störungen, Thrombozytenaggregation und Granulozytenaktivierung) [Glauser et al. 1991].
Zu diesen biochemischen Reaktionen gehört eine ausgeprägte Freisetzung von Zytokinen aus den mononukleären Zellen. LPS ist zwar ein starker Induktor des Immunsystems, aber in Tierversuchen ließ die Wirkung nach wiederholter Gabe nach, d.h. es bildete sich eine Resistenz aus (Endotoxintoleranz). Dadurch war die Fähigkeit der immunkompetenten Zellen, Zytokine freizusetzen,vermindert.
Ziel war es, bei Patienten mit Sepsis die Zytokinfreisetzungskapazität von IL-1,

IL-6 und TNF nach Stimulation mit LPS im Vollblut zu analysieren. Zum Vergleich wurde die Mediatorfreisetzungsfähigkeit perioperativ bei großen abdominalchirurgischen Operationen untersucht.

3. Zu Hypothese 3:

Gibt es eine Korrelation zwischen der Endotoxinkonzentration im Plasma einerseits und der Endotoxininaktivierung sowie den Proteinen der Akute-Phase Reaktion andererseits?

Endotoxin ist ein starker Trigger der Akute-Phase Reaktion. Es könnte demnach eine Korrelation zwischen diesen Parametern vorliegen. Ziel war es, die Beziehung zwischen der Endotoxinämie einerseits und den Proteinen CRP, AAG, Haptoglobin, Transferrin und Albumin zu analysieren. Dies wurde perioperativ bei Patienten mit abdominellen Operationen untersucht, da hier der Zeitpunkt des chirurgischen Traumas (Operationsbeginn) bekannt ist. Die Beziehung zwischen der Endotoxinämie und der Endotoxininaktivierung des Plasmas wurde perioperativ bei elektiven Abdominaloperationen untersucht.

4. Zu Hypothese 4+5:

Ändert sich die Expression der mRNA von TLR2 und TLR4 durch operative Eingriffe oder septische Erkrankungen?

Die durch Lipopolysaccharide ausgelöste Signaltransduktion wird durch ein komplexes Sytem kaskadenartig miteinander reagierender Moleküle vermittelt. Toll-like receptors (TLR) sind die ersten bekannten Strukturen, die das Signal von extra- nach intrazellulär weiterleiten und stehen am Anfang dieser Kaskade. Viele physiologische Regelprozesse zeigen Rückkopplungen (z. B. die Endotoxintoleranz), und es erscheint nahe liegend, dass die Expression dieser Proteine durch die Endotoxinämie reguliert werden könnte. Ziel war es, die Änderung der Expression der mRNA von TLR2 und TLR4 nach elektiven operativen Eingriffen und bei der Sepsis zu ermitteln.

5. Zu Hypothese 6:

Kommt es zu einer Änderung der prozentualen Zusammensetzung der peripheren Leukozytenpopulationen bei Patienten mit großen abdominalchirurgischen Operationen und bei Patienten mit Sepsis?

Da die TLRs von peripheren mononukleären Zellen exprimiert werden und es nach Stimulation dieser Zellen via TLR-Agonisten zu einer Ausschüttung von Zytokinen ins periphere Blut kommt, interessierte uns die Zusammensetzung der unterschiedlichen Leukozytenpopulationen im peripheren Blut. Die Veränderung der prozentualen Zusammensetzung könnte durchaus einen Einfluss auf den Verlauf der Entzündungsreaktion haben.

## 2 Patienten, Methoden und Material

### 2.1 Patienten

#### 2.1.1 Patienten mit abdominalchirurgischen Operationen

Es wurden 20 Patienten mit großen (elektiven) Operationen in der Abdominalhöhle untersucht (6 Frauen, 14 Männer; medianes Alter 56 (33-88) Jahre). Einschlusskriterien: Keine Infektionskrankheiten während der letzten sechs Wochen vor der Operation, elektive Operation, Alter >18 Jahre. Ausgeschlossen wurden Patienten mit einem Alter über 90 Jahre, einer Immunsupression oder Schwangerschaft. Folgende Operationen wurden durchgeführt: Restgastrektomie (n=1), BII-Resektion (n=2), Leberteilresektion (n=3), duodenumerhaltende Pankreaskopfresektion (n=4), pyloruserhaltende Operation nach Whipple (n=6), Pankreasdrainageoperation nach Partington-Rochelle (n=1), Resektion Pankreaskopf und -schwanz, Y-Roux-Anastomose (n=1), Probelaparotomie multiple Probeentnahmen und Stanzbiopsie Pankreaskopf (n=1) und Milzextirpation (n=1) (bei geplanter Gastrektomie, die wegen zu hohem Blutverlust abgebrochen wurde). (Ein Patient (von 20) verstarb nach zwei Monaten.).

**Tabelle 2-1** Aufschlüsselung der Patienten mit großen abdominalchirurgischen Operationen nach Alter (Jahre), Geschlecht (männlich (m) oder weiblich (w)), Diagnose und Therapie.

| Patient (lfd.Nr.), Geschlecht | Alter (Jahre) | Diagnose | Therapie (Art der Operation) | verstorben |
|---|---|---|---|---|
| 1, w | 62 | Chronische Pankreatitis | Duodenumerhaltende Pankreaskopfresektion (DEPKR) und Modifikation nach Partington-Rochelle | |
| 2, m | 60 | Leberfiliae Segment IV bei Zustand nach (Z.n.) Sigmakarzinom 1998 | Lebersegmentresektion und Cholecystektomie (CCE) | |
| 3, m | 68 | Magenstumpfkarzinom bei Z.n. Billroth-II-Resektion 1952 | Restgastrektomie | 09.12.2000 |
| 4, m | 33 | Chronische Pankreatitis | Duodenumerhaltende Pankreaskopfresektion (DEPKR) | |

Fortsetzung

Forsetzung Tabelle 2-1

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| 5, w | 61 | Pankreaskopf-Neoplasie | pylorus preserving (pp) Whipple | |
| 6, m | 74 | Karzinom des Ductus Choledochus, postoperative Pankreasfistel | pylorus preserving (pp) Whipple | |
| 7, m | 52 | Entzündlicher Pankreaskopftumor mit distaler Choledochusstenose bei chronischer Pankreatitis | Pylorserhaltende, partielle Duodenopankreatektomie | |
| 8, w | 22 | Chronische Pankreatitis | Resektion des Pankreascorpus und-Schwanz, Y-Roux-Ananstomose | |
| 9, m | 63 | Magenkarzinom | Staging-Laparotomie, Omentektomie, Lymphknotenbiopsien, Infrarotkoagulation und subkapsuläre Milzblutung | |
| 10, m | 43 | Chronische Pankreatitis | Pankreasdrainageoperation nach Partington-Rochelle | |
| 11, m | 75 | Chronische Pankreatitis | Probelaparotomie, Adhäsiolyse, multiple Probeentnahmen, Stanz-biopsien Pankreaskopf | |
| 12, m | 63 | Magenantrumkarzinom | Gastrektomie, subtotale BII-Resektion mit Braunscher Fußpunktanastomose | |
| 13, m | 74 | Choledochus-Neoplasie | pylorus preserving (pp) Whipple | |
| 14, w | 50 | Rektumkarzinom hepatisch und pulmonal metastasiert | Lebersegmentresektion Segment IV-VI | |
| 15, m | 45 | Chronische Pankreatitis | Duodenumerhaltende Pankreaskopfresektion (DEPKR) | |
| 16, m | 62 | Leberfiliae Segmente VI-VIII bei kolorektalem Karzinom | Hemihepatektomie rechts, Cholecystektomie (CCE) | |
| 17, m | 45 | Pankreaskopfkarzinom bei chronischer Pankreatitis | pylorus preserving (pp) Whipple | |
| 18, w | 77 | Papillenkarzinom, Pankreas | pylorus preserving (pp) Whipple | |
| 19, m | 52 | Papillenkarzinom, Pankreas | pylorus preserving (pp) Whipple | |
| 20, w | 88 | Magenkarzinom, akute Cholezystitis bei Cholecystolithiasis (CCL) | BII-Resektion, Cholecystektomie (CCE) | |

### 2.1.2 Patienten mit Sepsis

Die zweite Patientengruppe bestand aus 20 Patienten, die eine Sepsis hatten (6 Frauen und 14 Männer, medianes Alter 67 (23-84) Jahre).
Die Ursache der Sepsis waren sekundäre Peritonitis (perforiertes Ulcus duodeni (n=3), Kolonperforation (n=4), Gallenblasenperforation (n=1), Nahtinsuffizienz nach Gastrektomie (n=1), akute nekrotisierende Pankreatitis mit retrokolischem Abszess (n=1), Aspirationspneumonie bei akuter nekrotisierender Pankreatitis (n=1), Adult respiratory distress syndrome (ARDS) bei ödematös-exsudativer Pankreatitis (n=1), Pleuraempyem (n=1), Pneumonie (n=1), eine bakterielle Infektion nach Polytrauma (n=3), Gefäßprotheseninfekt (n=1), Kniegelenksinfekt (n=1) und Mittelgesichtsphlegmone und Gehirnabszess (n=1). Die Sepsisdefinition erfolgte nach dem Konsens der ACCP/SCCM (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine) Konsensuskonferenz [Bone et al. 1992], [Fisher et al. 1995], [Members of the ACCP/SCCM 1992].
15 Patienten (von 20) waren katecholaminpflichtig. 7 Patienten (von 20) verstarben.

**Tabelle 2-2** Aufschlüsselung der Patienten, die eine Sepsis hatten, nach Alter (Jahre), Geschlecht (männlich (m) oder weiblich (w)), Datum der Blutabnahme, Diagnose,Therapie (Operation (Datum), Beatmungsdauer (Tage (d)).

| Patient (lfd.Nr.), Geschlecht und Alter | Datum der Blutabnahme | Diagnose | Operation | Beatmung | Verstorben |
|---|---|---|---|---|---|
| 1, w, 64 | 18.08.2000 | Mittelgesichtsphlegmone und Gehirnabszess | 10.08.2000 | 12d | |
| 2, w, 65 | 21.08.2000 | Perforiertes Ulcus duodeni | 17.08.2000<br>26.08.2000<br>29.09.2000 | 28d | |
| 3, m, 57 | 05.09.2000 | Aspirationspneumonie, Pleuraempyem | | 5d | 05.09.2000 |
| 4, m, 34 | 11.09.2000 | Zustand nach (Z.n.) Polytrauma | 14.09.2000<br>18.09.2000 | 12d | |
| 5, w, 89 | 13.09.2000 | Zustand nach (Z.n.) Polytrauma, septischer Schock | 04.09.2000 | 3d | 29.09.2000 |
| 6, m, 72 | 21.09.2000 | Gefäßprotheseninfekt | 14.09.2000<br>20.09.2000<br>04.11.2000 | 72d | |
| 7, m, 23 | 25.10.2000 | Zustand nach (Z.n.) Polytrauma | 06.10.2000<br>14.10.2000<br>25.10.2000 | beatmet ja, aber keine Dauer bekannt | |
| 8, m, 79 | 06.11.2000 | Kniegelenksinfektion, bei Zustand nach (Z.n.) Patellafraktur beidseits | 28.10.2000<br>02./04./08./<br>14./16./<br>18.11.2000 | 26d | 22.11.2000 |
| 9, m, 78 | 16.11.2000 | Kolonperforation | 14.11.2000 | 4d | 17.11.2000 |
| 10, m, 60 | 08.01.2001 | Nahtinsuffizienz nach Gastrektomie | 03.01.2001<br>06.01.2001 | 10d | 13.02.2001 |
| 11, m, 79 | 08.01.2001 | Perforiertes Ulcus duodeni mit Penetration in den Pankreaskopf, diffuse Peritonitis | 06.01.2001 | 3d | 21.01.2001 |
| 12, m, 65 | 08.01.2001 | Multiple, ischämische Perforationen des Darms | 16.12.2000<br>23.12.2000<br>28.12.2000<br>20.01.2001 | 47d | 31.01.2001 |
| 13, m, 33 | 18.01.2001 | Akut nekrotisierende Pankreatitis und retrokolischer Abszess | 16.01.2001<br>31.01.2001<br>02.02.2001 | 10d + 18d | |
| 14, w, 63 | 12.02.2001 | Perforiertes Ulcus duodeni | 11.02.2001<br>20.02.2001 | 26d | |
| 15, m, 31 | 20.02.2001 | Pneumonie | 15.02.2001 | ab 15.02 2001 | |
| 16, m, 54 | 01.03.2001 | Kolonperforation | 21.02.2001<br>27.02.2001<br>28.02.2001<br>02.03.2001 | bis 16.03.2001 | |

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 2-2

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 17, m, 58 | 15.03.2001 | Kolonperforation | 09.03.2001<br>10.04.2001<br>22.05.2001 | 20d + 4d | |
| 18, w, 39 | 21.03.2001 | Gallenblasenperforation | 12.03.2001 | 10d + 9d | |
| 19, m, 44 | 09.05.2001 | Adult respiratory distress syndrome (ARDS) bei ödematös-exsudativer Pankreatitis | | 11d | |
| 20, w, 44 | 28.05.2001 | Aspirationspneumonie | | | 07/2003 |

## 2.2 Gesunde Probanden (Kontrollgruppe)

Die Kontrollgruppe bestand aus 20 gesunden, freiwilligen Personen ohne infektiöse Erkrankungen (7 Frauen, 13 Männer, medianes Alter 29 (24-47) Jahre).

## 2.3 Methodik

### 2.3.1 Entnahme der Blutproben und Verarbeitung

#### 2.3.1.1 Patienten mit Sepsis

Bei den septischen Patienten wurde eine einmalige Blutprobe von 40 ml Vollblut über einen arteriellen Zugang der Arteria radialis abgenommen. Eine Koagulation des Blutes wurde durch Heparinisierung der endotoxinfreien Röhrchen (Greiner, Nürtingen) mit 10 IU/ml endotoxinfreiem Natrium-Heparin verhindert. Die Blutabnahme erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach Diagnosestellung der Sepsis. Außerdem wurden zwei EDTA-Röhrchen (1,6 mg EDTA/ml; S-Monovette, Sarstedt, Nümbrecht) zur Erstellung eines mikroskopischen und maschinellen Differentialblutbildes abgenommen. Es wurden ausschließlich die in der Klinik üblichen Einmalmaterialien verwendet.

#### 2.3.1.2 Patienten mit elektiver Operation

Der elektive Zeitpunkt der Operation ermöglichte die Messung der zu untersuchenden Parameter zu festgelegten Zeitpunkten vor und nach dem Trauma (Operation). Es sollten Konzentrationsänderungen erfasst werden, die schon früh und während der Operation stattfanden (Endotoxin, Zytokine, mRNA-Expression von TLR2 und TLR4), aber auch erst nach einem, bzw. zwei Tagen (Akute-Phase Proteine im Plasma). Die Blutabnahmen erfolgten daher zu vier verschiedenen Zeitpunkten: Präoperativ, sowie 2h, 24h und 48h postoperativ. Die präoperative und die erste postoperative Blutabnahme erfolgte über den arteriellen Zugang der A. radialis. Die zweite und die dritte postoperative Blutabnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen am zentralen Venenkatheter. Es wurden zu jedem Zeitpunkt jeweils 40 ml Vollblut (heparinisiert) abgenommen, außerdem 5 ml Blut zur Erstellung eines mikroskopischen und maschinellen Differentialblutbildes.

#### 2.3.1.3 Gesunde Probanden

Es erfolgte eine einmalige Blutabnahme. Zusätzlich zu den 60 ml heparinisierten Vollblutes wurde Blut zur Erstellung eines mikroskopischen und maschinellen Differentialblutbildes abgenommen. Die Blutabnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen über eine periphere Vene (Cubitalvene).

### 2.3.2 Aufbereitung der Blutproben

#### 2.3.2.1 Vollblutstimulation und Inkubation

Von den 40 ml Vollblut wurden jeweils 20 ml auf zwei 50 ml Bluecap Röhrchen verteilt. Die 20 ml des einen Röhrchens wurden mit 10 ng/ml E. coli 055:B5 Endotoxin stimuliert. Die andere Hälfte blieb ohne Zusatz. Aus den Röhrchen ohne Zusatz wurden zur Plasmagewinnung 2-3 ml Blut in ein mit EDTA versehenes Röhrchen (10 ml) pipettiert, um Endotoxin- und Zytokinwerte vor der Inkubation zu erhalten. Bei den gesunden Probanden wurden weitere 20 ml mit

Lipoteichonsäure (LTS) versetzt. Alle Proben (auch die ohne Zusatz) wurden vier Stunden bei 37° im Wasserbad inkubiert.

#### 2.3.2.2 Gewinnung von Plasma

Aus jedem Bluecap Röhrchen wurden nach der Inkubation jeweils 2-3 ml Vollblut in 10 ml Röhrchen pipettiert und mit EDTA stabilisiert. Das Plasma wurde durch zehnminütige Zentrifugation mit 4000 g vom Vollblut getrennt. Anschließend wurde das Plasma in 5 ml Röhrchen pipettiert und bei -20°C im Gefrierschrank gelagert. Aus dem Plasma wurden dann die Konzentrationen von Endotoxin, Zytokinen und Akute-Phase Proteinen bestimmt. Die Differenz zwischen stimulierter und nicht stimulierter Konzentration eines Zytokins wurde als Delta-Wert bezeichnet.

### 2.3.3 Bestimmung der Endotoxinkonzentration mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test

Mit dem Test kann die Konzentration von bakteriellem Lipopolysaccharid quantitativ bestimmt werden. Die Messmethode basiert auf der Fähigkeit von LPS, das Lysat der Blutzellen (Amöbozyten) des *Limulus polyphenus* (Pfeilschwanzkrebs) zu gelieren. Die Maßeinheiten sind Endotoxineinheiten je ml (EU/ml) [Berger et al. 1988], [Buttenschoen et al. 1996], [Hiki et al. 1995]. Die Sensitivität des Tests liegt bei 0,02 EU/ml und ist damit geeignet, auch kleine Konzentrationen an Endotoxin zu erfassen [Scheer 1989].
Bei diesem Test wird eine, durch Endotoxin ausgelöste, Enzymkaskade in Gang gesetzt, an deren Ende eine aktivierte Protease steht, welche in der Lage ist ein chromogenes Substrat umzusetzen. Die freigesetzte Menge an Chromogen ist der durch Endotoxin bedingten Aktivierung der Protease und damit auch dem Endotoxingehalt selbst proportional. Die Konzentration des Chromogens wird photometrisch bei 405 nm bestimmt.
Alle Materialien des Tests waren endotoxinfrei (Überprüfung in Vorversuchen).
Das Blut wurde in sterile und heparinisierte Polypropylenröhrchen abgenommen (10 IU/ml, Greiner, Nürtingen). Das Plasma wurde durch Zentrifugation (4000g, 10

min) abgetrennt, mit pyrogenfreiem Wasser verdünnt (1/10, Apuwa, Fresenius, Bad Homburg, Germany) und erhitzt (75°C, 15 min).
Die Endotoxinstandartkurve war eine Verdünnungsreihe eines lyophilisierten Endotoxinstandarts (E.coli O55:B5, 7 EU/ng, BioWhittaker, Walkersville, MD). Jeder Verdünnungsstufe wurde 100 µl endotoxinfreies Plasma zugesetzt (auch den Leerwerten und Kontrollen). Proben, Leerwerte, Kontrollen und Standart (jeweils 50 µl) wurden mit 50 µl LAL (Charles River, Sulzfeld, 25 min 37°C) inkubiert und doppelt bestimmt. Das chromogene Substrat (10 µmol, lyophilisiert, zu lösen in 6,6 ml pyrogenfreiem Wasser, Pentapharm, Basel, Schweiz) wurde (1/1) mit LAL-Puffer (pyrogenfreies Wasser mit 1,7% Tris , Braun, Melsungen, pH=9, adjustiert mit HCl) gemischt und den Wells (100 µl, 37°C) zugegeben. Nach drei Minuten wurde die Reaktion mit Essigsäure (100 µl, 20%) gestoppt. Die Quantifizierung erfolgte durch Messung der Lichtabsorption (405 nm) im Photometer [Berger et al. 1991], [Berger et al. 1988].

### 2.3.4 Endotoxininaktivierungskapazität

Zur Bestimmung der Endotoxininaktivierungskapazität wurde dem Plasma (100 µl) eine definierte Menge eines Lipopolysaccharids (4 EU des Lipopolysaccharids Salmonella abortus equi, Pyroquant, Walldorf) zugesetzt, die Endotoxinkonzentration mit dem LAL-Test gemessen und von diesem Wert die Endotoxinkonzentration des Plasmas vor der Zugabe der definierten LPS Menge (spike) subtrahiert [Berger et al. 1990], [Kokuba et al. 1993]. Obwohl das Ergebnis die Wiederfindung des zugesetzten Endotoxins angibt, wird in der Literatur der Begriff Inaktivierungskapazität synonym gebraucht. Die Begriffe reflektieren aber auch den unterschiedlichen Standpunkt der Betrachtung des gleichen Sachverhaltes. Dementsprechend erniedrigt sich die Inaktivierungskapazität bei Zunahme der Wiederfindung.

### 2.3.5 Bestimmung der Plasmaspiegel von IL-1β, IL-6 und TNFα

Die Zytokinkonzentrationen von IL-1β, IL-6 und TNFα wurden mittels im Handel erhältlicher ELISA-Kits betimmt (R&D Systems, Minneapolis). Die Sensitivität lag für TNFα bei 10 pg/ml, für IL-1β bei 5 pg/ml und für IL-6 bei 5 pg/ml.

Diese Enzym-Immunoassay Kits basieren alle auf derselben Grundlage: Sie sind Sandwich-Immunoassays in zwei immunologischen Schritten. Auf der Mikrotiterplatte sind, die dem jeweiligen Kit entsprechenden, monoklonalen Antikörper gebunden. Im ersten Reaktionsschritt werden die in der Probe zu bestimmenden Zytokine an die auf der Platte fixierten Antikörper gebunden.
Im zweiten Schritt wird dann ein Enzym-konjugierter Anti-Spezies-Antikörper zugegeben. Dieser bindet an den auf der Platte fixierten Antigen-Antikörper-Komplex, die ungebundenen Teile werden durch Waschen entfernt. Nach Zugabe des Enzymsubstrates ist die Intensität der entstehenden Färbung proportional der Zytokinkonzentration des Standards, bzw. der Proben.

### 2.3.6 Bestimmung der Plasmaspiegel von CRP, Haptoglobin, Transferrin, Albumin und Orosomucoid (AAG)

Die Plasmaspiegel von CRP, Haptoglobin, Transferrin, Albumin und AAG wurden nephelometrisch nach Anleitung des Herstellers bestimmt (Nephelometer 100 Analyser, Behringerwerke AG, Marburg).

### 2.3.7 Separierung mononukleärer Zellen aus Vollblut über einen Ficollgradienten

Leucosep besteht aus 3 Komponenten: Röhrchen, Filterscheibe und Trennlösung. Als Trennlösung wurde 15 ml Ficoll-Isopaque-Lösung (Dichte 1,077 g/ml; Biochrom Berlin) verwendet, die unter den Disc zentrifugiert wurde ( 700 g, 15-30 sek). Das benötigte Blutvolumen (15-30 ml heparinisiertes Blut, 20 IU/ml) wurde zugegeben, das restliche Volumen mit Phosphatpuffer (PBS) aufgefüllt und anschließend zentrifugiert (700 g, 25 min, ohne Bremse). Dabei sammelten sich die Erythrozyten und die Granulozyten unterhalb der Filterscheibe an, währenddessen sich darüber ein deutlich abgegrenzter Ring aus mononukleären Zellen bildete. Die mononukleären Zellen wurden in ein Bluecap transferiert, in 50 ml PBS suspendiert und ein zweites Mal zentrifugiert (370 g, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden erneut mit 10 ml PBS suspendiert und ein drittes Mal zentrifugiert (370 g, 10 min). Die gereinigten Zellen wurden mit 100 µl resuspendiert und in einem 1,5 ml Eppendorf-Safelock Reaktionsgefäß bei -80 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

### 2.3.8 mRNA Expression der TLR2 und TLR4

#### 2.3.8.1 RT-Multiplex PCR (Voruntersuchungen)

Es erfolgten Voruntersuchungen zum Nachweis der mRNA von TLR2, TLR4 und GAPDH mit einem kommerziell erhältlichen Multiplex-Kit (Human Signaling Gene Set 1, PCR Detection Kit, BioSource International, Camarillo, California).
Es blieb bei den Voruntersuchungen (die Ergebnisse werden nicht dargestellt), da mit der herkömmlichen Blockcycler PCR, im Gegensatz zur LightCycler PCR, keine quantitative Bestimmung der TLRs möglich war. Dennoch sollen die einzelnen Schritte der RT-Multiplex PCR wie folgt erläutert werden:
Die RT-Multiplex PCR (RT-MPCR) ist eine alternative und akkurate Methode zur simultanen Expressionsanalyse mehrerer Gene durch Genvervielfältigung unter den gleichen Bedingungen. Variationen der RNA-Isolation, initiale Quantifizierungsfehler oder tube-to-tube Variationen der RT und PCR können durch Mitbestimmung eines Housekeeping Gens (GAPDH, Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) kompensiert werden. Die Unterschiede der Expression der zu untersuchenden Gene kann durch Normalisierung ihrer Expression gegenüber der GAPDH-Expression erfolgen (Vergleich der Relationen). Die PCR-Primer haben ähnliche Schmelztemperaturen und keine offensichtlichen Überlappungen des 3'-Endes (Herstellerangaben). Die PCR Produkte hatten 747 Basenpaare (bp, GAPDH), 631 bp (TLR4) und 302 bp (TLR2).

Die Einzelschritte der RT-PCR sind folgende:

1. RNA-Extraktion aus mononukleären Zellen (High Pure Isolation Kit; Roche Boehringer, Mannheim).
2. RT (reverse Transkription) der mRNA in cDNA mit Superscript Reverse Transkriptase
3. Amplifizierung von TLR1-5 und mCD14 Fragmenten mittels RT-MPCR
   Visualisierung der PCR-Produkte mittels Agarose Gel-Elektrophorese

**1.**

„Single step“ Methode mit Trizol TM LS Reagenz:
Das Material wurde im Trizol TM LS Reagenz lysiert (0,75 ml für 5-10 x $10^6$ Zellen), das sehr effektiv Proteine denaturiert und inaktiviert, einschließlich RNasen. Dann wurde 0.2 ml Chloroform dazugegeben, damit wurden die verunreinigenden Proteine entfernt. In dem Filter des Kit-Röhrchens verblieb nach Zentrifugation (12000xg, 10 min, 4°C) die RNA, die man nur noch mit 0,5 ml Isopropyl-Alkohol zu fällen brauchte. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Ansatz mit 75% Ethanol gewaschen und zum Schluß jeweils 5 µl der isolierten RNA in 450 µl Wasser gelöst. Die Konzentration der RNA-Lösungen wurde über eine OD260/280-Extinktions-messung bestimmt. Die OD260/280-Werte (Ratio) sollten größer als 1,7 sein.

**2**

Die cDNA wurde als Ausgangsmaterial für die PCR verwendet.
Das Prinzip: 5 µl RNA, 1 µl Oligo(dt)Primer und bis zu 11 µl steriles Wasser wurden gemischt und zusammen für zehn Minuten auf 70 °C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt. Danach wurden Puffer (4 µl First Strand Buffer), Nukleotide (1 µl Mixed dNTP Stock), 1 µl dCTP, 2 µl 0,1 MDTT und RNase-Inhibitoren (RNAse-Out) dazugegeben. Der Ansatz wurde geschüttelt (gevortext) und bei 37 °C 2 min inkubiert. Nach Zugabe der SUPERSCRIPT RT (1 µl) wurde der Ansatz erneut geschüttelt und 1h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 4 µl 0,5 M EDTA beendet.

**3.**

Der Multiplex Kit (Human Signaling Gene Set , PCR Detection Kit, Biosource International, Camarillo, California) wurde entwickelt, um menschliche Toll-like Rezeptoren (TLR)1-5, CD14 und GAPDH Fragmente (Gene) mittels Multiplex-PCR zu amplifizieren und um sie anschließend mittels Elektrophorese zu visualisieren. Das Prinzip der Multiplex-PCR ist die simultane Vervielfältigung verschiedener Gensequenzen unter Zuhilfenahme verschiedener Primer unter gleichen Bedingungen. Die Unterschiede der Expression der zu untersuchenden Gene kann durch Normalisierung ihrer Expression gegenüber der GAPDH-Expression erfolgen (Vergleich der Relation). Die PCR-Primer haben ähnliche

Schmelztemperaturen und keine offensichtlichen Überlappungen des 3‘-Endes (Herstellerangaben). Die PCR-Produkte hatten 747 Basenpaare (bp, GAPDH), 631 bp (TLR4) und 302 bp (TLR2). Das typische PCR-Programm besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Denaturiert wurde initial und bei den folgenden zwei Zyklen bei 96 °C, bei den folgenden 28-33 Zyklen bei 94 °C. Die Dauer betrug immer 1 min. Bei der Denaturierung trennten sich die beiden Stränge der Template-DNA. Anschließend wurde die Temperatur auf 60 °C gesenkt, so daß es zur Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die Template-DNA kam. Die Dauer betrug bei den ersten zwei Zyklen 4 min, bei den folgenden Zyklen 2,5 min. Darauf wurde die Temperatur in jedem Zyklus 10 min auf 70 °C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erhöht. Anschließend wurde die Reaktion auf
25 °C abgekühlt. Für die MPCR wurde benötigt: 30,5 µl destilliertes Wasser, 5,0 µl 10 x hSIG1G MPCR Puffer, 5,0 µl 10 x hSIG1G MPCR Primer, 5,0 µl cDNA, 4,0 µl dNTP (3,12 mM) und 50,0 µl Mineralöl.

**4.**

Einzelschritte:

a) Herstellung von Agarosegelen

Für die Herstellung der Agarose MP wurde ein Erlenmeyer-Gefäß verwendet, in das man zur abgewogenen Menge Agarose die selbe Menge Elektrophorese-Puffer hinzufügte. Die Agarosekonzenration sollte etwa 2% betragen. Nun wurde die Suspension in der Mikrowelle solange erhitzt, bis alle Partikel aufgelöst waren. Zum Anfärben des Gels wurde Ethidiumbromid verwendet und dabei in einer Konzentration von 0,5-5 µg/ml dem Gel zugesetzt. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C konnte man mit Hilfe eines Kammes ein Gel mit Taschen gießen.

b) Gelelektrophorese

Nach Erkalten des Gels wurde es in eine Elektrophoresekammer gegeben. Als Elektrophoresepuffer wurde TAE (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) verwendet. Um besser verfolgen zu können, wo die DNA während des Auftragens und des Gellaufs abblieb, wurde sie mit einem Farbstoff (bromphenolblau und/oder orange) angefärbt, um anschließend in die Taschen pipettiert zu werden. Die angelegte Spannung betrug 0,5-5 V/cm Elektrodenabstand. Nachdem die DNA ausreichend lange (ca. 1h) gelaufen war, wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und photographiert.

### 2.3.8.2 Quantitative RT-PCR mit dem LightCycler

SYBR Green I (Molecular Probes Inc., Eugene, OR USA) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der unabhängig von der Sequenz spezifisch an doppelsträngige (ds) DNA bindet und nach Anregung Licht mit 530 nm emittiert. Die PCR durchläuft drei Phasen. (1) Die ds DNA wird in Einzelstränge geschmolzen (=Denaturierung). (2) Die Primer lagern sich an die Einzelstränge an (Annealing).
(3) Die Taq-Polymerase ergänzt die Einzelstränge zwischen den Primern zu Doppelsträngen (=Elongation). Die Fluoreszenz wird am Ende der Elongation eines jeden Zyklus gemessen, da zu diesem Zeitpunkt die Konzentration der ds DNA am höchsten ist. Das Detektionssystem des LightCyclers visualisiert das Fluoreszenzsignal aus dem Reaktionsgefäß (Borosilikatkapillaren) im Augenblick der Entstehung auf einem Monitor (Realtime) [Roche Diagnostics 1999]. Die Realtime-Detektion der Reaktionskinetik und die Verwendung einer speziellen Software ermöglicht eine quantitative Bestimmung des PCR-Produktes [Roche Diagnostics 1999]. Die Sensitivität des Detektors beträgt 10 fM Fluoreszein (in 20 µl Probenvolumen). Der Detektionsbereich des LightCyclers wird mit 1-$10^9$ Kopien der Target Sequenz angegeben [Roche Diagnostics 1999]. Die Sensitivität der LightCycler RT-PCR zusammen mit dem High Pure Isolation Kit (Roche Boehringer, Mannheim) wird mit 10-50 mRNA Kopien angegeben [Roche Diagnostics 1999].

### 2.3.8.3 Entwicklung des LightCycler Assays

Die PCR im LightCycler ist leistungsfähiger als die herkömmliche Blockcycler-PCR. Sie ist schneller durchführbar, benötigt keine Gelelektrophorese mit anschließender Visualisierung der PCR-Produkte und hat eine höhere Sensitivität. Ein kommerzieller Kit zur quantitativen Bestimmung der TLR war nicht erhältlich. Der Assay wurde daher selbst entwickelt und hatte folgende Spezifitäten:

1. Die Schmelztemperaturen waren durch die Primersequenzen vorgegeben 57,3 °C (TLR2), 55,3 °C (TLR4) und 61,4 °C (Porphobilinogen).

2. Annealingtemperatur: Die optimale Anlagerungstemperatur liegt typischerweise 3-12 °C über der Schmelztemperatur eines Primerpaares. Daher wurde empirisch für die oben genannten Primerpaare die Ausbeute und Spezifität der Amplikons zwischen 55-72 °C ermittelt. Die optimalen Temperaturen lagen bei 64 °C (TLR2, Porphobilinogen) und 63 °C (TLR4). Diese Temperaturen waren für den Blockcycler und den LightCycler gleich.

3. Magnesiumchloridreihe: $MgCl_2$ beeinflußt die Ausbeute und Spezifität der PCR wesentlich, da sie die Polymeraseaktivität stimuliert, den dNTP-Einbau fördert und die Schmelztemperaturen der DNA sowie des DNA-Primerkomplexes erhöht (eine zu geringe Konzentration vermindert die Ausbeute, eine zu hohe Konzentration fördert die Bildung unspezifischer Produkte). Daher wurde die Ausbeute und Spezifität des Amplikons für den Blockcycler empirisch für die $MgCl_2$ Konzentrationen 1 mMol, 1,5 mMol, 2 mMol, 3 mMol ermittelt. Die optimale Konzentration betrug 2 mMol (Porphobilinogen, TLR2) und 3 mMol (TLR4). Für den LightCycler wurden Konzentrationen zwischen 1,5 mMol und 6 mMol getestet. Die besten Ergebnisse (möglichst hoher und schmaler Peak der Schmelzkurve) wurden mit Konzentrationen von 5 mMol (TLR2) und 3 mMol (Porphobilinogen, TLR4) erzielt.

4. Optimierung der Fluorimeterverstärkung (gains): Die Sensitivität des Fluorimeters hängt von der Temperatur und der Intensität der

Lichtanregung ab. Die Einstellungen erfolgten nach Maßgabe des Handbuches (LightCycler Operator's Manual, V 3.0, Roche, Mannheim).

#### 2.3.8.4 Genidentifikation

TLR2 ist die Abkürzung für Homo sapiens Toll-like Rezeptor 2 und wurde von Rock et al. beschrieben. TLR4 ist die Abkürzung für Homo sapiens Toll-like Rezeptor 4 und wurde ebenfalls von Rock et al. beschrieben. PBGD ist die Abkürzung für Porphobilinogen Dehydrogenase. GAPDH ist die Abkürzung Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase. Dieses Enzym wurde von Arcari et al. beschrieben und im Human Signaling Gene Set 1 als Housekeeping Gen verwendet.

#### 2.3.8.5 Primer

Die Auswahl der DNA-Abschnitte zur Primersynthese erfolgte mit der Software Primer3 Output. Die Auswahlkriterien waren gleiche Schmelztemperaturen, möglichst gleiche Längen der Primer (right und left) sowohl für TLR2 als auch TLR4 und möglichst gleiche Längen der PCR-Produkte. Die Primer waren spezifisch für die entsprechenden Genome.

(Blast 2 sequences results, version BLASTN 2.0.9, NIH). Das Primerset für PBGD amplifiziert nur cDNA des PBGD Housekeeping Gens und nicht das gewebe-spezifische Transkript erythroider Zellen ([Chretien et al. 1988], [Finke et al. 1993], [Mensink et al. 1998]) und wurde bereits für eine quantitative real-time RT-PCR verwendet [Mensink et al. 1998].

| Verwendete Primer | ihre Nukleotide | und ihre Sequenzen |
|---|---|---|
| TLR2 Left | 300-319 | 5'-TGA CCT GTC CAA CAA CAG GA-3' |
| TLR2 Right | 601-582 | 5'-TTC CCA CTC TCA GGA TTT GC-3' |
| TLR4 Left | 1190-1209 | 5'-TGG ACA GTT TCC ACA ATT GA-3' |
| TLR4 Right | 1560-1541 | 5'-TGC CAT TGA AAG CAA CTC TG-3' |
| PBDG Left | 1105-1124 | 5'- CTG GTA ACG GCA ATG CGG CT-3' |
| PBGD Right | 5818-5798 | 5'- GCA GAT GGC TCC GAT GGT GA-3' |

Die Primer über HPSF gereinigt und lyophilisiert geliefert (MWG-Biotech AG, Ebersberg).

### 2.3.8.6. Sequenzierung

Die Verifizierung der PCR-Produkte erfolgte durch Sequenzierung (short run Sequenzierung, SEQLAB Göttingen GmbH, Göttingen) und Überprüfung (BLASTIN, NIH). Alle PCR-Produkte stimmten mit der entsprechenden Sequenz überein.

### 2.3.8.7 Standard

Die Standardreihen wurden durch serielle Verdünnung der mit den oben genannten Primern für TLR2 und TLR4 im Blockcycler produzierten PCR-Produkte nach Aufreinigung über ein Silikagel (QIAquick silica-gel membrane; Qiagen PCR-Purification Kit) und photometrischer Quantifizierung hergestellt. Die Expression von PBGD bzw. GAPDH wurde zur Normalisierung der TLR2- und TLR4 Expression verwendet.

#### 2.3.8.8 LightCycler Assay

Ein bis vier Mikroliter (0,05-0,2 µg) der cDNA-Proben wurden unter Verwendung der spezifischen Primer und dem LightCycler Fast Start Kit entsprechend den Herstellerangaben (Roche, Basel) eingesetzt. Die Kenndaten der PCR waren wie folgt:

- TLR2 und PBGD: nach intialer Denaturierung bei 95 °C für 10 Minuten wurden 45-60 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 5 Sekunden, Annealing bei 64 °C für 10 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 12 Sekunden durchgeführt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei 72 °C am Ende der Elongation.
- TLR4: Nach initialer Denaturierung bei 95 °C für 10 Minuten wurden 45-60 Zyklen mit Denaturierung bei 95 °C für 5 Sekunden, Annealing bei 63 °C für 10 Sekunden und Elongation bei 72 °C für 12 Sekunden durchgeführt. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte bei 72 °C nach der Elongation.

In jeden Lauf wurden Standard, Nullkontrolle, Positivkontrolle und unbekannte Proben eingesetzt.

### 2.3.9 Differenzierung der peripheren Leukozytensubpopulationen mittels Durchflusszytometrie (FACS)-Analyse

Folgende Beschreibungen beziehen sich auf Raffael et al., Grundlagen der Durchflusszytometrie.
Mittels eines Durchflusszytometers wurden die Leukozytensubpopulationen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten identifiziert.
Ein Durchflusszytometer ist ein optisches Messsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner, in einem Flüssigkeitsstrom schwimmender Partikel analysiert. Im Gegensatz zu einem statischen Fluorimeter beruhen Ergebnisse auf einer gleichzeitigen Messung mehrerer physikalischer und biochemischer Parameter von jeweils einer einzelnen Zelle. Der Schwerpunkt der Messung liegt nicht bei der Zählung von Zellen, sondern bei analytischen und in Zellsortiergeräten auch präparativen Charakterisierung heterogener Zellsysteme unterschiedlicher Herkunft. Eine manuelle Probenvorbereitung und eine Befundinterpretation sind erforderlich. Ein Durchflusszytometer mißt im wesentlichen optische Signale unterschiedlicher Qualität, wie Fluoreszenz und Lichtstreuung. Diese Signale entstehen beim Kontakt eines Partikels mit einem parallelen Lichtstrahl. Dazu werden die Zellen, die sich in einer Suspension befinden, als Einzelzellen durch die Glasküvette und Kapillare (Nozzel) geleitet, in der sie von parallelen Laserlicht angestrahlt werden. Das optische Detektionssystem und die Elektronik quantifizieren die Fluoreszenz- und die Streulichtemissionen jeder einzelnen Zelle.

#### 2.3.9.1 Lichtquelle

Als Lichtquelle werden in der Durchflusszytometrie Laser verwendet, da sie Licht emittieren, das parallel und von hoher Intensität ist, um spezifische Emissionsspektren (Fluoreszenz-) und Streulicht- (Scatter-)signale zu erzeugen. Emissionsspektren überschneiden sich mit den Absorptionsbereichen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und der Laser verfügt über eine hohe Strahlungsleistung. Es kommen beispielsweise luftgekühlte Argonlaser mit 15 mW Ausgangsleistung und einer Emissionswellenlänge von 488 nm zum Einsatz.

### 2.3.9.2 Fluoreszenz

Unter Fluoreszenz wird die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlung verstanden. Als fluoreszierende Verbindungen (Fluorochrome), eignen sich verschiedene Farbstoffe mit einem Anregungsbereich von ca. 488 nm. Fluoreszein (FITC), R-Phycoerythrin (PE) und Peridin-Chlorophyll-a-Protein (PerCP) lassen sich bei 488 nm anregen.
Es werden Fluoreszenzfarbstoffe gewählt, die sich zwar in der Fluoreszenzfarbe unterscheiden, deren Fluoreszenz aber mit derselben Wellenlänge anregbar ist. Das heißt, diese Farbstoffe weisen einen unterschiedlichen Abstand zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge (Stokes'scher Shift) auf.

### 2.3.9.3 Streulicht

Trifft ein Lichtstrahl auf eine Zelle, streut sie aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften Licht mit unterschiedlicher Quantität und Qualität.
Da unterschiedliche Zelleigenschaften die Lichtstreuung beeinflussen, ist die Messung der Lichtstreuung für die physikalische und funktionelle Charakterisierung von Zellen von Bedeutung.

Folgende Zelleigenschaften beeinflussen die Lichtstreuung:

- Querschnittsfläche
- Refraktionsindex
- Struktur der Membran (Faltung)
- Intrazelluläre Bestandteile (Granula, Vakuolen, Zellkern)

Das Licht wird nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut. Die Lichtstreuung ist am größten im Kleinwinkelbereich (0-10°) des einfallenden Lichtstrahls (Vorwärtsstreulicht, Forward Angle Light Scatter, [FSC]), ein geringerer Teil des Lichts streut seitwärts (90°) dazu (Seitwärtsstreulicht, Side Scatter, [SSC]).
Das Vorwärtsstreulicht ist sensitiv für die Querschnittsfläche und liefert daher Information über die Zellgröße.
Das Seitwärtsstreulicht ist sensitiv für den Refraktionsindex und liefert daher Information über Granularität, Membranfaltung und äußere Form.

Die Bildung der Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung beruht auf unterschiedlichen physikalischen Gegebenheiten der Zellen und liefert dadurch auch unterschiedliche Informationen: Mittels beider Lichtstrahlen lassen sich die wichtigsten Leukozytengruppen, wie Lymphozyten, Monozyten und neutrophile Granulozyten unterscheiden.

#### 2.3.9.4 Signalverarbeitung

a) Signalumwandlung:
Photodetektoren konvertieren die optischen Signale in elektrische Impulse, deren Höhe mit der Höhe des Lichtsignals korrelieren.

b) Signalverstärkung:
Für Lymphozytentypisierungen sollen logarithmische Verstärker der Fluoreszenz-signale einen Bereich von 4 Dekaden abdecken.

c) Schwellenwert:
Mit Hilfe einer elektronischen Schwelle (Threshold) werden echte Signale von Rausch- oder Störsignalen unterschieden.

d) Digitalisierung:
Ein Analog-/Digitalwandler (ADC) konvertiert die in Volt registrierte Signalintensität für jede gemessene Eigenschaft in eine Klassenzahl (Kanalzahl). Die in eine Klassenzahl umgewandelte Lichtintensität wird vom angeschlossenen Computer für eine quantitative Auswertung in den Speicher und später auf einem Speichermedium befindliche Datei zur weiteren Analyse abgelegt.

#### 2.3.9.5 Darstellung der Messergebnisse

Korrelierte Zweiparameterdarstellung:
Die korrelierte Zweiparameterdarstellung zeigt die Relation zwei verschiedener Eigenschaften einer Zelle zueinander an. Zum Beispiel die Korrelation von FSC zu SSC.
Die graphische Darstellung kann als Zweiparameter-Punktehistogramm (dot plot) erfolgen. Jeder Punkt steht also für eine bestimmte Zelle mit ihren beiden Eigenschaften. Alle Parameter können miteinander korreliert werden (Abb. 2-1).

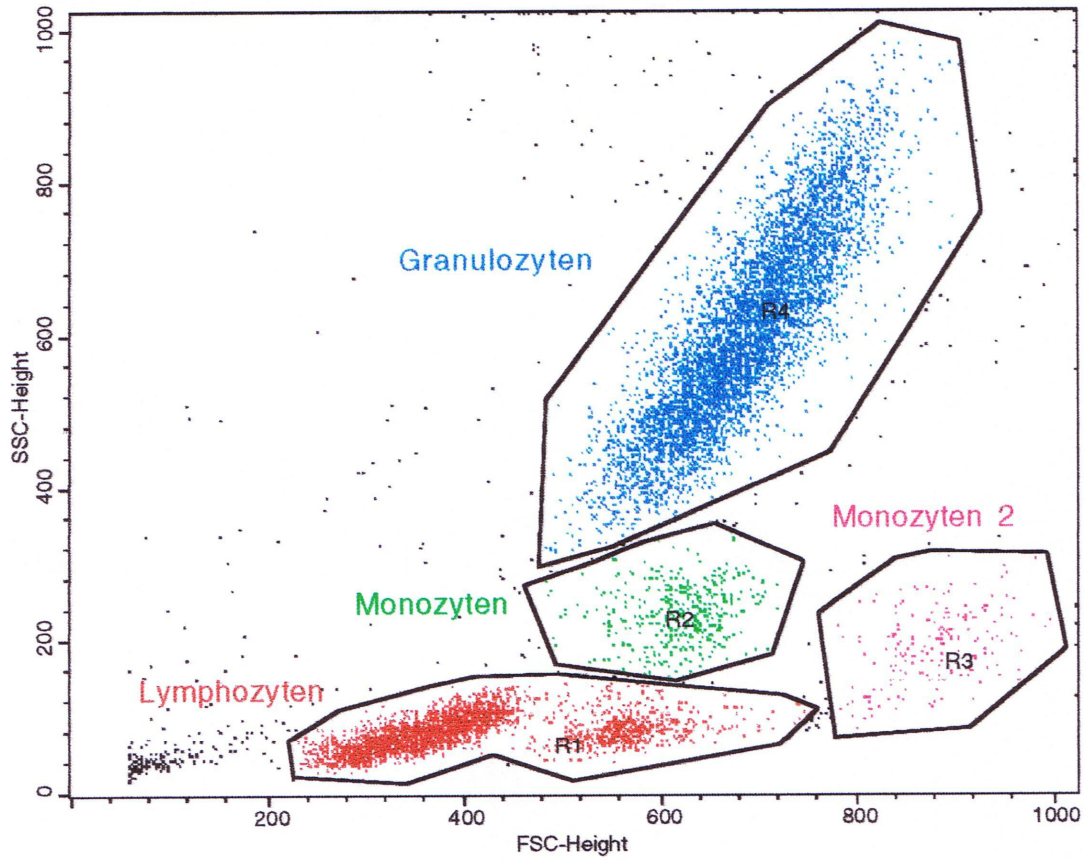



**Abbildung 2-1** zeigt die Darstellung von Forward Scatter (FSC) (Größe als Maß des Vorwärtsstreulichtes) und Side Scatter (SSC) (90° Streulicht: Granularität) einer Leukozytenprobe aus lysiertem Vollblut eines gesunden Probanden. Auf diese Weise lassen sich die Leukozytensubpopulationen Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten identifizieren, wobei jede Subpopulation ihr eigenes charakteristisches Muster aufweist.

Ein Nachteil von Punktehistogrammen ist die schwierige visuelle Abschätzung der Quantität der Populationen in den einzelnen Punktwolken bei einer hohen Zahl gemessener Zellen. Ein Punkt charakterisiert zwar eine Zelle, kann aber auch für mehrere Zellen mit identischen Eigenschaften stehen.

#### 2.3.9.6 Eingrenzung von Auswertefenstervorlagen (Gating)

Bei der Datenauswertung sind zunächst die interessierenden Zellen von Aggregaten, Zelltrümmern und anderen Zellarten abzugrenzen. Bei Immunfluoreszenzmessungen werden beispielsweise in der Parameterkombination „Größe und Granularität“ die vermutete Lymphozytenpopulation eingegrenzt. Im Ansatz zur Gate-Kontrolle werden ein monoklonaler Antikörper gegen das Panleukozytenantigen (CD45) und gegen Monozyten (CD14) zugegeben. Die fünf Hauptgruppen zeigen jeweils ein charakteristisches Färbemuster, sodass anhand der Immunfluoreszenz auf ein optimales Lymphozytenfenster im Streulicht zurückgeschlossen werden kann (sog. Backgating) und dessen Verunreinigung berechnet werden kann (Abb. 2-2).

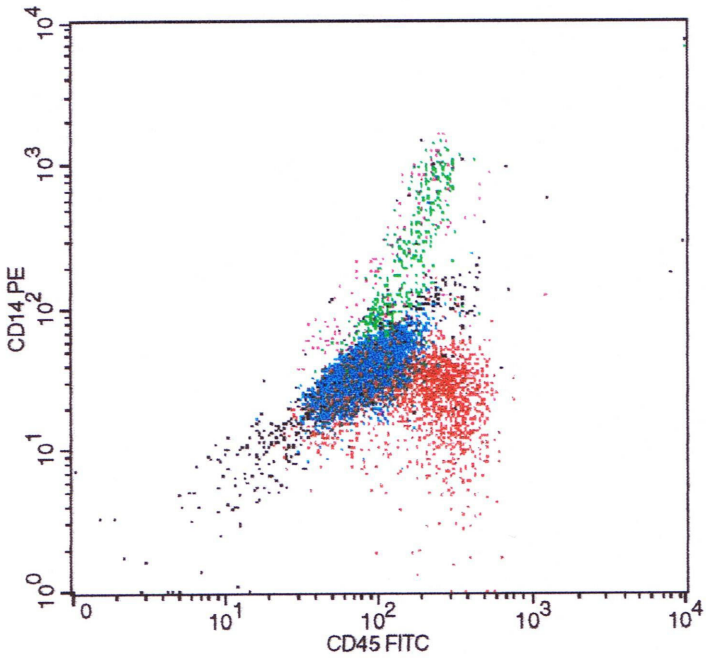



**Abbildung 2-2** zeigt die Hauptgruppen der Leukozyten, welche sich in der Expressionsdichte von CD45 und CD14 (positiv oder negativ unterscheiden). Die Populationen lassen sich durch Farbkodierung festlegen und sind gegeneinander quantifizierbar. (Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen das Panleukozytenantigen (CD45) und gegen das Monozytenantigen (CD14)).

### 2.3.9.7 Zell-Lyse und Zell-Fixierung

Entsprechend der Anleitung wurden 100 µl Vollblut mit 10 µl monoklonalen Antikörpern (CD 45-FITC und CD 14-PE) (Immunotech, IQTest®, Conjugated Antibodies) und zur Isotypkontrolle mit 10 µl MOUSE IgG1-FITC- und MOUSE IgG2a-PE-Antikörpern (Immunotech, IQTest®, Conjugated Antibodies) markiert. Die fluoreszierenden Antikörper binden spezifisch an Antigene der Leukozytenoberfläche. Die markierten Proben wurden mit FACS Lysing Solution (Becton Dickinson) entsprechend Anleitung behandelt. Die Erythrozyten wurden dabei unter hypotonen Bedingungen lysiert, während die Leukozyten morphologisch konserviert und fixiert blieben. Nach Zentrifugation (4 min bei 1000 g), wurde der Überstand verworfen und die Zellen wurden mit jeweils 2 ml PBS-Puffer zweimal gewaschen, gevortext und mit 0,3-0,5 ml PBS aufgefüllt.
FACS Lysing Solution, die monoklonalen Antikörper und CellFix bieten eine Standardmethode für die Quantifizierung von Leukozyten.

### 2.3.10 Statistik

Die Strukturierung und Auswertung der Daten erfolgte mit Methoden der deskriptiven Statistik. Zur Anwendung kamen Beschreibungen, Darstellungen und nicht parametrische Tests. Zur Charakterisierung der Lokalisation wurde der Median errechnet und zur Abschätzung der Dispersion das Minimum und das Maximum. Die Abbildungen zeigen überwiegend Box-and Whisker Plots. Die Box eines Box-and-Whisker Plots wird durch das erste und dritte Quartil begrenzt, der Median ist durch die Zentrallinie markiert; der untere/obere Whisker reicht von der Box bis zum Minimum/Maximum. Der Grad des Zusammenhangs zweier Variablen wurde mit dem Spearman Rang Korrelationskoeffizienten geschätzt. Eine Korrelation wurde bei $r < -0,5$ oder $r > 0,5$ angenommen. Der Test von Mann und Whitney (U-Test) wurde bei zwei unabhängigen Stichproben, der Wilcoxon-Vorzeichen-Test für Paardifferenzen bei abhängigen Stichproben verwendet. Da die Studien Pilotcharakter hatten, sind die angegebenen p-Werte orientierend. Die Datenverarbeitung erfolgte elektronisch (Statgraphics, Manugistics, Rockville, MD).

### 2.3.11 Ethikkomission

Die Studie erhielt von der Ethikkommission der Universität Ulm ein positives Votum.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Endotoxin und Endotoxininaktivierungskapazität

### 3.1.1 Patienten mit Abdominaloperationen

Die präoperative mediane Endotoxinkonzentration unterschied sich nicht signifikant von der medianen Endotoxinkonzentration bei gesunden Freiwilligen (median 0,02 EU/ml präop. vs. median 0,03 EU/ml, p=0,11).
Nach zwei Stunden lag die mediane Endotoxinkonzentration mit 0,035 (0,02-0,6) EU/ml zwar über dem präoperativen Wert, aber der p-Wert betrug 0,05.
Im weiteren postoperativen Verlauf waren die Werte im Vergleich zu präoperativ nicht signifikant verschieden (p, 0,99 bzw. 0,99 jeweils präop. vs 24h bzw. 48h postop.) (Abb. 3-1).

Die Endotoxininaktivierungskapazität war 2h nach der Operation signifikant erniedrigt, d.h. die mediane Konzentration der Wiederfindung war mit 0,25 EU/ml signifikant gegenüber dem präoperativen Wert erhöht (p=0,00015). Nach 24h war die mediane Konzentration der Wiederfindung im Vergleich zu dem präoperativen Wert zwar immer noch erhöht, aber nicht mehr signifikant (p=0,075). Nach 48h entsprach die mediane Konzentration der Wiederfindung dem präoperativen Wert (p=1) (Abb. 3-1).

Die Korrelationsanalyse zwischen der Endotoxinkonzentration im Plasma und der Endotoxininaktivierungskapazität des Plasmas ergab zwei Stunden postoperativ den Korrelationsfaktor r=0,6 (p=0,0045). Zu den Zeitpunkten präoperativ, 24h postoperativ und 48h postoperativ betrug der Korrelationsfaktor r jeweils 0,33, -0,14 und -0,25 (p jeweils 0,16, 0,63, 0,29). Damit ist eine nennenswerte Korrelation ($r>0,5$; $p<0,05$) nur zu dem Zeitpunkt 2h postoperativ gegeben.

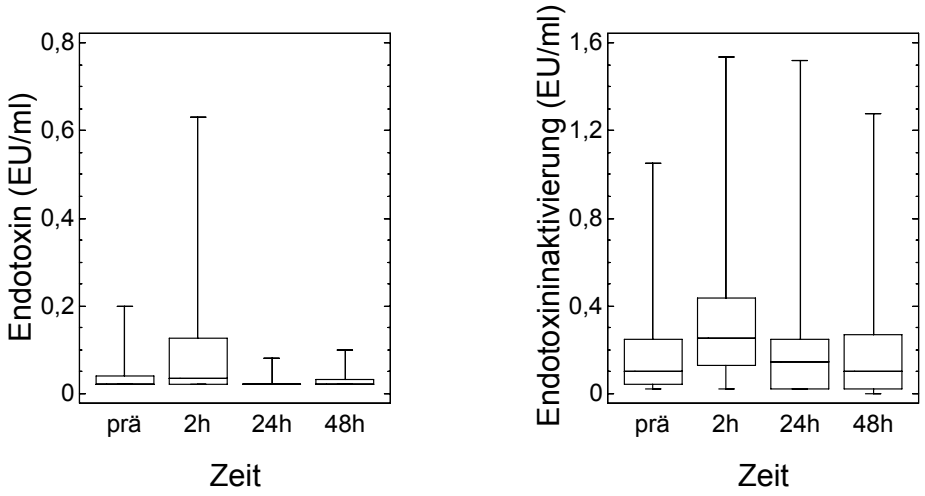



**Abbildung 3-1**

1. Perioperative Endotoxinämie bei abdominalchirurgischen Operationen (links).
2. Perioperative Endotoxininaktivierungskapazität des Plasmas bei abdominellen Operationen (rechts).

(prä, präoperativ; postoperativ nach 2h, 24h und 48h).

### 3.1.2 Patienten mit Sepsis

Die mediane Endotoxinkonzentration der Patienten, die an einer Sepsis litten, betrug 0,02 (0,02-0,45) EU/ml. In der Kontrollgruppe lag die mediane Endotoxinkonzentration bei 0,03 (0,02-0,44) EU/ml. Der Unterschied war nicht signifikant (p=0,17, septisch vs gesund).

Die mediane Konzentration der Endotoxininaktivierungskapazität betrug bei Patienten mit Sepsis 0,14 (0,02-1,03) EU/ml. In der Kontrollgruppe war die mediane Endotoxininaktivierungskapazität 0,08 (0,0-1,7) EU/ml. Es lag also eine erniedrigte Inaktivierungskapazität im Vergleich zu Gesunden vor, der Unterschied war aber nicht signifikant (p=0,45, septisch vs gesund).

## 3.2 Zytokine und Akute-Phase Proteine

### 3.2.1 IL-1-, IL-6- und TNF-Konzentrationen im Plasma

#### 3.2.1.1 Patienten mit Abdominaloperationen

Die mediane IL-1-Konzentration lag postoperativ im Plasma über der präoperativen medianen Konzentration. Das Maximum war 24h postoperativ erreicht (median 1,7 [0-35] pg/ml). Nach 48h war die mediane Konzentration mit 1,6 (0,0-66) pg/ml immer noch erhöht. Präoperativ und 2h postoperativ war die mediane IL-1-Konzentration 1 pg/ml. Insgesamt waren die Werte aber niedrig. Die postoperativen medianen Konzentrationen waren im Vergleich zu der präoperativen medianen Konzentration jeweils nicht signifikant verschieden (p, 0,99, 0,99, 0,75 jeweils präop. vs 2h, 24h, 48h postop.).

Die mediane Konzentration von IL-6 stieg postoperativ stark an. Das Maximum war 2h postoperativ erreicht (median 301 [0-2421] pg/ml). Im Verlauf fiel die Konzentration wieder ab, war aber 48h postoperativ im Vergleich zu präoperativ immer noch erhöht (median 79 [0-863] pg/ml). Alle postoperativen medianen Konzentrationen waren im Vergleich zur medianen präoperativen Konzentration signifikant höher (p, 0,00011, 0,0014, 0,0029 jeweils präop. vs 2h, 24h, 48h postop.) (Abb. 3-2).

Die mediane TNF-Konzentration war nach 2h signifikant angestiegen (median 10 [1-150] pg/ml) (p=0,029; präop. vs 2h) und war nach 24h noch über dem präoperativen Wert (median 8 [0-149] pg/ml). Die präoperative mediane TNF-Konzentration war 8 (1-129) pg/ml, die mediane TNF-Konzentration nach 48h betrug ebenfalls 8 (0-174) pg/ml. Der Konzentrationsanstieg war im Verlauf von präoperativ zu 24h und zu 48h postoperativ nicht signifikant (p, 0,92 bzw. 0,98 jeweils präop. vs 24h bzw. 48h postop.) (Abb. 3-2).

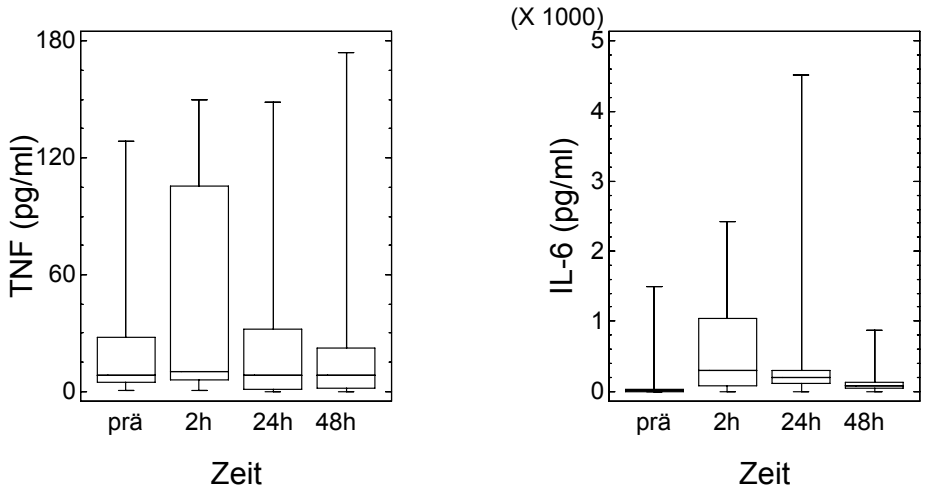



**Abbildung 3-2** Perioperative, Tumornekrosefaktor (TNF)-Konzentration (links) und Interleukin-6 (IL-6)-Konzentration (rechts) bei Patienten mit abdominalchirurgischen Eingriffen (prä, präoperativ; postoperativ nach 2h, 24h und 48h).

#### 3.2.1.1.2 LPS-induzierte Freisetzung von IL-1, IL-6 und TNF

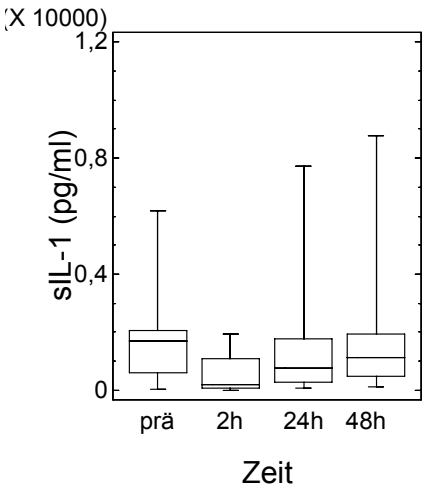
Es wurde die Freisetzungskapazität verschiedener proinflammatorischer Zytokine nach Stimulation im Vollblut gemessen.

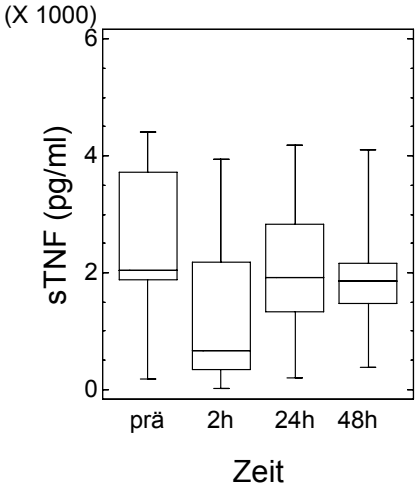
Die Freisetzungskapazität von IL-1 war präoperativ am höchsten (median 1676 [5-6171] pg/ml) und 2h postoperativ am geringsten (median 197 [0-1945] pg/ml). Der Unterschied war von präoperativ zu 2h postoperativ signifikant (p=0,0002 präop. vs 2h postop.), von präoperativ zu 24h und 48h postoperativ war der Unterschied nicht signifikant (p, 0,13 bzw. 0,4 jeweils präop. vs 24h bzw. 48h postop) (Abb. 3-3).

Die Freisetzungskapazität von IL-6 war zu allen Zeitpunkten so stark, dass die medianen Konzentrationen jeweils über 1700 pg/ml lagen (präop. 2342 pg/ml; 2h postop.1844 pg/ml; 24h postop. 4195 pg/ml; 48h postop.1767 pg/ml).
2h postoperativ war die Freisetzungskapazität von IL-6 im Vergleich zu präoperativ signifikant niedriger (p=0,032). Im weiteren Verlauf waren die

Differenzen nicht signifikant (p=0,69, 0,11 jeweils präop. vs 24h, 48h postop.) (Abb. 3-3).

2h postoperativ war im Blut die TNF-Freisetzungskapazität nach Stimulation mit LPS signifikant niedriger als präoperativ (p=0,002). Im weiteren Verlauf kam es wieder zu einem Anstieg und die Differenzen waren nicht mehr signifikant (p, 0,11 bzw. 0,059 jeweils präop. vs 24h bzw. 48h postop.).
Der Verlauf von TNF ist ähnlich dem von IL-1, da 2h postoperativ die niedrigste mediane Konzentration zu messen war (661 pg/ml) (Abb. 3-3).



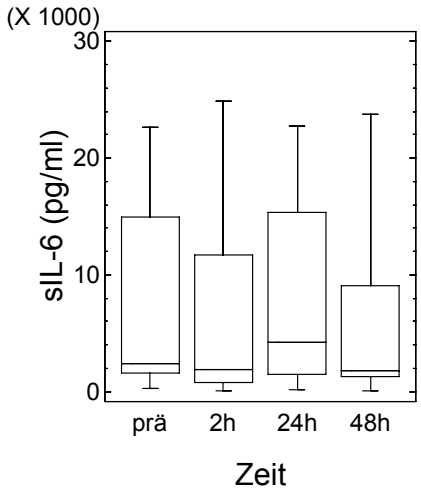




**Abbildung 3-3** Perioperative Freisetzungskapazität von Interleukin-1, Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor (sIL-1, sIL-6 und sTNF) im Vollblut nach Stimulation (s) mit Lipopolysaccharid (LPS) bei 20 Patienten mit elektivem abdominalchirurgischem Eingriff.
(prä, präoperativ; postoperativ nach 2h, 24h und 48h).

#### 3.2.1.2 Patienten mit Sepsis

Die mediane IL-1-Konzentration bei Patienten mit Sepsis betrug 3 [1-61] pg/ml. Diese war im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht (mediane IL-1-Konzentration gesunder Probanden: 0 [0-30] pg/ml), (p=0,0021 septisch vs gesund) (Abb. 3-4).

Im Vergleich zu gesunden Probanden war die mediane IL-6-Konzentration im Plasma ebenfalls signifikant erhöht (mediane IL-6-Konzentration gesunder Probanden: 5 [0-266] pg/ml, mediane IL-6-Konzentration von Patienten mit Sepsis: 145 [1-1253] pg/ml ), (p=0,0004 septisch vs gesund) (Abb. 3-4).

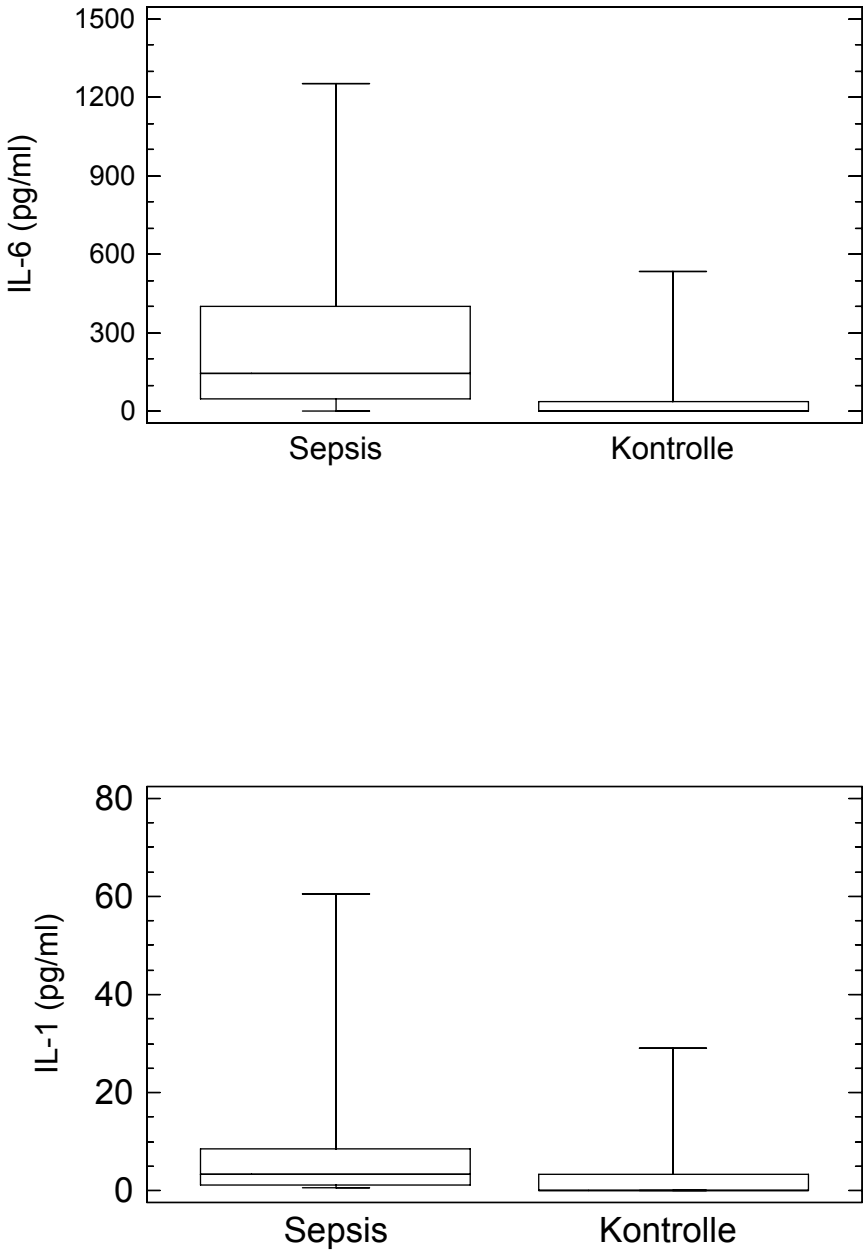



**Abbildung 3-4** Die Konzentrationen von Interleukin-6 (IL-6) (oben) und Interleukin-1 (IL-1) (unten) bei Patienten mit Sepsis im Vergleich zu den Zytokinkonzentrationen von Interleukin-6 (IL-6) und Interleukin-1 (IL-1) bei gesunden Probanden.

Bei zusätzlicher Stimulation des Vollbluts mit LPS kam es bei allen drei Zytokinen sowohl bei den Patienten die eine Sepsis hatten, als auch bei den gesunden Probanden, zu einer signifikanten Erhöhung der Zytokinkonzentrationen.
Für gesunde Probanden gilt: p=0,00014 IL-1 stimuliert vs IL-1 unstimuliert; p=0,00014 IL-6 stimuliert vs IL-6 unstimuliert und p=0,00011 TNF stimuliert vs TNF unstimuliert.
Für Patienten mit Sepsis gilt: p=0,00017 IL-1 stimuliert vs IL-1 unstimuliert; p=0,00023 IL-6 stimuliert vs IL-6 unstimuliert und p=0,00014 TNF stimuliert vs TNF unstimuliert.
Bei gesunden Probanden bestand für IL-1 und TNF eine noch höhere mediane Freisetzungskapazität als bei Patienten mit Sepsis (bei denen schon eine Endotoxinämie bestand). Der Unterschied war allerdings noch nicht signifikant (p, 0,26 bzw. 0,13, jeweils Δ IL-1 gesund/septisch bzw. ΔTNF gesund/septisch). Für IL-6 bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied (p= 0,5 für ΔIL-6 gesund/septisch) (Abb. 3-5).

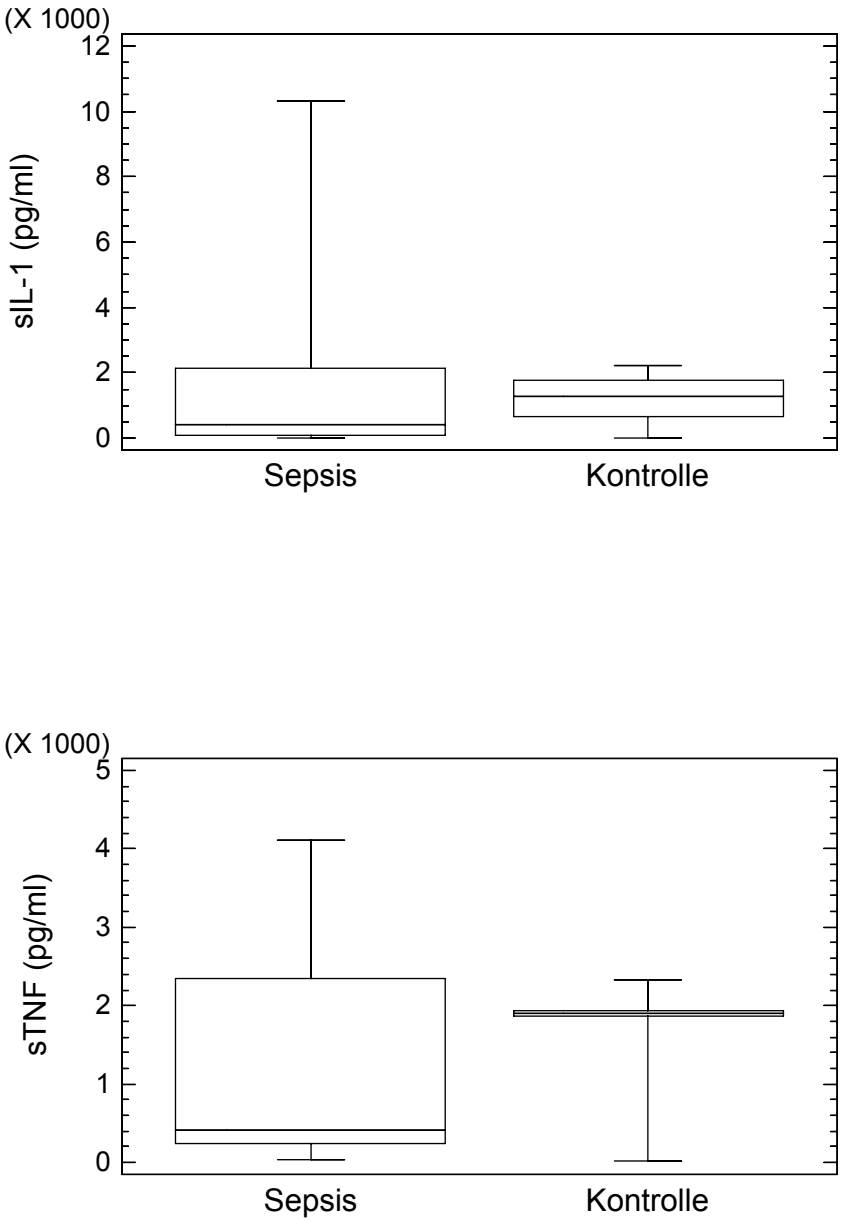



**Abbildung 3-5** Durch Lipopolysaccharid (LPS) ausgelöste Zytokinliberation von Interleukin-1 (sIL-1) (oben) und Tumornekrosefaktor (sTNF) (unten) (s=stimuliert mit LPS)) bei Patienten mit Sepsis im Vergleich zu gesunden Probanden.

### 3.2.2 C-reaktives Protein (CRP), Haptoglobin, AAG, Albumin und Transferrin

#### 3.2.2.1 Patienten mit Abdominaloperationen

Die mediane Konzentration des Akute-Phase Proteins CRP stieg durch die Operation langsamer an, als die mediane Konzentration des IL-6 und des IL-1. Der mediane Maximalwert war 48 Stunden postoperativ erreicht (median 221 [58-340] mg/l). Der Anstieg von präoperativ zu 24h bzw. 48h postoperativ war signifikant (p, 0,66, 0,000096, 0,000096 jeweils präop. vs 2h, 24h, 48h postop.) (Abb. 3-6).

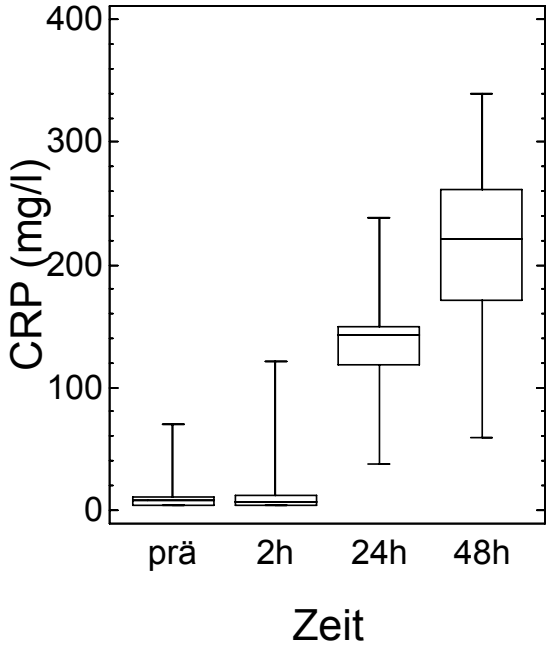



**Abbildung 3-6**
Perioperative C-reaktives Protein (CRP)-Konzentration bei abdominellen Operationen
(prä, präoperativ; postoperativ nach 2h, 24h und 48h).

Die mediane Konzentration von Haptoglobin war 2h und 24h postoperativ gegenüber präoperativ erniedrigt. (präop. median 2,1 [0,5-5,3] mg/ml; 2h postop. median 1,2 [0,3-3,4] mg/ml; 24h postop. median 1,2 [0,2-3,4]). Nach 48h war die mediane Konzentration wieder angestiegen (48h postop. median 2,2 [0,4-4,3] mg/ml). Der Abfall von präoperativ zu 2h und zu 24h postoperativ war signifikant, der Anstieg der medianen Konzentration nach 48h war noch nicht signifikant (p, 0,00009, 0,0001, 0,98 jeweils präop. vs 2h, 24h, 48h postop.) (Tabelle 3-1).

Der Verlauf der medianen Konzentrationen des AAGs war denen des Haptoglobins ähnlich, allerdings war der Abfall 2h postoperativ gegenüber präoperativ signifikant, 24h postoperativ aber nicht mehr und nach 48h war die mediane Konzentration signifikant gegenüber der medianen präoperativen AAG-Konzentration angestiegen (p, 0,0001, 0,61, 0,018 jeweils präop. vs 2h, 24h, 48h postop.) (Tabelle 3-1).

**Tabelle 3-1** Plasmakonzentrationen von Haptoglobin, Alpha-1-Acid Glycoprotein (AAG), bei 20 Patienten mit abdominalchirurgischen Operationen; Median (Minimum-Maximum).

| Parameter | Zeit | | | |
|---|---|---|---|---|
| | präoperativ | 2h postoperativ | 24h postoperativ | 48h postoperativ |
| Haptoglobin (mg/ml) | 2,1 (0,5-5,3) | 1,2 (0,3-3,4) | 1,2 (0,2-3,4) | 2,2 (0,4-4,3) |
| Alpha-1-Acid Glycoprotein (AAG) (mg/ml) | 0,9 (0,4-2,9) | 0,7 (0,3-1,2) | 0,9 (0,6-1,8) | 1,2 (0,2-2,4) |

Bei den Akute-Phase Proteinen Transferrin und Albumin handelt es sich um negative Akute-Phase Proteine. In der Studie kam es bei den medianen Konzentrationen beider Proteine postoperativ zu einem signifikanten Abfall (Transferrin: p, 0,0001, 0,000094, 0,00009; Albumin: p, 0,00009, 0,00009, 0,00009 jeweils präop. vs 2h, 24h, 48h postop.) (Abb. 3-7).

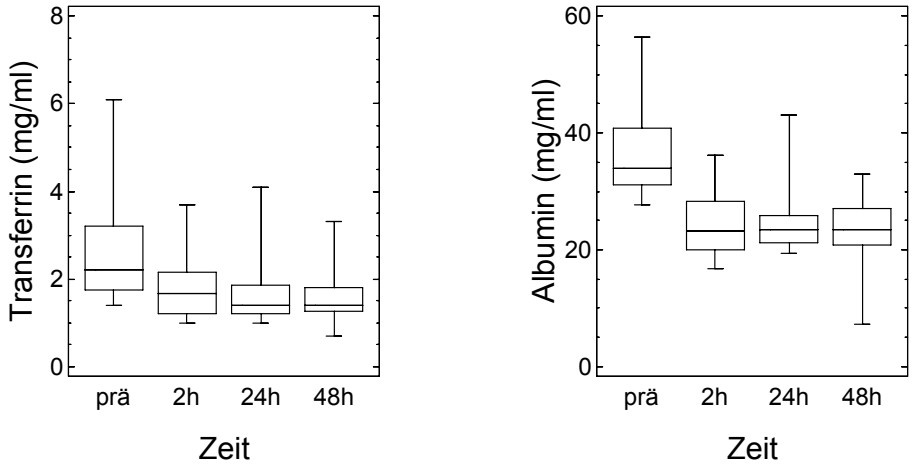



**Abbildung 3-7** Perioperative Konzentrationen von Transferrin (links) und Albumin (rechts) bei abdominellen Operationen (prä, präoperativ; postoperativ nach 2h, 24h und 48h).

### 3.2.2.2 Patienten mit Sepsis

Im Vergleich zu gesunden Probanden (median 3,5 [3,5-10] mg/l), war die mediane CRP-Konzentration bei Patienten mit Sepsis signifikant erhöht (median 205 [45-346] mg/l); (p<0,0001 septisch vs gesund) (Abb.3-8).

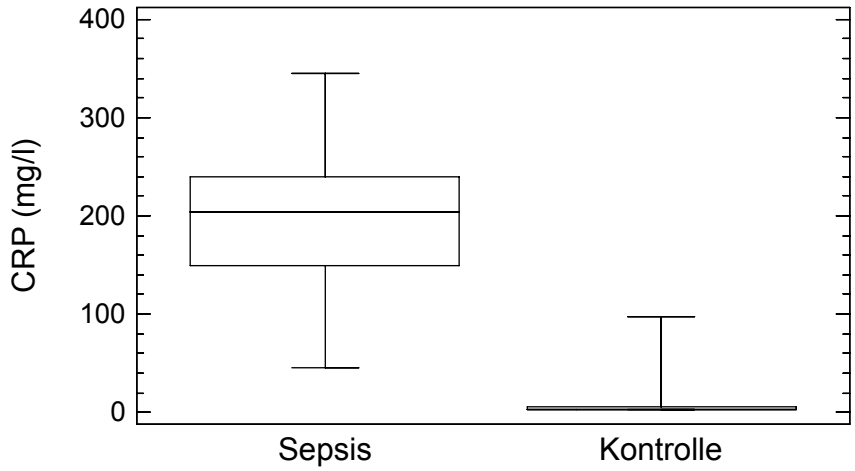



**Abbildung 3-8** C-reaktives Protein (CRP)-Konzentration bei Patienten mit Sepsis im Vergleich zu gesunden Probanden.

Die medianen Konzentrationen von Haptoglobin (median 3,9 [1,3-6,7] mg/ml) und AAG (median 2,2 [0,6-3,8] mg/ml) waren bei Patienten mit Sepsis im Vergleich zu gesunden Probanden ebenfalls signifikant erhöht (p jeweils <0,0001 septisch vs gesund) (Tabelle 3-2).

Die Konzentrationen von Transferrin (median 1,4 [0,4-3,1] mg/ml) und Albumin (median 17 [7,5-29] mg/ml) ) waren wie erwartet signifikant erniedrigt (p jeweils <0,0001 septisch vs gesund) (Tabelle 3-2).

**Tabelle 3-2** Plasmakonzentrationen von Haptoglobin, Alpha-1-Acid Glycoprotein (AAG), Transferrin und Albumin bei 20 Patienten mit Sepsis im Vergleich zu 20 gesunden Probanden. Median (Minimum-Maximum)

| Parameter | Patienten mit Sepsis | Gesunde Probanden |
|---|---|---|
| Haptoglobin (mg/ml) | 3,9<br>(1,3-6,7) | 1,6<br>(0,5-2,7) |
| Alpha-1-Acid Glycoprotein (AAG) (mg/ml) | 2,2<br>(0,6-3,8) | 1,5<br>(0,8-1,9) |
| Transferrin (mg/ml) | 1,4<br>(0,4-3,1) | 5<br>(4,4-7,9) |
| Albumin (mg/ml) | 17<br>(7,5-29) | 64<br>(53-80) |

### 3.2.3 Relation zwischen den Zytokinen IL-6, IL-1, TNF und Endotoxinämie beziehungsweise Endotoxininaktivierungskapazität

Zwischen den Konzentrationen von IL-6, IL-1 und TNF einerseits und der Endotoxinämie sowie der Endotoxininaktivierungskapazität andererseits bestand keine regelhafte Beziehung. Die Kinetik der Endotoxinämie und der IL-6-Konzentration war ähnlich und fast zeitgleich. Die Zunahme der Konzentrationen von IL-1, IL-6 und TNF erfolgte unmittelbar nach dem Konzentrationsanstieg des Endotoxins. Der Anstieg und Abfall der Konzentrationen von IL-6, IL-1 und TNF untereinander erfolgte annähernd zeitgleich (TNF stieg etwas verzögert an). Bei einer Korrelationsanalyse für den Zeitpunkt 2h postoperativ konnte keine nennenswerte Beziehung der Werte zueinander berechnet werden ($-0,5<r<0,5$).

### 3.2.4 Relation zwischen Endotoxinämie beziehungsweise IL-6-Konzentration einerseits und Konzentration der Proteine der Akute-Phase andererseits

Eine nennenswerte Korrelation ($-0,5<r<0,5$) zwischen der Endotoxinämie, beziehungsweise der IL-6-Konzentration und den Konzentrationen der Proteine der Akute-Phase lag nicht vor. Da der Konzentrationsanstieg der Akute-Phase Proteine mit einer Verzögerung gegenüber der IL-6-Konzentration und der Endotoxinämie stattfand, wurden in der Korrelationsanalyse unterschiedliche Zeitpunkte in Beziehung zueinander gesetzt. Für die Endotoxinämie und die IL-6-Konzentration wurde der Zeitpunkt 2h postoperativ und für die Konzentrationen der Akute-Phase Proteine der Zeitpunkt 24h und 48h postoperativ festgelegt.

### 3.3 mRNA Expression von TLR2 und TLR4

Abbildung 3-9 zeigt beispielhaft die Zunahme der Fluoreszenz des SyberGreen I in Abhängigkeit der Zyklenzahl der PCR und Abbildung 3-10 die Schmelzkurven der jeweiligen PCR-Produkte. Die LightCycler Technologie ermöglicht die Erfassung relativ großer Konzentrationsunterschiede der spezifischen Produkte (≈ $1:10^8$).

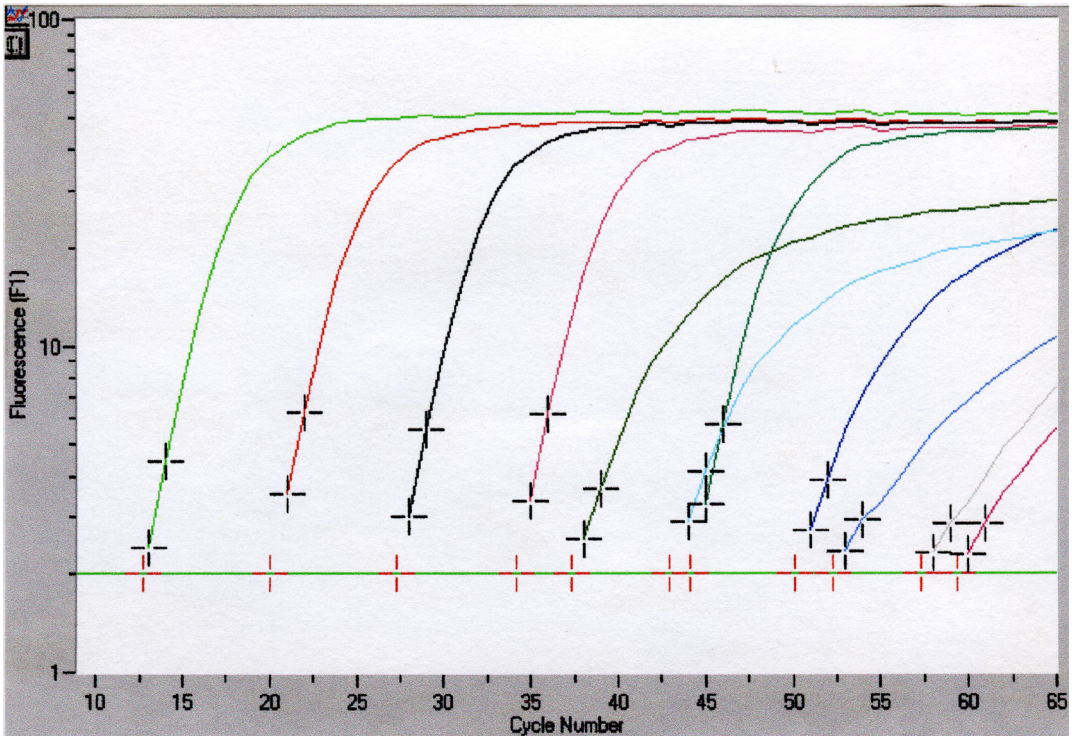



**Abbildung 3-9** Typische Kinetik der Fluoreszenz in Abhängigkeit der Zyklenzahl (hier: Porphobilinogenprodukte) des LightCyclers. Jede Probe entspricht einer Kurve. im Bereich des linearen Anstieges (in der lin-log Darstellung) kann die ursprünglich vorhandene Menge der Targetsequenz errechnet werden.

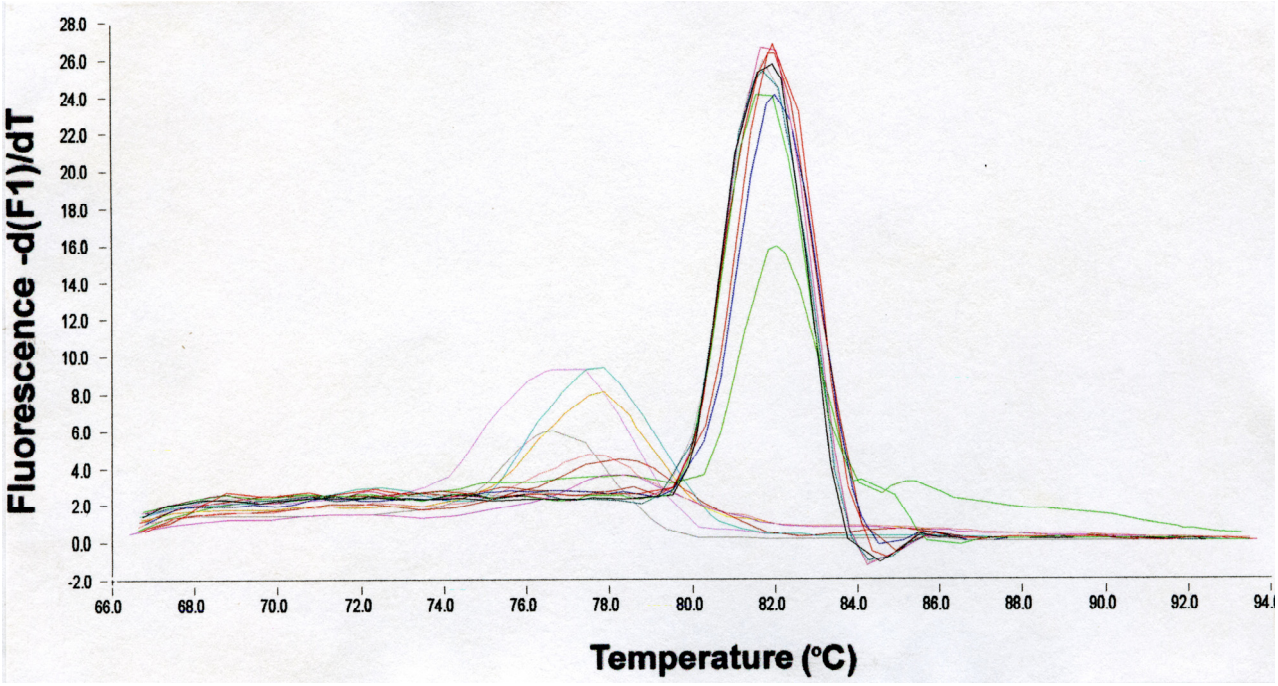



**Abbildung 3-10**

Typische Schmelzkurven der Polymerasekettenreaktion (PCR) Produkte am Beispiel von Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) (erste negative Ableitung der Fluoreszenz (-dF/dt) vs Schmelztemperatur °C). Die spezifischen Produkte für Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) haben eine Schmelztemperatur von etwa 81,8 °C und einen scharfen Peak. Unspezifische Primerdimere haben niedrigere Schmelztemperaturen (76,5-78,5 °C) und eine relativ breite Basis. Die nicht spezifische Fluoreszenz wird bei der Messung eliminiert, indem das Fluoreszenzsignal bei einer Temperatur oberhalb der Primerdimere und unterhalb der spezifischen Produkte detektiert wird [Roche Diagnostics 1999].

### 3.3.1 Patienten mit Abdominaloperationen

Die mRNA Expression wurde durch die Operation sowohl stimuliert als auch gehemmt. Die Expression wurde im Vergleich zur Expression der mRNA des House-keeping Gens Porphobilinogen Dehydrogenase (PBGD) bestimmt.
Am häufigsten jedoch war keine Änderung der Expression zu beobachten (2>Änderungsfaktor>0,5) (Tabelle 3-3 und 3-4). Eine generelle Tendenz lag nicht vor. Nach Stimulation der mononukleären Zellen im Vollblut mit Lipopolysaccharid waren die Verhältnisse prinzipiell gleich. Ein Überwiegen hemmender oder stimulierender Effekte konnte nicht nachgewiesen werden. Lediglich bei der Stimulation des Vollblutes mit LPS konnte man zwei Stunden postoperativ einen tendentiell hemmenden Effekt auf die TLR4-Expression beobachten.

**Tabelle 3-3** Änderung der Expression der messenger Ribonucleinacid (mRNA) von Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) und Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) relativ zur messenger (m)RNA Expression von Porphobilinogen Dehydrogenase (PBGD) (House-keeping Gen) bei 20 Patienten mit elektiven abdominalchirurgischen Eingriffen. Angegeben ist die Anzahl der Patienten (%, n), bei denen die bezeichnete Veränderung beobachtet wurde sowie die Zeitpunkte des Vergleichs.

| Parameter | Änderung | Vergleich der Zeitpunkte | | |
|---|---|---|---|---|
| | | prä → 2h | prä → 24h | prä → 48h |
| Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) | ↑<br>↔<br>↓ | 15% (n=3)<br>75% (n=15)<br>10% (n=2) | 20% (n=4)<br>65% (n=13)<br>15% (n=3) | 30% (n=6)<br>55% (n=11)<br>15% (n=3) |
| Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) | ↑<br>↔<br>↓ | 20% (n=4)<br>50% (n=10)<br>30% (n=6) | 15% (n=3)<br>55% (n=11)<br>30% (n=6) | 30% (n=6)<br>35% (n=7)<br>35% (n=7) |
| Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) nach LPS Stimulation | ↑<br>↔<br>↓ | 5% (n=1)<br>60% (n=12)<br>35% (n=7) | 30% (n=6)<br>50% (n=10)<br>20% (n=4) | 5% (n=1)<br>55% (n=11)<br>40% (n=8) |
| Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) nach LPS Stimulation | ↑<br>↔<br>↓ | 10% (n=2)<br>30% (n=8)<br>50% (n=10) | 20% (n=4)<br>45% (n=9)<br>35% (n=7) | 15% (n=3)<br>45% (n=9)<br>40% (n=8) |

prä, präoperativ; ↑ (↓), Anstieg (Hemmung) mindestens um Faktor 2 (0,5);
↔, Änderung der Expression zwischen Faktor 0,5 und 2; nach LPS Stimulation, nach Stimulation der mononukleären Zellen im Vollblut mit Lipopolysaccharid.

Die absolute Expression der Targetsequenzen im Reaktionsgefäß des LightCyclers zeigten analoge Verhältnisse zu den relativen Konzentrationen (Tabelle 3-4). Eine generelle Tendenz der Steigerung oder Hemmung der Expression war weder nativ noch nach Stimulation des Blutes mit LPS *in vitro* erkennbar.

**Tabelle 3-4** Änderung der absoluten Expression der mRNA von TLR2 und TLR4 im Reaktionsgefäß des LightCyclers bei 20 Patienten mit elektiven abdominalchirurgischen Eingriffen. Angegeben ist die Anzahl der Patienten (%, n), bei denen die bezeichnete Veränderung beobachtet wurde sowie die Zeitpunkte der Vergleichs.

| Parameter | Änderung | Vergleich der Zeitpunkte | | |
|---|---|---|---|---|
| | | prä → 2 h | prä → 24 h | prä → 48 h |
| Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) | ↑<br>↔<br>↓ | 15 % (n=3)<br>75% (n=15)<br>10% (n=2) | 20% (n=4)<br>70% (n=14)<br>10% (n=2) | 20% (n=4)<br>75% (n=15)<br>5% (n=1) |
| Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) | ↑<br>↔<br>↓ | 30% (n=6)<br>65% (n=11)<br>5% (n=1) | 15% (n=3)<br>60% (n=12)<br>25% (n=5) | 30% (n=6)<br>60% (n=12)<br>10% (n=2) |
| Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) nach LPS Stimulation | ↑<br>↔<br>↓ | 15% (n=3)<br>70% (n=14)<br>15% (n=3) | 20% (n=4)<br>65% (n=13)<br>15% (n=3) | 10% (n=2)<br>75% (n=15)<br>15% (n=3) |
| Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) nach LPS Stimulation | ↑<br>↔<br>↓ | 15% (n=3)<br>70% (n=14)<br>15% (n=3) | 20% (n=4)<br>75% (n=15)<br>5% (n=1) | 25% (n=5)<br>65% (n=13)<br>10% (n=2) |

Prä, präoperativ; ↑ (↓), Anstieg (Hemmung) mindestens um Faktor 2 (0,5); ↔, Änderung der Expression zwische Faktor 0,5 und 2; nach LPS Stimulation: nach Stimulation der mononukleären Zellen im Vollblut mit Lipopolysaccharid.

### 3.3.2 Patienten mit Sepsis

Nur bei zwei Patienten, die an einer Sepsis litten, konnte eine nennenswerte mRNA-Expression von TLR2 und TLR4 gemessen werden, bei zwei Patienten eine Expression von TLR2 und bei einem weiteren Patienten eine Expression von TLR4. Bei zwei Patienten war eine Porphobilinogenproduktion nicht messbar. Die PCR von RNA Präparationen aus peripherem Blut der übrigen 13 Patieten bildete zwar Porphobilinogenprodukte, aber keine spezifischen Produkte für TLR2 und TLR4. Nach 4-stündiger Stimulation des Vollblutes mit LPS konnte mit Hilfe der PCR aus mRNA bei zwei Proben eine Expression von TLR2 und TLR4 gemessen werden, bei 3 Proben wurde ein Transkript für TLR2 und bei einer Probe ein Transkript für TLR4 nachgewiesen. Demnach konnte auf Transkriptionsebene keine wesentliche Änderung der TLR-Expression durch Vollblutstimulation mit LPS aufgezeigt werden
(Tabelle 3-5).

Aufgrund der hohen Sensitivität des LightCycler Systems wurde die mRNA Expression bei fehlendem Nachweis der spezifischen Produkte als nicht relevant eingestuft. Bei 75% (15/20) der septischen Patienten war daher die mRNA Expression von TLR2 und TLR4 reduziert.

**Tabelle 3-5** Expression der messenger (m)RNA von Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) und Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) im Reaktionsgefäß des LightCyclers aus Blutproben von 20 Patienten mit Sepsis. Angegeben ist die Anzahl der Patienten, bei denen ein spezifisches Produkt gemessen werden konnte.

| Parameter | Anzahl der Patienten |
|---|---|
| TLR2 | n = 2 |
| TLR4 | n = 1 |
| TLR2 + TLR4 | n = 2 |
| TLR2 nach LPS-Stimulation | n = 3 |
| TLR4 nach LPS-Stimulation | n = 1 |
| TLR2 + TLR4 nach LPS-Stimulation | n = 2 |

### 3.4 Differenzierung der peripheren Leukozytensubpopulationen mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS)-Analyse und automatischer Zählkammer

Blutproben von Patienten mit großen abdominalchirurgischen Eingriffen wurden perioperativ untersucht und mit den Blutproben von Patienten mit Sepsis verglichen. Die Scatter-(Streulicht-) analyse im Durchflusszytometer erlaubt eine relative Abschätzung in der Zusammensetzung der zirkulierenden Leukozytensubpopulationen: Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Mit Hlife des automatischen Differentialblutbildes können absolute Mengen der einzelnen zellulären Blutkomponenten erfasst werden. Bei der FACS-Analyse wird die Eigenschaft der Leukozyten ausgenutzt, das parallel auftreffende Laserlicht unterschiedlich abzulenken. Für die Entstehung von Vorwärtsstreulicht ist insbesondere die Zellgröße verantwortlich. Die Ablenkung im 90° Winkel (Seitwärtsstreulicht) wird durch zytoplasmatische Vesikel verursacht. Demnach haben kleine Lymphozyten die geringste Fähigkeit, paralleles Laserlicht zu streuen, eosinophile und basophile Granulozyten haben ein besonders großes 90° Streulicht und Makrophagen haben große Vorwärtsstreulichteigenschaften. Die peripheren Monozyten wurden in zwei Subpopulationen (I und II) mit unterschiedlicher Zellgröße unterteilt. Die erste Monozytensubpopulation ist die kleinere und unreifere, die gerade aus dem Knochenmark entlassen wurde. Die zweite, größere Monozytensubpopulation, ist die mit der größeren Vorwärtsstreulichteigenschaft, die kurz davor ist, ins Gewebe abzuwandern. Sie zeigt auch eine stärkere CD14 Expression. Die zwei Subpopulationen unterscheiden sich nicht nur in der Größe, sondern auch in der Fähigkeit zu phagozytieren und in der Zytokinsekretion. Die erste Monozytensubpopulation hat deshalb eine geringere Fähigkeit paralleles Laserlicht zu streuen.

### 3.4.1 Patienten mit Abdominaloperationen

Die Veränderung der prozentualen Zusammensetzung der peripheren Leukozyten wurde im Verlauf von prä- zu postoperativ untersucht.

Der mediane prozentuale Anteil der Granulozytenpopulation stieg von präoperativ (median auto 65 [42-86]%, median facs 53 [7-73]%) auf 2h postoperativ signifikant an (median auto 82 [57-91]%, median facs 74 [8-87]%). 24h und 48h postoperativ war der mediane prozentuale Anteil der Granulozytenpopulation im Vergleich zu präoperativ immer noch signifikant erhöht (p, 0,00095, 0,0027, 0,00015 jeweils präop. vs 2h, 24h, 48h postop.) (Abb. 3-11).

Präoperativ lag der mediane Anteil der Lymphozytenpopulation bei 27 [11-50]% (median auto bzw. 17 [2-36]% median facs). Der mediane Anteil der Lymphozytenpopulation war 2h postoperativ signifikant abgefallen (median auto 13 [6-33]%, median facs 6 [0-17]%). 24h und 48h postoperativ war der mediane prozentuale Anteil der Lymphozytenpopulation im Vergleich zu präoperativ immer noch signifikant erniedrigt (p, 0,001, 0,0018, 0,000095 jeweils präop. vs 2h, 24h, 48h postop.) (Abb. 3-11).

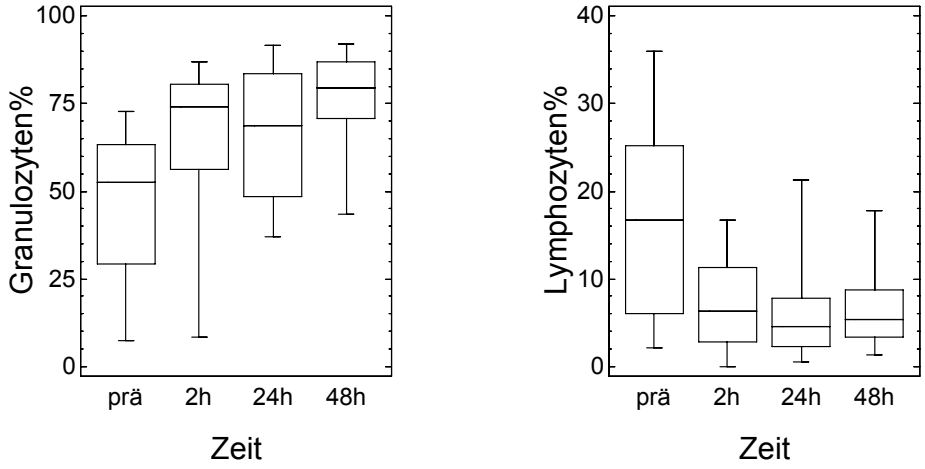



**Abbildung 3-11** Die Abbildung zeigt den Verlauf des prozentualen Anteils der Granulozyten (links) und der Lymphozyten (rechts), aus Blutproben von Patienten mit abdominellen Operationen, nach Streulichtmessungen am Durchflusszytometer (prä, präoperativ; postoperativ nach 2h, 24h und 48h).

Die Monozytenpopulation aus Vollblut wurde aufgrund der Streulichteigenschaften in zwei Gruppen unterteilt (Mono 1 und Mono 2).
Bei der Gesamtpopulation konnte man 2h postoperativ mit der automatischen Messung einen signifikanten Abfall des medianen prozentualen Anteils feststellen (median auto 4,9 [0,7-10,3]%). Der präoperative mediane Anteil war bei 7,3 [2,9-9,9]% (auto). Nach 24h kam es wieder zu einem Anstieg des medianen prozentualen Anteils (median auto 6,3 [2,8-12,2]%). Nach 48h war der mediane prozentuale Anteil ähnlich dem medianen prozentualen Anteil nach 24h (median auto 6,4 [3,5-9,3]%) (p, 0,0038, 0,76, 0,83 jeweils präop. vs 2h, 24h, 48h postop.) (Abb. 3-12).
Auch mit der FACS-Analyse konnte ein signifikanter Abfall des medianen prozentualen Anteils der Monozytenpopulationen von präoperativ auf 2h postoperativ festgestellt werden (median facs präop. 5,1 [0-13,7]% bzw. median facs 2h postop. 3,2 [0-12,9]%). Auch die Werte der FACS-Analyse zu den Zeitpunkten 24h und 48h postoperativ glichen den Werten der automatischen Zählung (p, 0,016, 0,15, 0,72 jeweils präop. vs 2h, 24h, 48h postop.) (Abb. 3-12).
Bei der ersten Population konnte kein signifikanter Unterschied des medianen prozentualen Anteils im Verlauf festgestellt werden. Der mediane Anteil fiel von

präoperativ 2,5 [0,5-13,7]% auf 1,5 [0,3-11,5]% 2h postoperativ ab (p, 0,29, 0,63, 0,36 jeweils präop. vs 2h, 24h, 48h postop.).
Bei der zweiten Population kam es 2h postoperativ zu einem signifikanten Abfall (median 2 h postop. 0,2 [0-3,4]%). Präoperativ lag der mediane Anteil bei 2,0 [0-7,5]%) (p, 0,025, 0,19, 0,4 jeweils präop. vs 2h, 24h, 48h postop.) (Abb. 3-12).

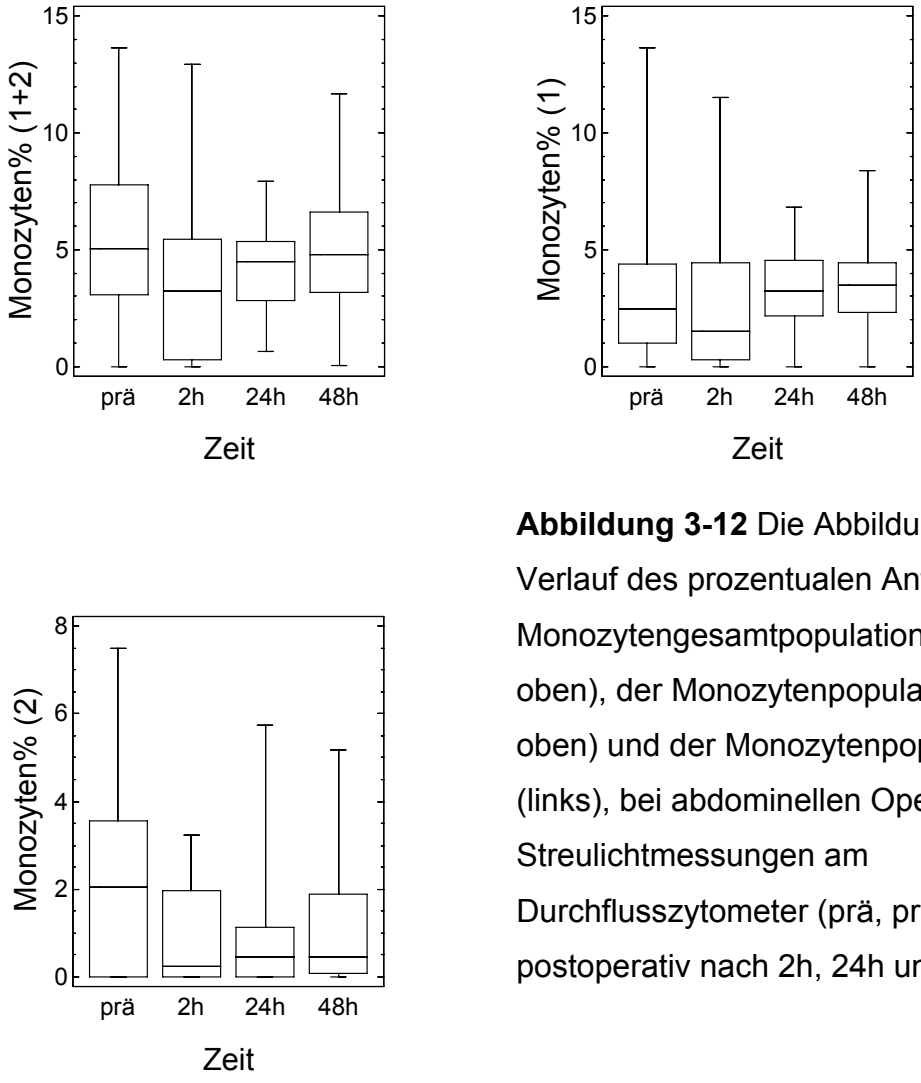



**Abbildung 3-12** Die Abbildung zeigt den Verlauf des prozentualen Anteils der Monozytengesamtpopulation (1+2) (links oben), der Monozytenpopulation 1 (rechts oben) und der Monozytenpopulation 2 (links), bei abdominellen Operationen, nach Streulichtmessungen am Durchflusszytometer (prä, präoperativ; postoperativ nach 2h, 24h und 48h).

### 3.4.2 Patienten mit Sepsis

Die prozentuale Zusammensetzung der peripheren Leukozyten im Blut von Patienten mit Sepsis wurde mit der prozentualen Zusammensetzung der peripheren Leukozyten im Blut von gesunden Probanden verglichen.

Der mediane prozentuale Anteil an Granulozyten war im Vergleich zu gesunden Probanden bei der automatischen Messung signifikant erhöht (p<0,0001 septisch vs gesund). Dagegen konnte man bei der FACS-Analyse keinen signifikanten Unterschied feststellen (p=0,87 septisch vs gesund; medianer prozentualer Anteil bei Patienten mit Sepsis: auto 91 [80-99]%, facs 63 [17-93]%; medianer prozentualer Anteil bei gesunden Probanden: auto 60 [50-86]%, facs 63 [49-82]%) (Abb. 3-13).

Dagegen war der mediane Lymphozytenanteil der Patienten mit Sepsis (median auto 5 [0-13]%, median facs 3 [0-20]%) im Vergleich zu den gesunden Probanden (median auto 34 [11-44]%, median facs 24 [10-37]%) bei beiden Messmethoden signifikant erniedrigt (p<0,0001 septisch (auto) vs gesund (auto), p<0,0001 septisch (facs) vs gesund (facs)).

Der Gesamtanteil der Monozytenpopulation war im Vergleich zur Kontrollgruppe bei beiden Messmethoden signifikant erniedrigt (medianer prozentualer Anteil bei Patienten mit Sepsis: auto 3,1 [0,1-10,2]%, facs 1,1 [0-5,9]%; medianer prozentualer Anteil bei gesunden Probanden: auto 6,0 [2,8-8,1]%, facs 6,0 [3,3-11,2]%; p, 0,36 septisch (auto) vs gesund (auto), p<0,0001 septisch (facs) vs gesund (facs)).
Mittels FACS-Analyse wurden die Monozyten in zwei Populationen unterteilt. Sowohl bei der ersten Monozytenpopulation, als auch bei der zweiten Monozytenpopulation war der mediane prozentuale Anteil im Vergleich zur gesunden Gruppe signifikant erniedrigt. Bei den Patienten, die an einer Sepsis litten, war der mediane prozentuale Anteil der ersten Population bei 1 [0-8]%, im Vergleich zu einem medianen prozentualen Anteil von 4,5 [1-8]% bei gesunden Probanden (p, 0,00026 septisch vs gesund). Der mediane prozentuale Anteil der zweiten Population lag bei Patienten mit Sepsis bei 0 [0-4,7]%, dagegen war der

mediane Anteil der zweiten Monozytenpopulation bei gesunden Probanden 1,8 [0-5,3]% (p, 0,012 septisch vs gesund).

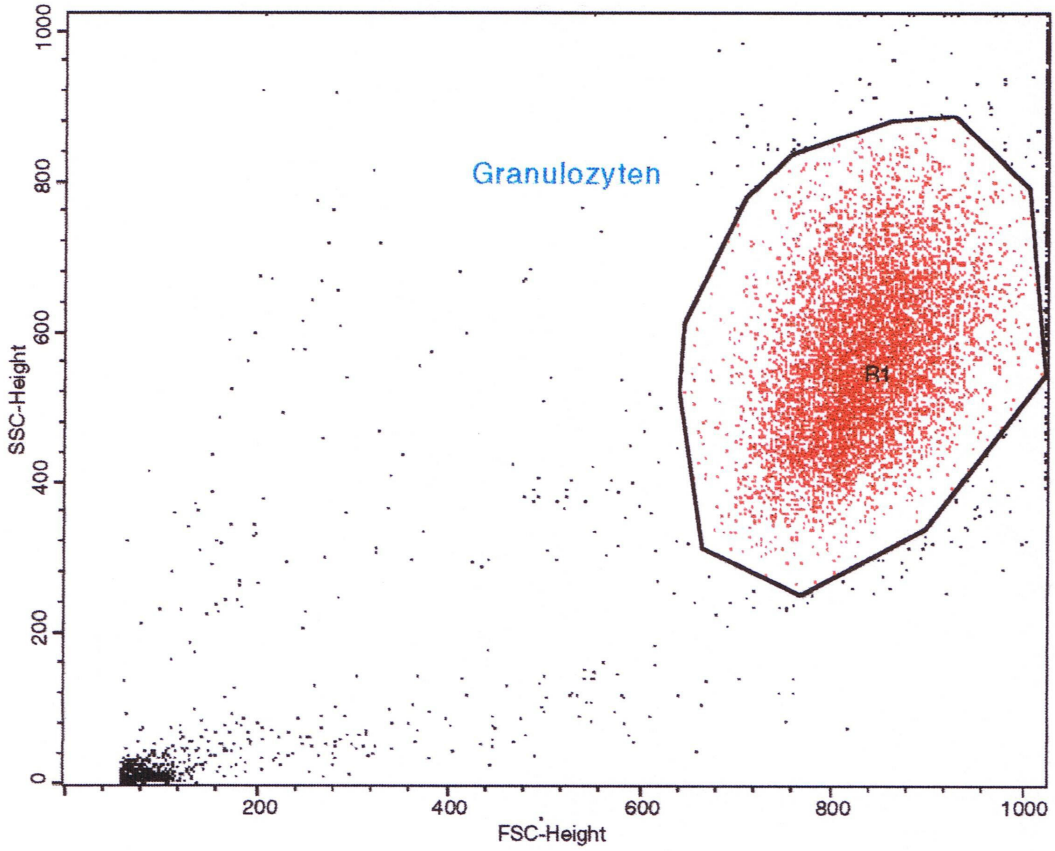



**Abbildung 3-13** zeigt die Darstellung von Forwardscatter (FSC) (Größe) und Sidescatter (SSC) (Granularität) einer Leukozytenprobe aus lysiertem Vollblut eines Patienten mit einer Sepsis. Es lässt sich nur noch die Granulozytenpopulation (Fenster: R1) identifizieren.

# 4 Diskussion

## 4.1 Diskussion der Fragestellungen

### 4.1.1 Endotoxintranslokation

#### 4.1.1.1 Perioperative Translokation bei abdominellen Operationen

Bei elektiven Operationen waren Messungen schon vor dem Operationstrauma möglich. Die präoperativen Endotoxinkonzentrationen unterschieden sich nicht von der Kontrollgruppe, stiegen aber schon während der Operation an und hatten ihr Maximum etwa zwei Stunden postoperativ (siehe Abb. 3-1, Seite 46).
Kokuba et al. berichteten nach Operationen am Gastrointestinaltrakt über Endotoxinkonzentrationen im Plasma von 10-30 pg/ml (ungefähr 0,1-0,3 EU/ml) [Kokuba et al. 1993], [Schippers et al. 2004]; diese Werte liegen im Bereich der eigenen Ergebnisse. Dies bestätigt die eigenen Resultate, zumal Kokuba et al. eine sehr ähnliche Bestimmungsmethode verwendet hatte [Kokuba et al. 1993].

#### 4.1.1.2 Translokation bei Sepsis

Im selbst untersuchten Kollektiv lag die mediane Endotoxinkonzentration bei 0,02 (0,02-0,45) EU/ml. Für die unterschiedlichen Ergebnisse und die geringen Endotoxinkonzentrationen können mehrere Faktoren verantwortlich sein. Venet et al. schrieben, dass die Methode des LAL-Assays möglicherweise aufgrund des indirekten LPS-Nachweises (über Enzymreaktionen) zu unzuverlässig sei [Venet et al. 2000]. Allerdings wurde die gleiche Technik als zuverlässig und sensitiv genug beschrieben, um auch kleine Mengen Endotoxin zu detektieren [Kokuba et al. 1993]. Die eigenen Messungen der Endotoxinkonzentrationen bei den verschiedenen, oben genannten Erkrankungen, bestätigen dies. Eine weitere Möglichkeit wären Verdünnungseffekte durch Infusionen oder auch bei der Probenverarbeitung im Labor. Eine Erklärung für die unterschiedlichen und häufig geringen Endotoxinkonzentrationen wäre die Möglichkeit, dass Endotoxin während der Sepsis nicht kontinuierlich, sondern phasenweise detektiert werden kann

[Olofsson et al. 1986]. Des weiteren wird über eine Veränderung der Proteinzusammensetzung des Plasmas während der Sepsis berichtet, die eine Steigerung der Inaktivierungskapazität des Plasmas für Endotoxin zur Folge haben [Calvano et al. 2003], [Olofsson et al. 1986]. Diese Vorstellungen bieten eine mögliche Erklärung für die Inkonsistenz des Endotoxinnachweises während der Sepsis in der Literatur und bei den eigenen Messungen.

#### 4.1.1.3 Beurteilung der Endotoxintranslokation in der Literatur

Untersuchungen zur Endotoxinämie, die vergleichbare LAL-Teste benutzten, kamen auch zu vergleichbaren Endotoxinkonzentrationen. So verwendeten Kokuba et al. eine Methode, die derjenigen entsprach, die auch für die eigenen Messungen benutzt wurde. Sie wiesen damit nach Operationen am Magen-Darmtrakt Endotoxinkonzentrationen im Plasma von 10-30 pg/ml (ca. 0,1-0,3 EU/ml) nach [Kokuba et al. 1993]. Diese Werte liegen im Bereich der eigenen Ergebnisse und bestätigen sie. Endotoxinwerte sollten nur dann miteinander verglichen werden, wenn auch die Analytik vergleichbar ist. Die meisten Studien, bei denen Endotoxin gemessen wurde benutzten verschiedene Modifikationen des chromogenen Assays. Die Methoden unterschieden sich in der Sensitivität, der Überwindung der LAL-Inhibition durch Plasmaproteine, in der Probenbehandlung und der Auswertung [Novitzky et al. 1994]. Das heißt die Ergebnisse waren nicht vergleichbar. Eine Bewertung der Quantität konnte durch den Vergleich mit einer Kontrollgruppe erfolgen.

**Beantwortung der <u>Fragestellungen</u>: Ausmaß der Endotoxinämie je nach Art der Erkrankung, bzw. Dauer der Endotoxinämie.**

Bei Patienten mit abdominalchirurgischen Eingriffen war eine Endotoxinämie postoperativ nachweisbar. Die präoperative mediane Endotoxinkonzentration unterschied sich nicht von der gesunder Probanden. 2h postoperativ war das Maximum erreicht. Dieser Zeitverlauf lässt den Schluss zu, dass die Operation für die Endotoxinämie verantwortlich war.

Bei Patienten mit Sepsis unterschied sich die Endotoxinkonzentration im Blut nicht signifikant von der Endotoxinkonzentration im Blut gesunder Probanden. Über die Dauer der Endotoxinämie bei septischen Patienten können keine genauen Angaben gemacht werden, da der Beginn bzw. die Dauer der Sepsis zum Zeitpunkt der Blutabnahme nicht genau definiert war. Für die geringen Endotoxinkonzentrationen können mehrere Faktoren verantwortlich sein. Venet et al schrieben, dass die Methode des LAL-Assays möglicherweise aufgrund des indirekten LPS-Nachweises (über Enzymreaktionen) unzuverlässig sei [Venet et al. 2000]. Die gleiche Methode wurde allerdings auch als zuverlässig und sensitiv genug beschrieben, um selbst kleine Mengen an Endotoxin zu detektieren [Scheer et al. 1989]. Eine weitere Möglichkeit wären Verdünnungseffekte der Proben durch Infusionen oder auch bei der Probenverarbeitung im Labor. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Hinweise in der Literatur für einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Endotoxinämie und der Schwere der Erkrankung überwiegen, diese Frage aber aufgrund methodischer Schwierigkeiten des LAL-Tests noch nicht für alle Kritiker abschließend mit hinreichender Evidenz geklärt sind.

### 4.1.2 Zytokinliberation durch LPS im Vollblut

#### 4.1.2.1 Patienten mit abdominellen Operationen

Die medianen Plasmakonzentrationen der Zytokine TNFα und IL-6 waren 2h postoperativ am höchsten, die von IL-1ß war 24h postoperativ am höchsten. Die mediane Konzentration für TNFα betrug 2h postoperativ 10 (0,5-150) pg/ml, die von IL-6 betrug 301 (0-2421) pg/ml und die von IL-1ß betrug 24h postoperativ 2 (0-35) pg/ml. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Schippers et al.: *In vivo* war die TNFα-Produktion im Plasma bei Patienten mit postoperativer Endotoxinämie nach Herzoperation höher als bei Patienten ohne Endotoxinämie [Schippers et al. 2004] (siehe Abb. 3-2, Seite 48). Nach Stimulation des Vollblutes mit LPS waren die Konzentrationen von TNF-alpha (median 662 [8-3933] pg/ml), IL-6 (median 1844 [33-24920] pg/ml) und IL-1ß (median 197 [0-1945] pg/ml) 2h postoperativ im Vergleich zu präoperativ signifikant vermindert (siehe Abb. 3-3, Seite 50).

Die verminderte Liberation kann als Ausdruck einer vorhergehenden Endotoxinexposition angesehen werden, die stark genug war, die Zytokinfreisetzungsfähigkeit der Monozyten zu beeinflussen [Vasilescu et al. 1994]. Eine erneute Stimulation trifft daher auf Zellen, die bereits auf den vorhergehenden Stimulus reagierten und einen Teil der Zytokine abgegeben haben. Die Quantität der zweiten Immunantwort ist daher geringer.
Die Freisetzungskapazität von IL-6 war zu allen Zeitpunkten so stark, dass die medianen Konzentrationen jeweils Werte über 1700 pg/ml erreichten. 2h postoperativ war die Freisetzungskapazität von IL-6 im Vergleich zu präoperativ signifikant niedriger (p=0,032), die mediane IL-6-Konzentration betrug aber immer noch 1844 pg/ml. Möglicherweise war die Freisetzungkapazität von IL-6 noch nicht so sehr beeinflusst, das heisst, die Toleranz noch nicht ausgeschöpft. Eine weitere Erklärung wäre, dass IL-6 als Marker für ein infektiöses Geschehen nicht spezifisch ist. Erhöhte Plasmaspiegel fanden sich auch bei schwerstkranken Intensivpatienten ohne Sepsis [Novotny et al. 2006]. Hohe IL-6-Absolutwerte, bzw. andauernd hohe IL-6-Spiegel scheinen mit einer schlechten Prognose assoziiert zu sein [Novotny et al. 2006].

#### 4.1.2.2 Patienten mit Sepsis

Im Vergleich zu gesunden Probanden waren die medianen IL-1- und IL-6-Konzentrationen im Plasma erhöht. Bei zusätzlicher Stimulation des Vollbluts mit LPS kam es bei allen drei Zytokinen zu einer Erhöhung der medianen Konzentrationen. Bei gesunden Probanden bestand für IL-1 und TNF noch eine höhere Freisetzungskapazität als bei Patienten mit Sepsis. Eine erniedrigte Zytokinfreisetzungskapazität nach vorangegangener Endotoxintranslokation lässt sich durch die Endotoxintoleranz beschreiben. Diese wurde auch von Calvano et al. bei septischen Patienten beschrieben. Die durch die Entzündungsreaktion ausgelöste Endotoxintoleranz wurde durch die Bestimmung von TNFα im Vollblut beurteilt. Die TNFα -Konzentration war bei Patienten mit Sepsis im Vergleich zu gesunden Patienten gemessen im Vollblut erniedrigt. Es lag also ein Minderansprechen auf Endotoxin vor [Calvano et al. 2003].

#### 4.1.2.2.1 Endotoxintoleranz

Das Zustandekommen der sogenannten Endotoxintoleranz kann durch folgende Mechanismen erklärt werden:

Als Folge einer Endotoxinstimulation bei einer Sepsis, ausgelöst durch eine bakterielle Infektion, kommt es zu einer Differenzierung der verschiedenen Monozytenpopulationen im peripheren Blut und zu einer überschießenden Bildung von Mediatoren mit mikrozider Aktivität, wie z.B. IL1β, IL-6 und TNFα [Bone et al. 1997]. Dies bestätigen Untersuchungen von Skinner et al.: Nach Vollblutstimulation mit LPS, SEB (Staphylokokkenenterotoxin) und PGN (Peptidoglykan), kam es zu einer Zunahme der Monozytenpopulation nach 20h, nach dem schnellen Anstieg (2h) von TNFα und IL-6 [Skinner et al. 2004]. Dabei wird angenommen, dass TLRs hauptsächlich für die Zytokinfreisetzung verantwortlich sind. Die ausgeschütteten Zytokine führen wiederum zu einer Modulation der peripheren Monozytenpopulationen, über eine prozentuale Zu- bzw. Abnahme (oder Differenzierung) im peripheren Blut [Skinner et al. 2004]. Des Weiteren wird eine Modulation der Leukozyten-TLRs diskutiert. Nicht nur LPS, sondern auch TNFα und Il-6 haben die Eigenschaft, die Immunantwort über TLR4 zu regulieren [Tamandl et al. 2003]. Möglicherweise werden daher humane neutrophile Granulozyten und Monozyten, die aus dem Blut von septischen Patienten isoliert wurden, im Sinne einer autoprotektiven adaptiven Antwort gegen eine weitere LPS-Antwort refraktär und produzieren daher keine (weniger) Zytokine [McCall et al. 1993]. Diese Anpassung der angeborenen Immunantwort soll als Folge einer durch Endotoxinämie ausgelösten Sepsis vor einer weiteren überschießenden Produktion antiinflammatorischer Zytokine schützen, die leicht in ein Multiorganversagen führen kann [Miyake 2004]. Die Endotoxintoleranz wurde auch im Tierexperiment bestätigt und kann in verschiedenen Monozyten und Makrophagen sowie Zellinien bestätigt werden. So zeigen auch mit LPS behandelte Leukozyten septischer Patienten eine Supression der steady-stade mRNA proinflammatorischer Gene als Ausdruck einer Adaptation der angeborenen Immunantwort [Armstrong et al. 2004], [Brandl et al. 2005], [Calvano et al. 2003], [Harter et al. 2004], [Manigold et al. 2003], [LaRue et al. 1994], [Skinner et al. 2004], [Yao et al. 2004]. Die Unfähigkeit der Zellen, inflammatorische Gene nach erneuter LPS-Exposition zu exprimieren, reflektiert

ein verändertes angeborenes Immunsystem (innate immune system) im Sinne einer Unterbrechung bzw. Modulation der molekularen Signalweiterleitung zwischen LPS-Erkennung und Genaktivierung [LaRue et al. 1994]. Da die TLRs für die Zytokinliberation mitverantwortlich sind, und bei der Signaltransduktion eine Enzymkaskade in Gang gesetzt wird, bei der viele Enzyme beteiligt sind, deren Aktivität wiederum von unterschiedlichen Promotoren und Inhibitoren abhängt, kann die Signaltransduktion von den TLRs bis NF-κB und bis zur Proteinsynthese, an verschiedensten Stellen entweder gehemmt oder aktiviert werden. Das heißt, es kommt zu einer überschießenden oder verminderten Ausschüttung von Zytokinen. Für die Endotoxintoleranz bedeutet das, dass eine erneute LPS-Stimulation im Blut zu einer Modulation der TLR-abhängigen Gene führen könnte.

#### 4.1.2.2.2 Modulatoren TLR-abhängiger Gene

Es folgen einige Beispiele unterschiedlicher Modulatoren der Signaltransduktion:
Bei einem Fehlen von IRAK-M kommt es zu einer erhöhten Zytokinproduktion und zu einer signifikant erniedrigten Endotoxintoleranz [Kobayashi et al. 2002].
IκBNS reguliert die Immunantwort über eine Hemmung der Aktivität bestimmter TLR-abhängiger Gene, über die Modulation von NF-κB. Makrophagen und dentritische Zellen, denen IκBNS fehlt, zeigen eine erhöhte Expression TLR-vermittelter Gene, wie z.B. IL-6 und IL12p40, die lange nach einer TLR Stimulation induziert werden [Kuwata et al. 2006].
Eine fehlende TGF-β-Aktivität führt über eine erhöhte mRNA-Expression von TLR4 zu einer unkontrollierten Stimulation von NF-κB und einer erhöhten Zytokin- und NO-Freisetzung, also zu einem erhöhten Ansprechen auf Endotoxin. Also ist TGF-β-1 ein Inhibitor der mRNA-Expression vonTLR4 [Mc-Cartney-Francis et al. 2004].
Hemmung von GSK3 führt zu einer unterdrückten Entzündungsreaktion bei Mäusen, die mit LPS stimuliert wurden [Martin et al. 2005].
ST2 ist ein Mitglied der TIR-Familie, das NF-KB nicht aktiviert. Im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen, konnten Mäuse, denen ST2 fehlte, keine Endotoxintoleranz entwickeln. ST2 unterdrückt IL-1R und TLR4 Signale über eine MyD88- und MAL-abhängigen Weg und moduliert so die Immunantwort [Liew et al. 2005].

MyD88 ist ein allgemeines Adapterprotein, das eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der Toll/IL1-Rezeptor-Familie spielt. Es wurde gezeigt, dass MyD88-defiziente Mäuse nicht auf Endotoxin ansprechen [Kawai et al. 1999].

**<u>Beantwortung der Fragestellung:</u> Änderung der Zytokinfreisetzungsfähigkeit nach Endotoxintranslokation oder zusätzliche LPS-Stimulation**

Eine Darmbarrierestörung mit Erhöhung der Permeabilität führt zur Endotoxinämie und damit zu einer verminderten Zytokinfreisetzungskapazität nach erneuter Stimulation des Vollblutes mit LPS.

Bei unserer Studie sollte berücksichtigt werden, dass der Beginn der Sepsis nicht exakt definiert war und lediglich die klinischen Kriterien für eine Sepsis erfüllt sein mussten. Das heißt, zum Zeitpunkt der Blutabnahme war die Erkrankung schon unterschiedlich weit fortgeschritten. Man muss annehmen, dass die Endotoxinspiegel während der Sepsis nicht gleichbleibend hoch waren und es somit im Verlauf einer Sepsis zu einer unterschiedlichen Zytokinliberation kam. Dies wäre eine mögliche Erklärung für die niedrigeren Zytokinkonzentrationen von TNF, IL-1 und IL-6 nach zusätzlicher Stimulation mit LPS im Vergleich zu gesunden Probanden. Bei eingetretener Endotoxintoleranz, kam es zu einer Zytokinfreisetzungskapazität, die im Vergleich zu gesunden Probanden schwächer ausgeprägt war.

### 4.1.3 Endotoxintranslokation und Akute-Phase-Reaktion

#### 4.1.3.1 Endotoxinämie und Endotoxininaktivierungskapazität des Plasmas

Bei elektiven abdominellen Eingriffen war die Inaktivierungskapazität zwei Stunden nach der Operation signifikant erniedrigt, das heißt die Wiederfindung des einer Probe zugesetzten Endotoxins war erhöht (siehe Abb. 3-1,Seite 46). Der zeitliche Verlauf der Inaktivierungskapazität reflektiert den Zeitverlauf der Endotoxinämie: Je höher die Wiederfindung, desto geringer war die Inaktivierungskapazität aufgrund der vorbestehenden Endotoxinbelastung. Analoge perioperative Verhältnisse wurden von Kokuba et al. bei Operationen aufgrund von Erkrankungen des Magen-Darmtraktes beobachtet [Kokuba et al. 1993]. Bei unseren Ergebnissen ergab die Korrelationsanalyse lediglich 2h postoperativ eine nennenswerte Beziehung zwischen der Endotoxinkonzentration im Blut und der Endotoxininaktivierungskapazität des Plasmas, bei den übrigen Zeitpunkten war die Beziehung der Werte zueinander schwach (r, 0,33, 0,6, - 0,14, - 0,25; präoperativ, 2h postoperativ, 24h postoperativ, 48h postoperativ).
Bei Patienten mit Sepsis lagen andere Verhältnisse vor. Die Messungen ergaben keinen signifikanten Unterschied der Endotoxinämie zwischen gesunden Probanden und septischen Patienten. Die mediane Endotoxininaktivierungskapazität war im Vergleich zu gesunden Probanden aber erniedrigt. Ein wesentlicher Unterschied zwischen septischen Patienten und denen mit elektiven chirurgischen Eingriffen war die Kinetik dieser Parameter. Bei Patienten mit elektiven chirurgischen Eingriffen trat die Endotoxinämie schnell, temporär und vor den Veränderungen der Akute-Phase Proteine auf, die mit einer Latenz von 24-36h im Blut erschienen. Daher waren die Konzentrationen der Akute-Phase Proteine während einer Operation und einige Stunden danach noch nicht erhöht (Zytokine ausgenommen). Bei septischen Patienten ist aber davon auszugehen, dass sie an einer kontinuierlichen oder rezidivierenden Endotoxinämie leiden, und die Akute-Phase-Antwort hatte bereits zu substanziellen Veränderungen der Plasmaproteinzusammensetzung geführt. Dadurch kam es zu einer niedrigeren Endotoxininaktivierungskapazität im Vergleich zu gesunden Probanden.

**<u>Beantwortung der Fragestellung</u>: Assoziation zwischen Endotoxinämie und Endotoxininaktivierungskapazität**

Die Endotoxininaktivierungskapazität ist von der Endotoxinlast des Plasmas und den Plasmakomponenten (Plasmaproteine, Lipoproteine) abhängig, die Endotoxin binden. Je höher die Endotoxinämie, desto geringer ist die Kapazität des Plasmas, weiteres Endotoxin zu inaktivieren (neutralisieren). Die Endotoxininaktivierungskapazität ist von allen endotoxinbindenen Molekülen im Plasma abhängig. Perioperativ verursacht die Endotoxinämie eine verminderte Inaktivierungskapazität. Die Endotoxininaktivierungskapazität bei Patienten mit Sepsis (mediane Wiederfindung 0,14 [0,0-1,03] EU/ml) ist im Vergleich zu gesunden Probanden (mediane Wiederfindung 0,08 [0,0-1,7] EU/ml) erniedrigt (d.h. die Wiederfindung ist erhöht.). Bei elektiv operierten Patienten ist die mediane Wiederfindung 2h postoperativ am höchsten (median 0,25 [0,02-1,54] EU/ml) und es besteht zu diesem Zeitpunkt eine nennenswerte Korrelation (r=0,6; p=0,0045) zwischen der Endotoxinämie und der Wiederfindung.

### 4.1.3.2 Relation zwischen den Zytokinen IL-6, IL-1, TNF und Endotoxinämie

Das operative Trauma bei elektiven Operationen führte zu einem schnellen Anstieg des Interleukin-6 im Plasma. Das Maximum war schon 2h postoperativ erreicht (siehe Abb. 3-2, Seite 48). Die Kinetik der Endotoxinämie und der IL-6-Konzentration ist ähnlich und fast zeitgleich. Die Zunahme der Konzentrationen von IL-1, IL-6 und TNF erfolgt unmittelbar nach dem Konzentrationsanstieg des Endotoxins. Der Anstieg und Abfall der Konzentrationen von IL-6, IL-1 und TNF erfolgte annähernd zeitgleich (TNF stieg etwas verzögert an).
Dieser Verlauf, des frühen Anstiegs der Zytokinkonzentrationen konnte auch bei Patienten mit Sprunggelenksfrakturen [Buttenschoen et al. (2000)] und bei polytraumatisierten Patienten [Buttenschoen et al. (2000)] beobachtet werden.
Ein sehr früher Anstieg konnte auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden [Knuefermann et al. 2002], [Novotny et al. 2005], [Schippers et al. 2004], [Skinner et al. 2004], [Revelly et al. 1996], [Roumen et al. 1993].
Der Hauptstimulator der Synthese der Akute-Phase Proteine ist das IL-6 [Gabay et al. 1999], [Gauldie et al. 1987], [Novotny et al. 2005]. IL-6 spielt nach Verletzungen

aller Art in der Immunantwort eine aktive Rolle und die stereotype Antwort des Immunsystems ist die Entzündung [Biffl et al. 1996], [Buttenschoen et al. 2000], [Gabay et al. 1999], [Novotny et al. 2005]. IL-6 wird durch verschiedene Zelltypen synthetisiert, wobei die wichtigsten die Makrophagen, Monozyten und Endothelzellen im Entzündungsgebiet sind [Gabay et al. 1999]. Zwischen der IL-6-Konzentration einerseits und der Endotoxinämie sowie der Endotoxininaktivierungskapazität andererseits bestand jedoch keine regelhafte Beziehung. Zum Teil kann dies dadurch erklärt werden, dass LPS auch andere Zytokine freisetzt, die die Synthese der Akute-Phase Proteine stimulieren [Fattori et al. 1994]. Durch die Ausschüttung verschiedener Zytokine kommt es zu einer gegenseitigen Beeinflussung, die wiederum zu einer Veränderung der Konzentrationen im Blut führt. Tamandl et al. führten Untersuchungen durch, die annehmen lassen, dass nicht nur LPS, sondern auch TNFα und IL-6 die Eigenschaft haben, die Immunantwort über TLR4 zu regulieren: TNFα führte zu einer verminderten TLR4-Expression auf Monozyten nach 6h. Nach 48h Stunden kam es zu einer verminderten Translokation von NF-κB und dadurch zu einer verminderten Freisetzung von IL-6 nach LPS-Stimulation. Im Gegensatz dazu führte eine Stimulation mit IL-6 zu einer erhöhten Expression von TLR4-Oberflächenprotein und erhöhte die Aktivität von NF-κB und AP-1 nach LPS-Stimulation [Tamandl et al. 2003]. Zusätzlich können auch Akute-Phase Proteine, wie CRP eine Zytokinliberation verursachen [Tilg et al. 1993]. Zytokine und Akute-Phase Proteine beeinflussen sich also gegenseitig. *In vitro* kann die enge Beziehung zwischen LPS und IL-6 leicht bestätigt werden, wenn dem Blut LPS zugesetzt wird. Innerhalb von 4h erfolgt eine starke Freisetzung von IL-6 [Vasilescu et al. 1996]. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Endotoxinämie zumindest partiell zu einer Freisetzung der Zytokine IL-1, IL-6 und TNFα führt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Schippers et al.. *In vivo* war die TNFα-Produktion im Plasma bei Patienten mit postoperativer Endotoxinämie nach Herzoperation höher als bei Patienten ohne Endotoxinämie [Schippers et al. 2004]. Zusammengefasst ist die Kinetik der Endotoxinämie und der IL-6-Konzentration ähnlich und fast zeitgleich (schneller Anstieg der Konzentrationen; die Zunahme der Konzentrationen von IL-1, IL-6 und TNF erfolgt unmittelbar nach dem Konzentrationsanstieg des Endotoxins). Obwohl eine Assoziation keine Kausalität belegt, deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Endotoxinämie beim Menschen zumindest partiell, eine Freisetzung oben genannter Zytokine bewirkt.

#### 4.1.3.3 Verlauf des CRP-Spiegels und Relation zwischen CRP und Endotoxinämie beziehungsweise IL-6-Spiegel

Die CRP-Konzentrationen wurden in eigenen Studien ebenfalls gemessen, da sie klinisch häufig als Indikator der Entzündungsreaktion bestimmt werden [Gabay et al. 1999]. CRP ist ein phylogenetisch altes Protein der primitiven Abwehr (nonimmune response). Eine der Hauptfunktionen begründet sich auf der Fähigkeit, Phospholipide zu binden und so körperfremde Pathogene sowie Phospholipidanteile zerstörter Zellen zu erkennen [Volanakis 1997]. Da der Hauptstimulator der CRP-Synthese IL-6 ist, und die IL-6-Synthese durch Endotoxin stimuliert wird, wurde deren zeitliche Sequenz untersucht. In den eigenen Untersuchungen stieg die CRP-Konzentration nach elektiven Operationen mit einer Verzögerung von etwa 24 Stunden an. Der Maximalwert war am zweiten postoperativen Tag erreicht (median 221 [58-340] mg/ml) (siehe Abb. 3-6, Seite 55). Dies deckt sich mit den Untersuchungen von Maruna et al.. Nach einem chirurgischen Trauma kam es zu einem schnellen Anstieg des Plasmaspiegels von IL-6. Der hierdurch induzierte Anstieg von Akut-Phase Proteinen, wie des C-reaktiven Proteins (CRP), folgte deutlich später mit ansteigenden Werten bis etwa 72h postoperativ [Maruna et al. (2002)], [Novotny et al. (2005)]. Dieser Zeitverlauf ist typisch für ein früh und schnell reagierendes Akute-Phase Protein [Gabay et al. 1999]. Es wurde auch eine positive Korrelation zwischen der CRP- und der IL-6-Konzentration beschrieben (r= 0,49) [Wortel et al. 1993]. Die eigenen Untersuchungen über die septischen Erkrankungen zeigten dagegen zwar erhöhte CRP-Konzentrationen, aber eine regelhafte Beziehung zur Endotoxinämie oder der IL-6-Konzentration war nicht erkennbar. Offensichtlich war das Kollektiv zu inhomogen, da unterschiedliche Grunderkrankungen und Verläufe vorlagen [Novotny et al. (2005)].

#### 4.1.3.4 Verlauf des Haptoglobin- und des AAG-Spiegels und Beziehungen dieser Parameter zum Endotoxin-, beziehungsweise IL-6-Spiegel

Haptoglobin und AAG sind positive Akute-Phase-Proteine. Die Konzentrationen steigen bei Entzündungen um mindestens 25% an [Fournier et al. 2000], [Gabay et al. 1999]. Die Konzentrationen steigen im Plasma nach Entzündungen oder traumatischen Ereignissen an.
Haptoglobin hat als Antioxidans antiinflammatorische Wirkung, schützt damit vor reaktiven Sauerstoffradikalen und unterstützt die Wundheilung durch Stimulation der Angiogenese [Deitch 1992], [Gabay et al. 1999]. Haptoglobin ist ein in der Leber gebildetes, den $\alpha_1$- Glycoproteinen zugehöriges Glykoprotein des Blutplasmas. Die wesentlichen regulatorischen Mediatoren der Genexpression von AAG und Haptoglobin sind neben den Glukokortikoiden vor allem IL-6, IL-1β und TNFα, also diejenigen Zytokine, deren Freisetzung durch Endotoxin stimuliert wird [Fournier et al. 2000]. Haptoglobin und AAG sind positive Akute-Phase Proteine, die in der Leber gebildet werden. Die Konzentrationen waren 2h postoperativ gegenüber präoperativ erniedrigt. Dies kann auf Verdünnungseffekte durch Infusionen zurückgeführt werden. 24h postoperativ waren die medianen Konzentrationen für Haptoglobin immer noch signifikant erniedrigt. Die medianen Konzentrationen beider Parameter stiegen bis zum Ende der Beobachtungszeit (48h postoperativ) an (für AAG war der Anstieg nach 48h signifikant).
Eine Korrelationsanalyse ergab keine Beziehung zwischen dem Plasmaspiegel der Akute-Phase Proteine und der Endotoxinkonzentration. Aufgrund der experimentellen Ergebnisse (Abhängigkeit der Synthese des Haptoglobins von den proinflammatorischen Mediatoren) und der durch die Translokation verursachten Endotoxinämie (mit nachfolgender Liberation proinflammatorischer Zytokine) kann dennoch auf einen indirekten Zusammenhang (zumindest partiell) geschlossen werden, der zu dem zeitlich verzögerten Konzentrationsanstieg des Haptoglobins und des AAGs im Plasma führte, wobei die zeitliche Verzögerung der Synthesezeit des Haptoglobins und des AAGs entspricht.

#### 4.1.3.5 Verlauf des Transferrin- und des Albumin-Spiegels und Beziehungen dieser Parameter zum Endotoxin-, beziehungsweise IL-6-Spiegel

Bei den Akute-Phase-Proteinen Transferrin und Albumin handelt es sich um negative Akute-Phase Proteine, das heißt, bei Entzündungen kommt es zu einem Abfall der Konzentrationen um mindestens 25%. Postoperativ konnte man bereits nach zwei Stunden einen signifikanten Abfall beider medianer Konzentrationen feststellen (siehe Abb. 3-7, Seite 57). Es ließ sich keine nennenswerte Beziehung zum Endotoxin- und IL-6-Spiegel nachweisen. Bei elektiven Operationen und komplikationslosem Verlauf stiegen die medianen Konzentrationen aber wieder rasch an. Dagegen sind die, bei der Sepsis beschriebenen, niedrigen Transferrin- und Albuminwerte zumindest partiell auf eine immer wieder auftretende Endotoxinämie und somit auch auf höhere IL-6-Spiegel zurückzuführen.

**<u>Zusammenfassung und Beantwortung der Fragestellung</u>: Relation zwischen Endotoxinämie und Konzentration der Proteine der Akute-Phase**

Lipopolysaccharide sind starke Stimulatoren der Mediatorkaskade sowie der inflammatorischen Antwort und beeinflussen die Synthese der Akute-Phase Proteine [Fenton et al. 1998], [Glauser et al. 1991]. Die Kinetik der positiven, wie auch der negativen Akute-Phase Proteine weist auf eine beträchtliche Entzündungsantwort bei den untersuchten Patienten hin. Die kausale Reaktionskette ist daher in sich logisch und die zeitliche Abfolge passend: Störung der Homöostase durch Trauma, Operation oder Erkrankung, mit dadurch ausgelöster Endotoxintranslokation, nachfolgend Stimulierung der Synthese und Freisetzung inflammatorischer Zytokine und dadurch wiederum bedingte Proteinsynthese der Akute-Phase. Allerdings ist nicht nur Endotoxin in der Lage, Zytokine freizusetzen. Auch andere Noxen wirken auf die Mediatorkaskade ein [Skinner et al. 2004]. Frost et al. beschreiben beispielsweise einen hemmenden Einfluss von Alkohol auf die Zytokinliberation (IL-6, Il-1β und TNFα) in verschiedenen Organgeweben von Tieren, wenn die LPS-Stimulierung kurz nach Alkoholeinfluss (nach 2h) auftritt [Frost et al. 2005]. Ono et al. stellten prä- und postoperative Unterschiede der Zytokinfreisetzung bei Mann und Frau fest. Die TNFα - und IL-10-Produktion von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs),

sowie die TLR2 und CD16-Expression war bei Frauen präoperativ höher als beim Mann. Es wurde eine exzessive Produktion von TNFα und eine unterdrückte IFN-Gamma-Produktion, sowie eine Abnahme der HLA-Expression auf PBMCs postoperativ häufiger beim Mann beobachtet. Das könnte für eine höhere Anfälligkeit für eine überschießende Entzündungsreaktion bei männlichen Patienten sprechen [Ono et al. 2005]. Der Organismus antwortet aber in allen Fällen uniform, nämlich mit einer Entzündung. Dadurch ist eine Korrelation zwischen dem Ausmaß einer Entzündung und den Konzentrationen der Akute-Phase Proteine nicht zwingend zu erwarten. Außerdem beeinflussen sich Zytokine und Akute-Phase Proteine gegenseitig. Die Endotoxintranslokation beeinflusst daher die Entzündungsreaktion im Organismus. Die Quantifizierung des Ausmaßes der Beeinflussung ist bisher aber nicht möglich.

### 4.1.4 Toll-like Rezeptoren

#### 4.1.4.1 Hintergrund

Toll-like Rezeptoren sind die Säugetier-Homolge der Toll-Rezeptoren von Drosophila [Supajatura et al. 2001]. Von allen bisher bekannten TLRs sind TLR2 und TLR4 in die durch LPS ausgelöste Signaltransduktion involviert.
In Säugetieren werden bakterielle Lipopolysaccharide über einen Komplex, bestehend aus CD14, TLR4 und MD2 erkannt [Calvano et al. 2003] [Fitzgerald et al. 2005]. LPS wird an LPB gebunden, interagiert mit CD14 und wird an den Ko-Rezeptor-Komplex TLR4/MD2 gebunden. Die Acyl-Kette von Lipid A interagiert mit dem hydrophoben Teil von MD2, was wiederum zu einer Kreuzreaktion von zwei TLR4/MD2-Komplexen führt [Gangloff et al. 2005], [Miyake 2004]. MD2 ist nicht relevant für die Bindung von LPS an TLR2 [Hyakushima et al. 2004]. Durch Toll-like-Rezeptoren wird eine Signaltransduktion über MyD88 ausgelöst und über eine Kaskade IRAKS, TRAF6 und NIK und letztendlich NF-kappaB aktiviert [Calvano et al. 2003], [Knuefermann et al. 2002].
Diese Signale führen letztendlich zu einer Zunahme der Expression einer Reihe inflammatorischer Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-8, sowie des kostimulierenden Moleküls B7.1, das zur Stimulierung naiver T-Zellen notwendig ist [O'Neill et al. 2003]. Eine ähnliche Kaskade wird über TLR2 durch grampositive Bakterien

ausgelöst [Calvano et al. 2003], [Knuefermann et al. 2002]. Die Mechanismen der Signaltransduktion sind analog der Toll-Rezeptoren von Drosophila komplex [Gangloff et al. 2005]. Die Rolle humaner TLRs bezüglich der LPS-Antwort wurde *in vitro* durch Transfektionssysteme untersucht. Es existieren bisher nur wenige *in vivo* Studien. Die verschiedenen Studien werden in den folgenden Abschnitten diskutiert.

#### 4.1.4.2 Änderung der mRNA-Expression von TLR2 und TLR4 bei operativen Eingriffen und Sepsis

Es existieren bereits einige Untersuchungen, die die LPS-induzierte Signaltransduktion via TLR2 und TLR4 *in vitro* demonstrieren, dagegen gibt es wenige *in vivo* Untersuchungen. Viele biologische Regelvorgänge werden durch Rückkopplung kontrolliert. Da die TLRs am Beginn der Signaltransduktion stehen und eine extrazelluläre Domäne besitzen, ist die Untersuchung der (patho- und physiologischen) Regulation nach LPS-Stimulation besonders interessant. Daher wurde in einer eigenen Untersuchung die mRNA-Expression von TLR2 und TLR4 perioperativ bei elektiven Abdominaloperationen und bei septischen Patienten untersucht, da hier eine Endotoxintranslokation vorausging. Aus dem Blut der Patienten wurden die mononukleären Zellen isoliert und die Expression der mRNA von TLR2 und TLR4 gemessen. Die Resultate zeigen, dass die Expression von TLR2 und TLR4 in den mononukleären Zellen elektiv operierter Patienten im wesentlichen unverändert war, obwohl eine Endotoxintranslokation stattgefunden hatte und zu einer deutlichen Endotoxinämie führte. Eine generelle Tendenz der Über- oder Minderexpression lag nicht vor. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit denen von Yang et al., denn sie berichteten, dass eine Stimulation von Makrophagen und Monozyten mit LPS *in vitro* eine vermehrte Expression der mRNA von TLR2 verursacht [Yang et al. 1998].
Wan et al. untersuchten die Gen-Expression LPS-bindender Rezeptoren nach LPS-Stimulation. Es kam zu einer erhöhten Gen-Expression von TLR2, TLR4, CD14 und LPS-bindendem Protein, sowie TNFα, gemessen mit RT-PCR in Milz-, Leber- und Lungengewebe [Wan et al. 2004].
Calvano et al. untersuchten mittels RT-PCR die Zell-Expression von TLR2, TLR4 und CD14 bei chirurgischen, intensivpflichtigen Patienten im Vergleich zu

gesunden Probanden. Zusätzlich wurde die Oberflächenexpression dieser Rezeptoren mittels FACS-Analyse bestimmt. Durch die Endotoxinämie kam es zu einer Zunahme der TLR4-mRNA-Expression, die TLR2-Expression war dagegen unverändert [Calvano et al. 2003].
Nach Auslösen einer peritonealen Sepsis bestimmten Yao et al. mit Hilfe der RT-PCR die Expression von TLR2 und TLR4 im Gewebe von Ratten. Es kam zu einem Anstieg der Expression von TLR2 und TLR4 nach zwei Stunden, mit einem Gipfel nach 6-12h. Nach 24h kam es zu einem Rückgang der Expression von TLR4, die TLR2-Expression war bis zu 72h nach dem Ereignis erhöht [Yao et al. 2004].
Skinner et al. stellten mittels FACS-Analyse fest, dass eine LPS-Stimulation von Vollblut zu einer Zunahme der TLR2-Rezeptoren nach 2h und zu einer Abnahme der TLR4-Expression auf Monozyten führt [Skinner et al. 2004].
Hopkins et al. erzielten unterschiedliche Ergebnisse mittels FACS-Analyse von peripheren weißen Blutzellen bei mit LPS stimulierten Blutproben. Wurden immunphänotypische Untersuchungsmethoden eingesetzt, hat man initial einen Rückgang von TLR2 und TLR4 beschrieben. Nach LPS-Stimulation beobachteten Hopkins et al. eine Stimulation der membranständigen TLR2- und TLR4-Rezeptoren [Hopkins et al. 2005].

#### 4.1.4.2.1 Aspekte, die bei der Interpretation der Unterschiede zwischen den Ergebnissen der o.g. Studien und den eigenen Untersuchungen zu berücksichtigen sind:

1. Unterschiedliche Untersuchungsmethoden: PCR und FACS-Analyse. Bei der PCR wird die mRNA im Zellkern gemessen, bei der FACS-Analyse wird die Oberflächenexpression der TLRs auf der Zelloberfläche gemessen. Man kann die beiden Methoden also nur bedingt vergleichen.

2. *In vitro* versus *in vivo* Untersuchungen: Die Endotoxinkonzentration kann bei *in vitro*-Untersuchungen beliebig gesteigert werden. Bei operierten Patienten war die Endotoxinkonzentration im Plasma wesentlich geringer. Es könnte daher sein, dass die *in vivo* möglichen Endotoxinkonzentrationen keine nennenswerten Unterschiede der Expression bewirken.

3. Die TLR-Expression unterschiedlicher Spezies wird untersucht, sodass genetisch bedingte Unterschiede der TLR-Expression vorliegen können.

4. Die Reaktion auf LPS über eine TLR-Aktivierung ist je nach Zellart different. Je nach Zelltyp gibt es unterschiedliche Wege die zur Aktivierung von NF-κB führen. In menschlichen Makrophagen scheint es Signalwege zu geben, die unabhängig von einer Aktivierung von MyD88, MAL/TIRAPund IKK2 sind, während in nicht myeloiden synovialen Fibroblasten MyD88 und MAL/TIRAP essentielle Adaptermoleküle der durch LPS ausgelösten Signale sind [Andreakos et al. 2004], [Sacre et al. 2004].
Marisk et al. zeigten, dass Neutrophile und Monozyten unterschiedliche TLRs exprimieren und dass die TLR-Regulation durch Endotoxinämie unterschiedlich beeinflußt wird [Marsik et al. 2003].
Dentritische Zellen zeigen in unterschiedlichen Reifestadien unterschiedliche TLR-mRNA-Muster, diese sind auch je nach Pathogen/LPS-Struktur verschieden [Kokkinopoulus et al. 2005].

5. Gewöhnliche Mutationen der TLR4-Gene verursachen interindividuelle Unterschiede in der Immun- und LPS-Antwort (Hyper-, Hyp- und Anergie).

6. Es wird eine Modulation der TLRs diskutiert. Nicht nur LPS, sondern auch TNFα und Il-6 haben die Eigenschaft, die Immunantwort über TLR4 zu regulieren [Tamandl et al. 2003]. Die mRNA-Expression von TLR4 beeinflusst die des TLR2 [Arbour et al. 2000]. Die Ursache ist der breite evolutionäre Druck der Mikroorganismen mit unterschiedlichen LPS-Strukturen [Smirnova et al. 2000]. Dies führte zu einer hohen Variabilität der extrazellulären TLR4 Domäne sowie einer Variabilität des carboxy-terminalen Endes der zytoplasmatischen Domäne [Smirnova et al. 2000].
Die breite Spezifität der TLRs ist wahrscheinlich die Konsequenz einer Interaktion zwischen den verschiedenen TLRs [Ozinsky et al. 2000], [Read et al. 2001].

7. Es existieren unterschiedliche Monozytenpopulationen mit unterschiedlicher Grundexpression von TLR2 und TLR4. TLR4 wurde 2.5 mal mehr auf CD14(dim)CD16(+)- im Vergleich zu CD14(dim)CD16(-)-Monozyten gefunden,

während die TLR2-Expression auf beiden Subpopulationen ähnlich war [Skinner et al. 2004].

8. Es gibt mutationsbedingte Veränderungen der signalübermittelnden Proteine mit daraus folgenden hemmenden oder stimulierenden Effekten auf die Entzündungsreaktion:
IRAK-M ist ein Negativ-Regulator der TLR-spezifischen Immunantwort [Knuefermann et al. 2002]. Es existieren zwei aktive Kinasen (IRAK und IRAK-4), sowie zwei inaktive Kinasen (IRAK-2 und IRAK-M). IRAK-M verhindert die Dissoziation von IRAK und IRAK-4 von MyD88 und die Bildung des IRAK-TRAF-Komplexes [Kobayashi et al. 2002]. Die Expression von IRAK-M ist begrenzt auf Monozyten und Makrophagen, während die anderen IRAKs ubiquitär vorkommen [Knuefermann et al. 2002]. Bei einem Fehlen von IRAK-M kommt es zu einer erhöhten Zytokinproduktion und zu einer signifikant erniedrigten Endotoxintoleranz [Kobayashi et al. 2002].
Weitere Modulatoren TLR-abhängiger Gene wurden bereits auf Seite 78 beschrieben (4.1.2.2.2 Modulation TLR-abhängiger Gene).
Letztendlich sind die Signaltransduktionswege damit komplex und können für interindividuelle Unterschiede verantwortlich sein, so auch für die differenten Ergebnisse der oben genannten und der eigenen Untersuchungen.

### 4.1.4.3 Änderung der mRNA-Expression von TLR2 und TLR4 bei septischen Erkrankungen

Patienten mit Sepsis unterscheiden sich von elektiv operierten Patienten, da sie eine Endotoxintoleranz aufweisen. Die Mechanismen der Endotoxintoleranz wurden schon unter 4.1.2.2.1 beschrieben (siehe Seite 77). Vor diesem Hintergrund erklären sich die Ergebnisse der eigenen Messungen der Expression der mRNA von TLR2 und TLR4 bei septischen Patienten, bei denen die mRNA-Expression stark supprimiert war. Dies deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen von Li et al. [Li et al. (2000)]. Sie konnten in THP1-Zellen (promonozytäre Zelllinie, die nach LPS-Exposition immunologisch wie humanes Vollblut und Neutrophile von septischen Patienten reagiert) bei septischen Patienten eine Erhöhung der endogenen IRAK messen. In endotoxintoleranten THP1-Zellen war die IRAK-Konzentration jedoch konstant niedrig, mit LPS nicht weiter stimulierbar und eine IRAK-Kinase-Aktivität nicht mehr nachweisbar [Li et al. (2000)]. Weiterhin reagiert IRAK mit MyD88 nach LPS-Exposition, aber in LPS-resistenten Zellen war diese Interaktion nicht mehr vorhanden [Li et al. (2000)]. MyD88 ist ein allgemeines Adapterprotein, das eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion der Toll/IL1-Rezeptor-Familie spielt. Es wurde gezeigt, dass MyD88-defiziente Mäuse nicht auf Endotoxin ansprechen, die Aktivität von NF-κB und der mitogen-aktivierenden Kinasen (MAP) ist aufgehoben, die Fähigkeit der Makrophagen Zytokine zu sezernieren ist verloren gegangen [Kawai et al. 1999].
Manigold et al. verglichen die Expression von TLR2 und von TLR4 in peripheren mononukleären Zellen (PBMC) (n=28) und Leberbiopsien (n=20) von Kontrollpersonen und von Personen mit Leberzirrhose mit Hilfe (der Technik) der Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion. Nach chronischer Endotoxinämie kam es zu einer Hochregulierung von TLR2 auf peripheren Monozyten und zu einer verminderte Expression von TLR4. Vermindertes Ansprechen auf LPS [Manigold et al. 2003].
Harter et al., Armstrong et al. und Brandl et al. bestimmten mittels FACS-Analyse bei septischen Patienten die TLR2 und TLR4-Oberflächenexpression auf Monozyten und Granulozyten. Die Oberflächenexpression von TLR2 und TLR4 wurde nach verschiedenen Zeitabständen mittels FACS-Analyse bestimmt, nachdem die Zellen mit spezifischen Antikörpern markiert wurden.

Bei Harter et al. war die TLR2- und -4-Expression bei Patienten mit Sepsis bei Neutrophilen und Monozyten erhöht. In der Kontrollgruppe war die Expression unverändert. Die Inkubation mit LPS (TLR4-Ligand) und MALP-2 (TLR2-Ligand) hatte keinen Effekt auf die TLR4- oder TLR2-Expression, weder bei den Patienten mit Sepsis, noch bei der Kontrollgruppe [Harter et al. 2004].
Armstrong et al. stellten eine erhöhte TLR2-Expression von Monozyten bei Patienten mit Gram-positiver und Gram-negativer Sepsis fest. Eine erhöhte TLR4-Expression wurde bei Patienten mit Gram-positiver Sepsis festgestellt, aber keine Erhöhung des TLR4-Proteins. *In vitro* konnte die mRNA-Expression der Monozyten durch Stimulation mit LPS oder IL-10 verändert werden. Bei septischen Patienten und bei der Kontrollgruppe kam es zu keiner Änderung der TLR2- und 4-Expression bei zusätzlicher Stimulation der Monozyten mit LPS oder IL-10 [Armstrong et al. 2004].
Brandl et al. führten eine *in vitro*-Bestimmung der Expression von TLR2 und -4 auf Monozyten basal und nach LPS-Stimulation (40 ng/ml) durch. Es wurden keine Veränderung der Expression von TLR2 auf Monozyten und Granulozyten zwischen Sepsis- und Kontrollgruppe festgestellt. Die Monozyten-Expression von TLR4 war bei septischen Patienten im Vergleich zu Gesunden erhöht, bei einer Kontrolle kein weiteres Ansprechen auf LPS, allerdings konnte nach zusätzlicher LPS-Stimulation eine weitere Zunahme von TLR4 auf der Zelloberfläche festgestellt werden. Im Gegensatz dazu, war die basale Expression von TLR4 auf Granulozyten bei septischen Patienten im Vergleich zu Gesunden erniedrigt und es gab keine Antwort auf eine zusätzliche LPS-Stimulation [Brandl et al. 2005].
Die vorliegenden Ergebnisse zeigen also, dass die Unfähigkeit der endotoxintoleranten Zellen, inflammatorische Zytokine, TLR2 und TLR4 zu exprimieren, zumindest zu einem Teil auf eine gestörte Regulation in der Signaltransduktion zurückzuführen ist. Eine wesentliche Rolle spielt dabei die IRAK-Kinase-Aktivität.
IRAK-1 scheint die zentrale Kinase zu sein, die Makrophagen im septischen Schock aktiviert. Es zeigen sich Auswirkungen auf die Zytokinproduktion bei systemischer LPS-Belastung [Cuschieri et al. 2004], [Li et al.(2000)].
Zusätzlich waren bei endotoxintoleranten Zellen auch proximal (upstream) der IRAK Unterbrechungen der Signalkaskade zu beobachten. So wurde bei LPS-toleranten Mäusen auf der Oberfläche von Makrophagen/Monozyten eine reduzierte Konzentration des TLR4-Rezeptors beschrieben [Nomura et al. 2000].

Der Syntheseabfall inflammatorischer Zytokine in toleranten Makrophagen korrelierte mit der Rezeptordichte der Oberflächenexpression von TLR4 und stellt ein Mechanismus der LPS-Toleranz dar. Die Abnahme der Rezeptordichte könnte auf einer Internalisierung und Degradation beruhen [Li et al. (2000)], [Nomura et al. (2000)].
Die Tatsache, dass die Endotoxintoleranz durch eine LPS-Behandlung schon nach 2-3 Stunden induziert werden konnte, lässt vermuten, dass die LPS-Toleranz, die bei septischen Patienten beobachtet wird, nicht nur von der TLR2 oder TLR4-Expression abhängt. Es müssen auch noch andere Mechanismen eine Rolle spielen [Harter et al. 2004], [Li et al. (2000)]. Eine Modulation der Leukozyten-TLRs könnte auch eine Bedeutung für die Endotoxintoleranz haben [Armstrong et al. 2004], [Brandl et al. 2005], [Calvano et al. 2003], [Harter et al. 2004], [Hopkins et al. 2005], [Manigold et al. 2003], [Marsik et al. 2003], [Skinner et al. 2004], [Viemann et al. 2005], [Yao et al. 2004]. Es wäre nicht überraschend, wenn eine Reihe verschiedener Veränderungen, einschließlich anderer LPS-Rezeptoren, sowie weitere intrazelluläre Prozesse an der Toleranzentwicklung beteiligt wären.

**<u>Zusammenfassung und Beantwortung der Fragestellung:</u> Änderung der mRNA Expression von TLR2 und TLR4 nach Endotoxintranslokation**

Die Expression der mRNA von TLR2 und TLR4 wird in den mononukleären Zellen des Blutes nach elektiven Operationen in der Abdominalhöhle nicht wesentlich beeinflusst. Bei Patienten mit einer Sepsis ist diese Expression aber stark reduziert. Diese Ergebnisse fügen sich in das Wissen über die Endotoxintoleranz ein: Während der Sepsis wird der Organismus permanent mit Endotoxin belastet. Auf eine erneute Exposition reagiert er abgeschwächt oder gar nicht mehr, er wird resistent. Auf molekularer Ebene ist im resistenten Zustand die durch LPS ausgelöste Signaltransduktion auf meheren Ebenen gestört/unterbrochen und führt zu einer verminderten Expression von TLR2 und TLR4. Die Endotoxintranslokation ist während einer elektiven Abdominaloperation für solche Veränderungen offensichtlich nicht ausreichend, wohl aber während einer Sepsis.

### 4.1.5 Änderung der prozentualen Zusammensetzung der peripheren Leukozytensubpopulationen postoperativ bei Patienten mit abdominalchirurgischen Operationen und bei Patienten mit Sepsis

Die Veränderung der prozentualen Zusammensetzung der peripheren Leukozyten wurde im Verlauf von prä- zu postoperativ untersucht.

Der mediane Anteil der Granulozytenpopulation stieg von präoperativ auf 2h postoperativ signifikant an. 24h und 48h postoperativ war der mediane prozentuale Anteil der Granulozytenpopulation immer noch signifikant erhöht (siehe Abb. 3-11, Seite 69).
Bei den Patienten mit Sepsis war der mediane prozentuale Anteil an Granulozyten im Vergleich zu gesunden Probanden bei der automatischen Messung signifikant erhöht. Dagegen konnte man bei der FACS-Analyse keinen signifikanten Unterschied feststellen (siehe Abb. 3-13, Seite 72).
Unsere Untersuchungsergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Harter et al. überein.
Sie beschreiben eine reduzierte Apoptose neutrophiler Granulozyten während der Sepsis, mit einer Zunahme des prozentualen Anteils neutrophiler Granulozyten im peripheren Blut und einer daraus resultierendenen überschießenden zerstörerischen Funktion dieser Zellen während der Entzündungsreaktion [Harter et al. 2002].

Dagegen sank der mediane Anteil der Lymphozytenpopulation bei beiden Messmethoden 2h postoperativ signifikant ab. Im weiteren Verlauf war der Lymphozytenanteil im Vergleich zu präoperativ immer noch signifikant niedriger (siehe Abb. 3-11, Seite 69).
Der mediane Lymphozytenanteil im peripheren Blut der Patienten mit Sepsis war im Vergleich zu den gesunden Probanden ebenfalls signifikant erniedrigt.
Weber et al. untersuchten die Bedeutung der Apoptose von Lymphozyten bei der Immunpathogenese der Sepsis. Sie versuchten den zeitlichen Verlauf mittels Durchflusszytometrie zu entschlüsseln. Einen Zusammenhang zwischen genetischer Prädisposition, Lymphozytenapoptose und Schweregrad der Sepsis schien möglich zu sein [Weber et al. 2004]. Wir stellten lediglich eine prozentuale

Abnahme der Lymphozytenpopulation fest. Ob dies auf eine zunehmende Apoptose dieser Zellen zurückzuführen ist konnte damit nicht bewiesen werden.

Die Monozytenpopulation wurde als Gesamtpopulation gemessen und mittels FACS-Analyse in zwei Gruppen unterteilt (Mono 1 und Mono 2).
Bei den operierten Patienten konnte man bei der automatischen Messung einen signifikanten Abfall der Gesamtpopulation 2h postoperativ feststellen. Nach 24h kam es wieder zu einem Anstieg des medianen prozentualen Anteils. Nach 48h war der mediane prozentuale Anteil annähernd unverändert.
Bei der Immunphänotypisierung mit der Antikörperkombination CD45/CD14 konnte gezeigt werden, dass die Monozytenpopulation ebenfalls signifikant abfiel. Die Ergebnisse waren mit denen der reinen Scatteranalyse (ohne Verwendung spezifischer Antikörper) weitgehend identisch (siehe Abb. 3-12, Seite 70).
Bei der ersten Population konnte kein signifikanter Unterschied im Verlauf festgestellt werden. Bei der zweiten Population kam es postoperativ zu einem signifikanten Abfall (siehe Abb. 3-12, Seite 70). Man nimmt an, dass der Abfall des relativen prozentualen Anteils der zweiten, größeren und reiferen Monozytenpopulation mit einem Abwandern ins Gewebe zusammenhängt. Es könnte auch sein, dass bei Stress die zweite Population durch Glucocorticoide induziert in Apoptose geht [Schmidt et al. 1999].
Bei den Patienten mit Sepsis war der Gesamtanteil der Monozytenpopulation im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. Sowohl bei der ersten Monozytenpopulation, als auch bei der zweiten Monozytenpopulation war der mediane prozentuale Anteil im Vergleich zur gesunden Gruppe signifikant erniedrigt.
Ein Verschwinden der Monozytenpopulation kann entweder durch eine Migration ins Gewebe, durch Apoptose oder durch eine Adhäsion an Granulozyten erklärt werden [Maier et al. 2005], [Toft et al. 1994]. Die reine Scatteranalyse mit Hilfe des Differentialblutbildes und die Scatteranalyse führen zu unterschiedlichen Ergebnissen, da die maschinelle Zellzählung sämtliche kernhaltige Zellen des peripheren Blutes, neben Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten also auch kernhaltige rote Vorstufen oder atypische kernhaltige Zellen erfasst. Für die Leukozytenzahl muss die eventuelle Zahl der roten Vorstufen und der atypischen Zellen subtrahiert werden. Bei der FACS-Scatteranalyse können die Ergebnisse variieren, da die graphische Eingrenzung markierter Leukozyten in einzelne

Populationen von der individuellen Einschätzung des Markierenden beeinflusst wird.

**<u>Beantwortung der Fragestellung:</u> Veränderung der prozentualen Zusammensetzung der peripheren Leukozytenpopulationen bei Patienten mit großen abdominalchirurgischen Eingriffen und bei Patienten mit Sepsis**

Nach einem Trauma und bei einer Sepsis kommt es zu einer Verschiebung der prozentualen Zusammensetzung der Leukozyten im peripheren Blut. Tendentiell kommt es zu einer Zunahme des relativen Anteils an Granulozyten, während es zu einer Verringerung des prozentualen Anteils an Lymphozyten und Monozyten kommt. Ausschlaggebend scheint dabei die Regulierung der Apoptose zu sein [Schmidt et al. 1999], [Weber et al. 2004].

## 5 Zusammenfassung

**Hintergrund:** Lipopolysaccharide (LPS) sind starke Stimulatoren der Entzündungsreaktion. Die durch LPS ausgelöste Signaltransduktion beginnt mit der Stimulation der Toll-Like Rezeptoren (TLR) an der Zelloberfläche (z.B. auf mononukleären Zellen), Zytokine werden freigesetzt und eine Akute Phase-Reaktion eingeleitet. Bei operativen Eingriffen und in der Sepsis kommt es zur Endotoxintranslokation und somit auch zu einer Stimulation der TLR. Nach wiederholter Endotoxinapplikation wurde aber eine Toleranz beobachtet, messbar an einer reduzierten Zytokinfreisetzungsfähigkeit nach erneuter Stimulation mit LPS. Auch eine negative Rückkopplung zur TLR-Expression wurde beschrieben.
**Ziele und Methodik:** Ziel der hier vorgelegten Arbeit war es die Kinetik der messenger (m)RNA Expression von TLR2 und TLR4, der Endotoxinämie, der Endotoxininaktivierungskapazität, der Plasmazytokinkonzentrationen von Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNFα), der Konzentrationen der Akute-Phase Proteine C-reaktives Protein (CRP), Haptoglobin, Alpha-1-Acid-Glycoprotein (AAG), Transferrin und Albumin sowie die Analyse der peripheren Leukozytensubpopulationen im Blut von 20 Patienten mit großen abdominalchirurgischen Operationen und von 20 Patienten mit Sepsis zu untersuchen und die Parameter untereinander zu korrelieren. Die Blutabnahme der operierten Patienten erfolgte präoperativ sowie postoperativ nach 2h, 24h und 48h. Zur Messung der mRNA-Expression der TLR wurde eine real-time PCR (Polymerasekettenreaktion) mit dem LightCycler etabliert. Die Plasmaendotoxinkonzentration und die Endotoxininaktivierungskapazität wurden mit dem Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL)-Test ermittelt. Die Zytokinplasmakonzentrationen wurden mittels ELISA (Enzym linked immune-sorbent assay) und die Plasmaspiegel der Akute-Phase Proteine nephelometrisch bestimmt. Die Differenzierung der peripheren Leukozytensubpopulationen erfolgte mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS). Das Signifikanzniveau lag bei $p<0,05$, eine nenneswerte Korrelation wurde bei $r<-0,5$ oder $r>0,5$ angenommen.
**Ergebnisse: 1.** Die mRNA-Expression von TLR2 und TLR4 war im Zustand der Sepsis bei 75% der Patienten reduziert. Dagegen wurde die mRNA-Expression durch die Endotoxintranslokation bei operativen Eingriffen nicht beeinflusst. **2.** Die mediane Endotoxinplasmakonzentration, die mediane Endotoxininaktivierungs-kapazität und die medianen Zytokinplasmakonzentrationen waren bei operierten Patienten bereits 2h postoperativ erhöht. Dagegen erfolgte ein signifikanter

Konzentrationsanstieg der positiven Akute-Phase Proteine und ein signifikanter Abfall der negativen Akute-Phase Proteine erst nach 24h. Die Endotoxinämie korrelierte temporär mit der Endotoxininaktivierungskapazität des Plasmas. Es konnte aber keine nennenswerte Beziehung zwischen der Endotoxinkonzentration im Plasma von operierten Patienten einerseits und den Zytokinkonzentrationen sowie den Konzentrationen der Akute-Phase Proteine andererseits festgestellt werden. Bei den septischen Patienten waren die basalen Zytokinkonzentrationen im Vergleich zu den Zytokinkonzentrationen gesunder Probanden signifikant höher, ebenso waren die Plasmakonzentrationen der positiven bzw. negativen Akute-Phase Proteine im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht bzw. erniedrigt. Die Zytokinfreisetzungsfähigkeit nach ex vivo Stimulation des Vollblutes mit LPS war 2h postoperativ signifikant erniedrigt (Toleranz-entwicklung). Bei septischen Patienten war die mediane Zytokinfreisetzung verglichen mit gesunden Probanden zwar auch erniedrigt, aber noch nicht signifikant. **3.** Operationen und Sepsis führten zu einer Veränderung der prozentualen Zusammensetzung der peripheren Leukozytenpopulationen. Unter septischen Bedingungen und postoperativ konnte man im peripheren Blut der Patienten eine Zunahme des relativen Anteils an Granulozyten feststellen, während es zu einer signifikanten Verringerung des prozentualen Anteils an mononukleären Zellen kam. **Interpretation: 1.** In der Literatur wurden in der durch TLR induzierten Signaltransduktionskette Elemente indentifiziert, die im Stadium der Toleranz für die gestörte Signalweiterleitung verantwortlich sind (z.B. eine Hemmung der IRAK (IL-1 receptor-associated)-Kinase-Aktivität.) **2.** Die temporäre Korrelation zwischen Endotoxinämie und Endotoxininaktivierungskapazität führten wir am ehesten auf eine Translokation aus dem Gastrointestinaltrakt zurück. Die erhöhten postoperativen Konzentrationen der Zytokine im Plasma waren eine schnelle Reaktion auf das operative Trauma. Auch andere Noxen können eine Entzündungsreaktion auslösen. Daher ist es schwierig zwischen der endotoxinbedingten und einer durch andere Effektormoleküle bedingten Wirkung zu differenzieren. In der Sepsis waren die Plasmakonzentrationen der Zytokine höher als bei Gesunden und es lag eine beträchtliche Akute Phase-Reaktion vor. Obwohl eine Toleranz in der Literatur beschrieben wurde, konnte in unserer Untersuchung eine Korrelation zur Endotoxinämie nicht nachgewiesen werden. **3.** Für die absolute und relative Leukopenie in der Sepsis und postoperativ werden Apoptose und eine Abwanderung der Zellen ins Gewebe diskutiert.

## 6 Literaturverzeichnis

**A**derem A, Ulevitch R J: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. Nature 406: 782-787 (2000)

Andreakos E, Sacre SM, Smith C, Lundberg A, Kinakidis S, Stonehouse T, Monaco C, Feldmann M, Foxwell BM: Distinct pathways of LPS-induced NF-kappa B activation and cytokine production in human myeloid and nonmyeloid cells defined by selective utilization of MyD88 and Mal/TIRAP. Blood 103: 2229-2237 (2004)

Akira S, Hoshino K, Kaisho T: The role of toll-like receptors and MyD88 in innate immunity. J Endotoxin Res 6: 383-387 (2000)

Arbour NC, Lorenz E, Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA: TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans. Nat Genet 25: 187-191 (2000)

Arcari P, Martinelli R, Salvatore F: The complete sequence of a full length cDNA for human liver glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: evidence for multiple mRNA species. Nucl Acids Res 12: 9179-9189 (1984)

Armstrong L, Medford AR, Hunter KJ, Uppington KM, Millar AB: Differential expression of Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 on monocytes in human sepsis. Clin Exp Immunol 136: 312-319 (2004)

Asanger M: Validierung des Limulustests. In: Scheer R (Hrsg) Der Limulustest, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, S. 61-74 (1989)

Axtelle T, Pribble J: IC14, a CD14 spezific monoclonal antibody, is a potential treatment for patients with severe sepsis. J Endotoxin Res. 7: 310-314 (2001)

**B**eger HG: Fieber. In: Beger HG, Kern E (Hrsg) Akutes Abdomen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 32-34 (1987).

Beger HG, Bittner R, Block S, Nevalaien T, Roscher R: Necrosectomy and postoperative local lavage in necrotizing pancreatitis. Br J Surg 75: 207-212 (1988)

Beger HG, Gögler H, Kraas E, Bittner R: Endotoxin bei bakterieller Peritonitis. Chirurg 52: 81-88 (1981)

Belvin MP, Anderson KV: A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway. Annu Rev Cell Dev Biol 12: 393-416 (1996)

Berger D, Balikcioglu S, Burmester G, Bölke E, Buttenschön K, Beger HG: Behaviour of Plasma Levels of Endotoxin and Calcium Binding Proteins of the S 100 Protein Family during postoperative Acute-phase Reaction and Peritonitis. Surg Res Comm 17: 277-285 (1995)

Berger D, Beger HG: Evidence for endotoxin-binding capacity of human Gc-globulin and transferrin. Clin Chim Acta 163: 289-299 (1987)

Berger D, Beger HG: Comparison of the endotoxin-binding capacity of human transferrrin and human applicable immunoglobulin preparation. Arzneimittelforsch 38: 817-820 (1988 a)

Berger D, Beger HG: Quantification of the endotoxin-binding capacity of human transferrrin. Prog Clin Biol Res 272: 115-124 (1988 b)

Berger D, Beger HG: Endotoxin binding proteins of human serum: Are there therapeutic implications? Surg Res Comm 8: 147-156 (1990)

Berger D, Beger HG: Interaction of endotoxin and endotoxin-binding proteins. Postgrad Gen Surg 3: 174-181 (1991)

Berger D, Beger HG: Neue Aspekte zur Pathogenese und Behandlung der Sepsis und des septischen Schocks. Chirurg 62: 783-788 (1991)

Berger D, Beger HD: Pathophysiologische Grundlagen der Peritonitistherapie. Chirurg 63: 147-152 (1992)

Berger D, Bölke E, Seidelmann M, Beger HG: Time–scale of interleukin-6, myeloid related proteins (MRP), C reactive protein (CRP), and endotoxin plasma levels during postoperative acute phase reaction. Shock 7: 422-426 (1997)

Berger D, Marzinzing E, Marzinzing M, Beger HG. Quantitative endotoxin determination in blood–chromogenic modification of the limulus amebocyte lysate test. Eur Surg Res 20: 128-136 (1988)

Berger D, Schleich S, Seidelmann M, Beger HG: Correlation between endotoxin-neutralizing capacity of human plasma as tested by the limulus-amebozyte lysate test and plasma protein levels. FEBS Lett 277: 33-36 (1990)

Beutler B, Hoebe K, Georgel P, Tabeta K, Du X: Genetiv analysis of innate immunity: identification and function of the TIR adapter proteins. Adv Exp Med Biol 560: 2-39 (2005)

Beutler B, Poltorak A: Positional cloning of LPS, and the general role of toll-like receptors in immune response. Eur Cytokine Netw 11: 143-152 (2000)

Beutler B, Poltorak A: Sepsis and evolution of the innate immune response. Crit Care Med 29: 2-7 (2001)

Beutler B: Toll-like receptors: how they work and what they do. Curr Opin Hematol 9: 2-10 (2002)

Beutler B: Innate immune response to microbial poisons: Discovery and Function of the Toll-like Receptors. Ann Rev Pharmacol Toxicol 43: 609-628 (2003 a)

Beutler B: Key inflammatory and stress pathways in critical illness- the central role of the Toll-like receptors. Crit Care 7: 39-46 (2003 b)

Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM:Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? Ann Surg 224: 647-664 (1996)

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RMH, Sibbald WJ: Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. Chest 101: 1644-1655 (1992)

Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA: Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. Chest 112: 235-243 (1997)

Burns K, Martinon F, Esslinger C, Pahl H, Schneider P, Bodmer JL, Di Marco F, French L, Tschopp J: MyD88, an adapter protein involved in interleukin-1 signaling. J Biol Chem 273: 122203-12209 (1998)

Buttenschoen K, Berger D, Hiki N, Strecker W, Seidelmann m, Beger HG: Plasma concentrations of endotoxin and antiendotoxin antibodies in patients with multiple injuries: a prospective clinical study. Eur J Surg 162: 853-860 (1996)

Buttenschoen K, Fleischmann W, Haupt U, Kinzl L, Carli Buttenschoen D: Translocation of Endotoxin and Acute-Phase Proteins in Malleolar Fractures. J Trauma 48: 241-245 (2000)

**C**alvano JE, Agnese DM, Um JY, Goshima M, Singhal R, Coyle SM, Reddell MT, Kumar A, Calvano SE, Lowry SF: Modulation of the lipopolysaccharide receptor complex (CD14, TLR4, MD-2) and toll-like receptor 2 in systemic inflammatory response syndrome-positive patients with and without infection: relationship to tolerance. Shock 20: 415-419 (2003)

Chretien S, Dubart A, Beaupain D, Raich N, Grandchamp B, Rosa J, Goossens M, Romeo PH: Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. Proc Natl Acad Sci USA 85: 6-10 (1988)

Cuschieri J, Bulmus V, Gourlay D, Garcia I, Hoffmann A, Stayton P, Maier RV: Modulation of macrophage responsiveness to lipopolysaccharide by IRAK-1 manipulation. Shock 21: 182-188 (2004)

**D**eitch EA: Gut Failure: Its Role in the Multiple Organ Failure Syndrome. In: Deitch EA (Hrsg) Multiple Organ Failure. Thieme, New York, 40-59 (1990 a)

Deitch EA: The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. Arch Surg 125: 403-404 (1990 b)

Deitch EA: Multiple Organ Failure. Pathophysiology and potential future therapy. Ann Surg 216: 117-134 (1992)

Deitch EA, Morrison J, Berg R, Spezian RD: Effect of haemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology, and intestinal permeability in conventional and antibiotic-decontaminated rats. Crit Care Med 18: 529-536 (1990)

Dinarello CA: Proinflammatory cytokines. Chest 118: 503-508 (2000)

Diks SH, van Deventer SJ, Peppelenbosch MP: Lipopolysaccharide recognition, internalisation, signalling and other cellular effects. J Endotoxin Res 7: 335-348 (2001)

Du X, Poltorak A, Wie Y, Beutler B: Three novel mammilian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. Eur Cytokine Netw 11: 362-371 (2000)

**F**attori E, Cappelletti M, Costa P, Sellitto C, Cantoni L, Carelli M, Faggioni R, Fantuzzi G, Ghezzi P, Poli V: Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. J Exp Med 180: 1243-1250 (1994)

Fenton MJ, Golenbock DT: LPS-binding proteins and receptors. J Leukoc Biol 64: 25-32 (1998)

Finke J, Fritzen R, Ternes P, Lange W, Dolken G: An improved strategy and a useful housekeeping gene for RNA analysis from formalin fixed, paraffin-embedded tissues by PCR. Biotechniques 14: 448-453 (1993)

Fisher CJ, Opal SM, Dhainaut JF, Stephens S, Zimmermann JL, Nightingale P, Harris SJ, Schein RM, Panacek EA: Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. Crit Care Med 21: 318-327 (1995)

Fitzgerald KA, Rowe DC, Golenbock DT: Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. Microb Infect 6: 1361-1367 (2004)

Frost RA, Nystrom G, Burrows PV, Lang CH: Temporal differences in the ability of ethanol to modulate endotoxin-induced increases in inflammatory cytokines in muscle under in vivo conditiones. Alcoholism: Clin Exp Res 29: 1247-1256 (2005)

Fournier T, Medjoubi N, Porquet D: Alpha-1-acid glycoprotein. Biochim Biophys Acta 1482: 157-171 (2000)

Fukui H, Matsumoto M, Tsujita S, Takaya A, Kojima H, Matsumura M, Tsujii T: Plasma endotoxin concentration and endotoxin binding capacity of plasma acute phase proteins in cirrhotics with variceal bleeding: an analysis by new methods. J Gastroenterol Hepatol 9: 582-586 (1994)

**G**abay C, Kushner I: Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. N Engl J Med 164: 1407-1421 (1999)

Gangloff M, Gay NJ: MD-2: the Toll ‘gatekeeper’ in endotoxin signalling.Trends Biochemical Sci 29: 294-300 (2004)

Gangloff M, Weber AN, Gay NJ: Conserved mechanisms of signal transduction by toll and toll-like receptors. J Endotoxin Res 11: 294-298 (2005)

Gauldie J, Richards C, Harnish D, Lansdorp P, Baumann H: Interferon Beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7251-7255 (1987)

Glauser MP, Zanetti G, Baumgartner JD, Cohen J: Septic shock: pathogenesis. Lancet 338: 732-736 (1991)

Grunwald U, Krüger C, Schütt C: Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14 is a highly conserved specific function. Circ Shock 39: 220-225 (1993)

**H**arter L, Keel M, Steckholzer U, Ungethuem U, Trentz O, Ertel W: Activation of mitogen-activated protein kinases during granulocyte apoptosis in patients with severe sepsis. Shock 18: 401-406 (2002)

Harter L, Mica L, Stocker R, Trentz O, Keel M: Increased expression of toll-like receptor-2 and -4 on leukocytes from patients with sepsis. Shock 22: 403-409 (2004)

Hiki N, Berger D, Buttenschoen K, Boelke E, Seidelmann M, Strecker W, Kinzl L, Beger HG: Endotoxemia and specific antibody behaviour against different endotoxins following multiple injuries. J Trauma 38: 794-801 (1995)

Hopkins P, Cohen J: Toll-like receptors: the key to the stable door?
Crit Care 6: 99-101 (2002)

Holzmann B, Weighart H, Heidecke C: Rezeptoren und Signalproteine des angeborenen Immunsystems als neue Zielstrukturen der Sepsistherapie. Reprogrammierung der Immunantwort. Chirurg 74: 61-66 (2003)

Hopkins PA, Fraser JD, Pridmore AC, Russell HH, Read RC, Sriskandan S: Superantigen recognition by HLA class II on monocytes up-regulates toll-like receptor 4 and enhances proinflammatory responses to endotoxin. Blood 105: 3655-3662 (2005)

Hubacek JA, Stuber F, Frohlich D, Book M, Wetegrove S, Rothe G, Schmitz G: The common functional C(-159)T polymorphism within the promoter region of the lipopolysaccharide receptor CD14 is not associated with sepsis developement or mortality. Genes Immun 1: 405-407 (2000)

Huyakushima N, Mitsuzawa H, Nishitani C, Sano H, Kuronuma K, Konishi M, Himi T, Miyake K, Kuroki Y: Interaction of soluble form of recombinant extracellular TLR4 domain with MD-2 enabels lipopolysaccharide binding and attenuates TLR4-mediatd signaling. J Immunol 173: 6949-6954 (2004)

**I**liev DB, Roach JC, Mackanzie S, Planas JV, Goetz FW: Endotoxin recognition: in fish or not in fish? FEBS Letters 579: 6519-6528 (2005)

Imler JL, Tauszig S, Jouanguy E, Forestier C, Hoffmann J A: LPS-induced immmune response in Drosophila. J Endotoxin Res 6: 459-462 (2000)

Ingalls RR, Lien E, Golenbock DT: Differential roles of TLR2 and TLR4 in the host response to Gram-negative bacteria: lessons from a lipopolysaccharide-deficient mutant of Neisseria meningitidis. J Endotoxin Res 6: 411-415 (2000)

**K**awai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S: Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. Immunity 11:115-122 (1999)

Kobayashi K, Hernandez LD, Gala JE, Janeway CA Jr., Medzhitov R, Flavell RA: IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. Cell 110: 191-202 (2002)

Knapp S, Branger J, van der Poll T: Advances in research of the in-flammatory response: the importance of toll-like receptors. Wien Med Wochenschr 152: 552-554 (2002)

Knuefermann P, Nemeto S, Baumgarten G, Misra A, Sivasubramanian N, Carabello BA, Vallejo JG: Cardiac inflammation and innate immunity in septic shock: is there a role for toll-like receptors? Chest 121: 1329-1336 (2002)

Kobayashi K, Hernandez LD, Galan JE, Janeway CA Jr., Medzhitov R, Flavell RA: IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signalling. Cell 110: 191-202 (2002)

Kokkinopouluos I, Jordan WJ, Ritter MA: Toll-like receptor mRNA expression patterns in human dentritic cells and monocytes. Mol Immunol 42: 957-968 (2005)

Kokuba Y, Nakao A, Takagi H: Changes in the blood endotoxin concentration after digestive surgery. Surg Today 23: 100-104 (1993)

Kuwata H, Matsumoto M, Atarashi K, Hirotani T, Koga R, Takeda K: Ikappa BNS inhibits induction of a subset of Toll-like receptor dependent genes and limits inflammation. Immunity 24: 41-51 (2006)

**L**andmann R, Muller B, Zimmerli W: CD14, new aspects of ligand and signal diversity. Microbe Infect 2: 295-304 (2000)

LaRue KE, McCall CE: A labile transcriptional repressor modulates endotoxin tolerance. J Exp Med 180: 2269-2275 (1994)

Lien E, Ingalls RR: Toll-like receptors. Crit Care Med 30: S1-11 (2002)

Liew FY, Liu H, Xu D: A novel negative regulator for IL-1 receptor and toll-like receptor 4. Immunol Lett 96: 27-31 (2005)

Li L, Cousart S, Hu J, McCall CE: Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. J Biol Chem 275: 23340-23345 (2000)

Maier S, Traeger T, Westerholt A, Heidecke CD: Besonderheiten der abdominellen Sepsis. Chirurg 76: 829-836 (2005)

**M**anigold T, Bocker U, Hanck C, Gundt J, Traber P, Antoni C, Rossol S: Differential expression of toll-like receptors 2 and 4 in patients with liver cirrhoses. Eur J Gastroenterol Hepatol 15: 275-282 (2003)

Manocha S, Feinstein D, Kumar A: Novel therapies for sepsis: antiendotoxin therapies. Ex Op Invest Drugs 11: 1795-1812 (2002)

Marisk C, Mayr F, Cardona F, Derhaschnig U, Wagner O F, Jilma B: Endotoxinaemia modulates Toll-like receptors on leucocytes in humans. Br J Haematol 121: 653-656 (2003)

Martin M, Rehani K, Jope RS, Michalek SM: Toll-like receptor mediated cytokin production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. Nat Rev Immunol 6: 777-784 (2005)

Maruna P, Gurlich R, Frasko R, Chakhiani I, Marunova M, Owen K, Peskova M: Cytokines and soluble cytokine receptors in the perioperative period. Sb Lek 103: 1037-1043 (2002)

McCall CE, Grosso-Wilmoth LM, LaRue K, Guzmann RN, Cousart SL: Tolerance to endotoxin-induced expression of the interleukin beta gene in blood neutrophils of humans with the sepsis syndrome. J Clin Invest 91: 853-861 (1993)

McCartney-Francis N, Jin W, Wahl SM: Aberrant Toll receptor expression and endotoxin hypersensitivity in mice lacking a functional TGF-beta 1 signaling pathway. J Immunol 172: 3814-3821 (2004)

Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee: American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapie in sepsis. Crit Care Med 20: 864-874 (1992)

Mensink E, van de LA, Schattenberg A, Linders E, Schaap N, Geurts vK, De Witte T: Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. Br J Haematol 102: 768-774 (1998)

Miyake K: Endotoxin recognition molecules MD-2 and toll-like receptor 4 as potential targets for therapeutic intervention of endotxin shock. Curr Drug Targ Inflamm Allerg 3: 291-297 (2004)

Morley JJ, Kushner I: Serum C-reactive protein levels in disease. Ann N Y Acad Sci 389: 406-418 (1982)

Muller-Decker K, Manigold G, Butz H, Hinz DE, Huttner D, Richter KH, Tremmel M, Weissflog R, Marks F: Inhibition of cell proliferation by bacterial lipopolysaccharides in TLR-4 positive epithelial cells: independence of nitric oxide and cytokine release. J Invest Dermatol 124: 53-61 (2005)

Murphy JE, Robert C, Kupper TS: Interleukin-1 and cutaneus inflammation: a crucial link between innate and acquired immunity. J Invest Dermatol 114: 602-608 (2000)

Muzio M, Mantovani A: Toll-like receptors (TLRs) signalling and expression pattern. J Endotoxin Res 7: 297-300 (2001)

**N**aik S, Kelly EJ, Meijer L, Pettersson S, Sanderson IR: Absence of Toll-like receptor 4 explains endotoxin hyporesponsiveness in human intestinal epithelium. J Pediatr Gastroenterol Nutr 32: 449-453 (2001)

Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K: Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. J Immunol 164: 3476-3479 (2000)

Novotny A, Emmanuel K, Bartels H, Siewert JR, Holzmann B: Parameter der frühen Prädiktion des Sepsisverlaufs. Chirurg 76: 837-844 (2005)

Novitzky TJ: Limulus amobecyte lysate (LAL) detection of endotoxin in human blood. Endotoxin Res 1: 253-263 (1994)

Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC, Beger HG: Leukocytes, the Janus cells in inflammatory disease. Langenbecks Arch Surg 384: 222-232 (1999)

**O**lofsson P, Olofsson C, Nylander G, Olsson P: Endotoxin Inactivation in Plasma from Septic Patients: An In Vitro Study. World J Surg 10: 318-323 (1986)

ONeil LA, Dunne A, Edjeback M, Gray P, Jefferies C, Wietek C: Mal and MyD88: adapter proteins involved in signal transduction by Toll-like receptors. J Endotoxin Res 9: 55-59 (2003)

ONeil LA, Greene C: Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects and plants. J Leukoc Biol 63: 650-657 (1998)

Ono S, Tsujimoto H, Takahata R, Kinoshita M, Mochizuki H: Sex differences in cytokine production and surface antigen expression of peripheral blood mononuclear cells afte surgery. Am J Surg 190: 439-444 (2005)

Ozinsky A, Smith KD, Hume D, Underhill DM: Co-operative induction of pro-inflammatory signaling by Toll-like receptors. J Endotoxin Res 6: 393-396 (2000)

**P**rimer3 Output, NHI. http://www.genome.wi.mit.edu

**Q**ureshi ST, Gros P, Malo D: The Lps locus: genetic regulation of host responses to bacterial lipopolysaccharide. Inflamm Res 48: 613-620.

**R**affael A, Nebe CTH, Valet G: Grundlagen der Durchflußzytometrie.
In: Schmitz G, Rothe G (Eds) Durchflußzytometrie in der Klinischen Diagnostik, Stuttgart, S. 3-49 (1994)

Read RC, Wyllie DH: Toll receptors and sepsis. Curr Opin Crit Care 7: 371-375 (2001)

Revelly JP, Ayuse T, Brienza N, Fessler HE, Robotham JL: Endotoxic shock alters distribution of blood flow within the intestinal wall. Crit Care Med 24: 1345-1351 (1996)

Rietschel ET: Lipopolysaccharide, die Endotoxine und O-Antigene gramnegativer Bakterien: Chemische Struktur, biologische Wirkung und serologische Eigenschaften. Infection 15: 55-133-63/141 (1987)

Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Muller LS, Mamat U, Zahringer U, Beckmann F, Seydel U, Brandenburg K: Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. Curr Top Microbiol Immunol 216: 39-81 (1996)

Rietschel ET, Kinikae T, Schade FU, Ulmer AJ, Holst O, Brade H, Schmidt G, Mamat U, Grimmecke HD, Kusumoto S: The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. Immunobiology 187: 169-190 (1993)

Rietschel ET, Schade U, Jensen M, Wollenweber HW, Lüderitz O, Greismann SG: Bacterial endotoxins: Chemical Structure, Biological Activity and Role in Septicaemia. Scand J Infect Dis Suppl 31: 8-21 (1982)

Rietschel ET, Seydel U, Zähringer U, Schade UF, Brade L, Loppnow H, Feist W, Wang MH, Ulmer AJ, Flad HD: Bacterial endotoxin: molecular relationships between structure and activity. Infect Dis Clin Am 5: 753-779 (1991)

Roche Diagnostics: LightCycler Operator's Manual Version 3.0 Mannheim (1999)

Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF: A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc Natl Acad Sci USA 95: 588-593 (1998)

Riordan SM, Skinner N, Nagree A, McCallum H, McIver CJ, Kurtovic J, Hamilton JA, Bengmark S, Wiliams R, Visvanathan K: Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis. Hepatology 37: 1154-1164 (2003)

Romics L Jr, Frendl G, Szabo G: Orvosi Hetilap 144: 499-506 (2003)

Roumen RMH, Hendriks T, van-der-Ven JJ, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW, van-der-Ven MJ, Goris RJ: Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. Ann Surg 218: 769-776 (1993)

**S**acre SM, Andreakos E, Feldmann M, Foxwell BM:
Endotoxin signaling in human macrophages: signaling via an alternative mechanism. J Endotoxin Res 10: 445-452 (2004)

Schippers EF, van ‘t Veer C, van Voorden S, Martina CA, le Cessie S, van Dissel JT: TNF-alpha promoter, Nod2 and toll-like receptor-4 polymorphisms and the in vivo response to endotoxin. Cytokine 26: 16-24 (2004)

Schmidt M, Pauels HG, Lügering N, Domschke W, Kucharzik T: Glucocorticoids Induce Apoptosis in Human Monocytes: Potential Role of IL-1β. J Immunol 163: 3484-3490 (1999)

Schumann RR: Lösliche, membranständige und intrazelluläre LPS-Rezeptoren. Clin Immunol 4: 12-38 (1995)

Schumann RR: Endotoxin-bindende Proteine: neue Ansätze der Sepsisbehandlung. Die gelben Hefte 37: 55-64 (1997)

Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ: Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. Science 249: 1429-1431 (1990)

Schuster JM, Nelson PS: Toll-receptors: an expanding role in our understanding of human disease. J Leukoc Biol 67: 767-773 (2000)

Sequences results version BLASTN 2.0.9. http://www.ncbi.nlm.nih.gov

Skinner NA, MacIsaac CM, Hamilton JA, Visvanthan K: Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14dimCD16+ monocyts in response to sepsis related antigens. Clin Exp Immunol 141: 270-278 (2005)

Smirnova I, Poltorak A, Chan EK, McBride C, Beutler B: Phylogenetic variation and polymorphism at the toll-like receptor 4 locus (TLR4). Genome Biol 1: 1-10 (2000)

Sugawara S, Uehara A, Tamai R, Takada H: Innate immune response in oral mucosa. J Endotoxin Res 8: 465-468 (2002)

Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ogawa H: Protective role of mast cells against enterobacterial infection are mediated by toll-like receptor 4. J Immunol 167: 2250-2256 (2001)

Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Akira S, Okumura K, Ogawa H: Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. J Clin Invest 109: 1351-1359 (2002)

**T**amandl D, Baharimi B, Wessner B, Weigel G, Ploder M, Furst W, Roth E, Boltz-Nitulescu G, Spittler A: Modulation of toll-like receptor 4 expression on human monocytes by tumor necrosis factor and interleukin-6: tumor necrosis factor evokes lipopolysaccharide responsiveness, whereas interleukin-6 enhances lipopolysaccharide activity. Shock 20: 224-229 (2003)

Takeda K, Takeuchi O, Akira S: Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. J Endotoxin Res 8: 459-463 (2002)

Tilg H, Vannier E, Vachino G, Dinarello CA, Mier JW: Antiinflammatory properties of hepatic acute phase proteins: preferential induction of interleukin 1 (IL-1) receptor antagonist over IL-1 beta synthesis by human peripheral blood mononuclear cells. J Exp Med 178: 1629-1636 (1993)

Tobias PS, Soldau K, Iovine NM, Elsbach P, Weiss J: Lipopolysaccharide (LPS)-binding proteins BPI and LBP from different types of complexes with LPS. J Biol Chem 272: 18682-18685 (1997)

Toft P, Dagnaes-Hansen F, Petersen MS: Influence of surgery and endotoxin-induced sepsis combined on natural killer cell activiy, oxidative burst of granulocytes and antigen presentation capability of monocytes. Acta Anaesthesiol Scand 46: 405-410 (2002)

Toft P, Lillevang ST, Tonnesen E, Nielsen CH, Rasmussen JW: The redistribution of granulocytes following E.coli endotoxin induced sepsis. Acta Anaesthesiol Scand 38: 852-857 (1994)

Triantafilou M, Triantafilou K: Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. Trends Immunol 23: 301-304 (2002)

**V**asilescu C, Berger D, Buttenschoen K, Beger HG: Muster der Zytokinfreisetzung während der Sepsis und der postoperativen Akute-Phase-Reaktion. Langenbecks Arch Chir Suppl : 247-251 (1994)

Vasilescu C, Berger D, Buttenschoen K, Seidelmann M, Beger HG: Endotoxin-Induced Release of Interleukin-6 and Interleukin-1beta in Human Blood is Independent of Tumor Necrosis Factor Alpha. Eur Surg Res 28: 55-62 (1996)

Venet C, Zeni F, Viallon A, Ross A, Pain P, Gery P, Page D, Vermesch R, Bertrand M, Rancon F: Endotoxaemia in patients with sepsis or septic shock. Intensive Care Med 26: 538-544 (2000)

Volanakis JE: Acute phase proteins in rheumatic disease. In: Koopmann WJ (Hrsg) Arthritis and allied conditions: a textbook of rheumatology. Williams & Wilkins, Baltimore, 505-514 (1997)

**W**an X, Wang PX, Zhou L, Xiang Q: Gene expression of toll-like receptors in the liver, lungs, and spleen in mice after endotoxin challenge. Chinese (2004)

Wang SY, Mak KL, Chen LY, Chou MP,Ho CK: Heterogeneity of human blood monocyte: two subpopulations with different sizes, phenotypes and functions. Immunology: 77: 298-303 (1992)

Weber SU, Schewe JC, Putensen C, Stuber F, Schroder S: Apoptose als Pathomechanismus in der Sepsis. Anaesthesist 53 (2004)

Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z: MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. Immunity 7: 837-847 (1997)

Westphal O, Lüderitz O: Chemische Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. Angew Chem 66: 407-417 (1954)

Wortel CH, Van Deventer SJH, Aarden LA, Lygidakis NJ, Buller HR, Hoek FJ, Horikx J, Ten Cate JW: Interleukin-6 mediates host defense responses induced by abdominal surgery. Surgery 114: 564-570 (1993)

**Y**ang RB, Mark MR, Gray A, Huang A, Xie MH, Zhang M, Goddard A, Wood WI, Gurney AL, Godowski PJ: Toll-like receptor 2 mediates lipopolyssacharide-induced cellular signalling. Nature 395: 284-288 (1998)

Yao YM, Yan XJ, Yao FH, Cheng MH, Dong N, Sheng ZY: Changes in Toll-like receptor 2 and 4 gene expression in vital organs in septic rats and their regulation mechanisms. Chinese Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Xue/Chinese Crit Care Med/Zhongguo Weizhongbing Jijiuixue 15: 646-650 (2003)

**Z**hang G, Gosh S: Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Toll-like receptors. J Endotoxin Res 6: 453-457 (2000)

Zhang G, Gosh S Toll-like receptors-mediated NF-κB-activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. J Clin Invest 107 (2001)

Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Xue/Chinese Crit Care Med/Zhongguo Weizhongbing Jijiuixue 16: 73-76

**Danksagung**

Meinem Doktorvater Herrn Privatdozent Doktor Klaus Buttenschön danke ich sehr für die besonders engagierte und intensive Betreuung meiner Arbeit.
Ich danke Frau Doktor Daniela Carli Buttenschön, die mir bei den Untersuchungen mit Rat und Tat zur Seite stand, Frau Manuela Seidelmann, die ebenfalls tatkräftig an den Untersuchungen mitgewirkt hat, sowie den Ärzten und dem Pflegepersonal der Abteilung für Visceralchirurgie, die mir ein problemloses Sammeln der Proben ermöglichten.
Frau Professor Marion Schneider danke ich für die Unterstützung im Bereich der Durchflusszytometrie ((FACS)-Analyse), die ich in der Sektion Experimentelle Anästhesiologie durchführen durfte.
Meiner Familie und meinem Freund Herrn Doktor Heiko Petersen danke ich für ihr Verständnis für meine Arbeit und für ihre stetige Unterstützung.