

Chirurgische Klinik und Poliklinik
der Technischen Universität München Klinikum
rechts der Isar
(Direktor: Univ.- Prof. Dr. J.R. Siewert)

Einfluß von Stickoxid (NO) auf die Proliferation von Knochenmarkszellen im Sepsismodel der Maus

Sebastian Karl Rogenhofer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. B. Holzmann
2. Priv.- Doz. Dr. H. Bernhard

Die Dissertation wurde am 04.11.2002 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 09.04.2003 angenommen.

1 Inhaltsverzeichnis

1	INHALTSVERZEICHNIS	1
2	EINLEITUNG	3
2.1	SEPSIS	3
2.1.1	Sepsis: Der epidemiologische Hintergrund	4
2.1.2	Definitionen der Sepsis	5
2.1.3	Vorkommen	7
2.1.4	Resistenzen	8
2.1.5	Pathophysiologie der Sepsis	9
2.1.6	Die hämodynamische Entwicklung	18
2.1.7	Klinik der Sepsis	20
2.1.8	Therapie der Sepsis	21
2.1.9	Tierexperimentelle Sepsis-Modelle	23
2.2	KNOCHENMARK	26
2.2.1	Hämatopoese	26
2.2.2	Zellzyklus	28
2.2.3	Stammzelle	30
2.2.4	Regulation der Knochenmarksproliferation	32
2.2.5	Regulationsmechanismen der Hämatopoese	34
2.2.6	Kolonie- stimulierende Faktoren (CSF)	35
2.2.7	Wachstumsfaktoren und Inflammatorische Prozesse	37
2.2.8	Apoptose	38
2.3	Stickstoffmonoxid (NO)	40
2.3.1	Konstitutionelle und induzierbare NO- Synthese	40
2.3.2	NO Synthese	41
2.3.3	Regulation der iNOS	43
2.3.4	Die biologischen Wirkung von Stickoxid	45
2.3.5	Stickstoffmonoxid Wirkungen in der Sepsis	47
2.3.6	Stickoxid und seine kardiale Funktion im Rahmen der Sepsis	49
3	MATERIAL UND METHODIK	50
3.1	Materialliste und Bezugsquellen	50
3.1.1	Versuchstiere	50
3.1.2	Meßgeräte und technisches Equipment	50
3.1.3	Chemikalien und Enzyme	51
3.1.4	Zytokine und Toxine zur Stimulation	52
3.1.5	Kulturmedium und Puffer	52
3.1.6	Wasch- und Arbeitspuffer	53
3.1.7	Grundprinzip der Durchflußzytometrie	53

3.2	Methodik	55
3.2.1	OP	55
3.2.2	Colon - Ascendens - Stent - Peritonitis (CASP)	55
3.2.3	Zell - Reinigung	56
3.2.4	Zellzählung	56
3.2.5	Anlage der Zellkultur	57
3.2.6	Zellgewinnung aus der Gewebekulturplatte	58
3.2.7	Bestimmung der Proliferation mit BrdU	59
3.2.8	Messung mit der Durchflußzytometrie	61
3.2.9	Nitritbestimmung / NO- Synthese	63
3.2.10	Nitritbestimmung bei CASP- Mäusen	64
3.2.11	Stimulation der endogenen NO-Synthese	64
3.2.12	CFU	64
3.2.13	Cytospin	65
4	ERGEBNISSE	66
4.1	Proliferation frisch entnommener Knochenmarkszellen, (48 h Kultur ohne Behandlung, GM - CSF, G - CSF)	66
4.2	Proliferation stimulierter Knochenmarkszellen (IL 1β, TNF α, IFN γ und LPS im Vergleich zu GM – CSF, IL 1β , TNF α, IFN γ und LPS)	68
4.2.1	IL 1 β (0,5ng/ml), TNF α (500 U/ml), IFN γ (200 U/ml) und LPS (10 g/ml)	68
4.2.2	Die durch GM - CSF bedingte Steigerung der Proliferationsrate wurde dosisabhängig durch die Kombination von IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS supprimiert	70
4.2.3	Die Proliferations-suppression durch IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS ließ sich mit N - Methyl - L - Arginin (NMA) antagonisieren.	71
4.2.4	Antagonisierung des Proliferationssteigernden Effekts von N- Methyl- L-Arginin (NMA) durch L-Arginin	73
4.2.5	Die exogene NO - Exposition durch S-Nitroso-Acetylpenicillamin (SNAP) hebt die durch GM - CSF induzierte Poliferationssteigerung auf	75
4.3	Auswirkungen der Stickoxid-Biosynthese auf die Proliferation von Knochenmarkszellen	78
4.3.1	Durch das Zytokin-LPS-Gemisches (IL-1 β 0,5ng/ml, TNF- α 500U/ml, IFN- γ 200U/ml, LPS 10 g/ml) wurde die Stickoxid - Biosynthese dosisabhängig induziert.	78
4.3.2	Die Induktion der Stickoxid - Synthese durch das Zytokin-LPS-Gemisch (IL-1 β 0,5ng/ml, TNF- α 500U/ml, IFN- γ 200U/ml, LPS 10 g/ml) ließ sich durch NMA hemmen und durch L - Arginin wieder herstellen.	80
4.4	Der Einfluß der durch das CASP- Modell induzierten Peritonitis auf die Proliferation von Knochenmarkszellen	82
4.4.1	Die durch das CASP- Modell induzierte Peritonitis führte zu einer Erhöhung der Proliferationsrate im Knochenmark	82
4.4.2	CASP und Kontrolle	83
4.4.3	Die Proliferationsrate ließ sich bei CASP- Mäusen durch GM - CSF in geringerem Maße stimulieren als bei unbehandelten Mäusen.	84
4.4.4	Die Knochenmarkszellen der sham- operierten Tiere zeigen durchwegs eine geringere Proliferationsrate im Vergleich mit CASP- Mäusen	86
4.4.5	Colony forming units (CFU)	88
5	DISKUSSION	90
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	LITERATURVERZEICHNIS	100

2 Einleitung

2.1 SEPSIS

Bakterielle Infektionen stellen auch heute noch eine große Bedrohung für die menschliche Gesundheit dar. Schwere Sepsis und septischer Schock sind dabei die schwerwiegendste Form der bakteriellen Infektion.

Grampositive wie gramnegative Bakterien können diese entzündliche Reaktion in Gang setzen und so eine erhebliche Morbidität und Mortalität verursachen.

Das Krankheitsbild der Sepsis zeigt eine zunehmende Inzidenz. Ursächlich anzusehen sind die steigende Lebenserwartung der Gesamtbevölkerung, die deutliche Zunahme der Überlebenszeit chronisch kranker Patienten, die relative Häufigkeit der Sepsis bei AIDS, die Zunahme der Antibiotikatherapie, die Gabe von Glucocorticoiden, die Verwendung mechanischer Implantate und die verbesserten Möglichkeiten der maschinellen Beatmung. Allein in den Vereinigten Staaten erleiden jedes Jahr 500 000 Patienten eine Sepsis, wobei nahezu 175 000 dieser Patienten trotz optimaler Intensivversorgung und moderner antibiotischer Therapie versterben.

Heute leben wir in einer Zeit, in der die Resistenz der Bakterien gegen Chemotherapeutika und Antibiotika zunimmt und immunsupprimierte Patienten häufiger werden, so daß mikrobielle Krankheitserreger noch mehr Möglichkeiten haben, sich durchzusetzen. Häufig genug ist es ein letaler Ausgang. Sepsis, vor allem mit der Entwicklung eines septischen Schocks führt schnell und oft dramatisch zum Tode.

2.1.1 Sepsis: Der epidemiologische Hintergrund

2.1.1.1 Prävalenz

In einer Zeit, in welcher die Medizin große Fortschritte in Diagnostik und Therapie macht und so die Behandlung von Krankheiten ermöglicht, bei welchen noch vor Jahren eine nahezu infauste Prognose gestellt werden mußte, erlangen nosokomiale Infektionen und Sepsiserkrankungen eine zunehmende Bedeutung.

Die Sepsis ist heute bei einer Inzidenz von 400 000 bis 500 000 Erkrankungen pro Jahr in der USA als bedeutsames gesundheitspolitisches Problem anerkannt.

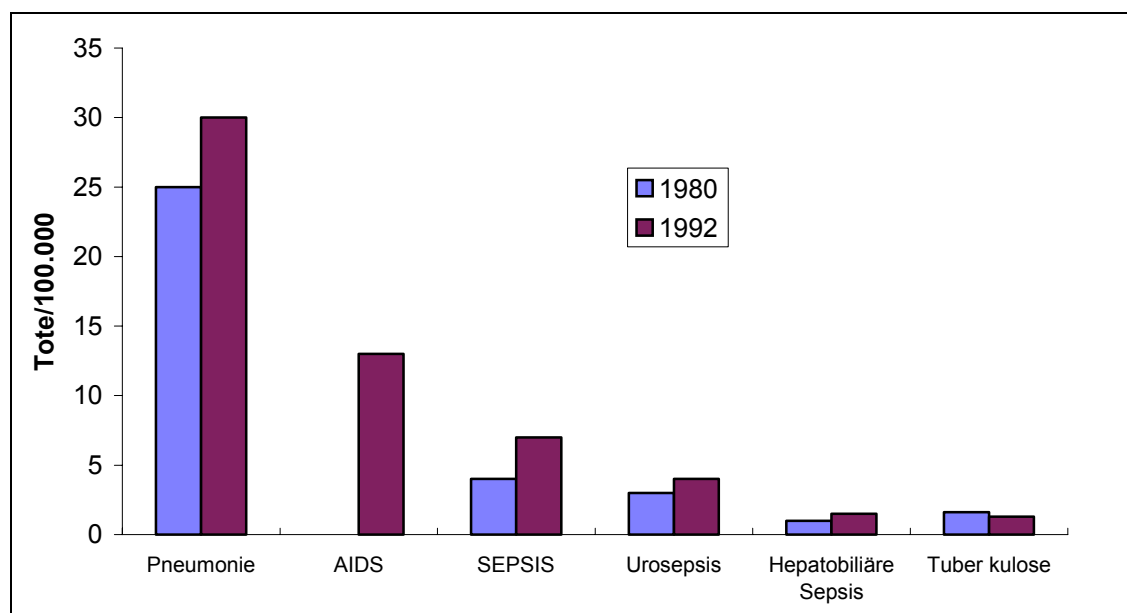


Abbildung 1 Letalität durch Infektionen (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA)

Etwa die Hälfte der an Sepsis erkrankten Patienten erleidet im Verlauf der Erkrankung einen septischen Schock mit einer Mortalitätsrate von 50 % und mehr [Parrillo 1993, Stone 1994]. In Deutschland wurde 1994 eine Prävalenzstudie zur Erfassung nosokomialer Infektionen durchgeführt. Als Ergebnis fand sich bei einer Prävalenz von 3,5 % nosokomialer Infektionen eine Sepsisrate von 8,3 %. Das entspricht einem Anteil von 5 Sepsisfällen auf 1000 Patienten [Rüden 1995] .

Die Zunahme an diesen schweren Krankheitskomplikationen ist nicht zuletzt auf die Fortschritte der Medizin zurückzuführen, wobei hier insbesondere die Zunahme der hospitalisierten Problempatienten mit veränderten immunologischen

Reaktionsmechanismen zu nennen ist. Es hat sich nicht die Gesamtzahl der stationären und der Intensivpatienten wesentlich erhöht, sondern deren Zusammensetzung hat sich geändert: Patienten mit höherem Lebensalter, Frühgeborene, Patienten mit schwereren Grunderkrankungen (Blutzelltumoren, solide Tumoren, HIV-Infektionen [Witt 1987, Gatell 1996]) und artifiziellen Immunsuppressionen (Transplantationspatienten oder Tumorpatienten mit Chemo- oder Strahlentherapie [Bodey 1985, Mermel 1990] oder Kortikoidtherapien) als Ausdruck des medizinischen Fortschritts haben vermehrten Anteil an den Intensivpatienten. Neben diesen offensichtlichen Problempatienten ist das Immunsystem aber auch bei Patienten nach einem schweren Trauma, mit Stoffwechselerkrankungen (u. a. Diabetes mellitus) und auch bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie elektiven Operationen geschwächt.

Heute werden bei circa 60 % der Sepsispatienten gramnegative Bakterien isoliert, zu 50 % können grampositive Erreger nachgewiesen werden. Bei 30 % der Patienten liegen polymikrobielle Infektionen vor.

2.1.2 Definitionen der Sepsis

Die Sepsis als eigenständiges Krankheitsbild wird sowohl in der einschlägigen Literatur als auch in der Klinik teilweise unterschiedlich definiert.

Die Sepsis und der septische Schock, schon von Hippokrates ca. 400 v. Chr. als eine Krankheit beschrieben, die 7-14 Tage nach der Verwundung als ein Fieber beginnt, „das verursacht wird durch eine Materie, die fault“.

Bereits 1914 wurde von Schottmüller eine infektiologische Sepsisdefinition gegeben, die besagt:

"Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, daß durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden."

Die ursprüngliche Definition der Sepsis [Schottmüller 1914] ist nach wie vor gültig.

Um das Krankheitsbild der Sepsis besser untersuchen zu können, wurden einheitliche Definitionen für den Begriff der Infektion, der Bakteriämie, der Sepsis und des septischen Schocks gefordert. Dieser Bemühung Rechnung getragen hat die 1991 in Northbrook (USA) stattgefundene „Consensus Conference“ (ACCP/CCM) aus Vertretern der American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine, die die Begriffe Infektion, Bakteriämie, SIRS („systemic inflammatory response syndrome“), Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock, Hypotension und MODS („multiple organ dysfunction syndrome“) definierte [Bone 1992].

Als SIRS wird definiert, wenn zwei oder mehr der folgenden Reaktionen auftreten:

- Temperatur > 38°C (oder < 36°C)
- Herzfrequenz > 90/min
- Atemfrequenz > 20/min, oder Hyperventilation mit PaCO₂ < 32 mmHg
- Leukozytenzahl > 12 x 10⁹/l (oder < 4 x 10⁹/l oder > 10 % unreife neutrophile Granulozyten)

Eine SIRS außer bei einer Infektion auch noch bei folgenden Erkrankungen auftreten: Pankreatitis, Ischämie, multiple Traumen und Gewebsverletzungen, hämorrhagischer Schock, immunbedingte Organschäden sowie nach exogener Zufuhr von potenten Entzündungsmediatoren.

Eine weitere Übereinkunft betrifft die Begriffe Infektion, Bakteriämie und Sepsis. Infektion ist eine (lokale) entzündliche Reaktion auf das Eindringen oder die Anwesenheit von Mikroorganismen in sonst sterilen Geweben.

Bakteriämie ist die Anwesenheit von vitalen Bakterien in der Blutbahn.

Sepsis ist die systemisch inflammatorische Reaktion auf eine Infektion mit dem oben beschriebenen klinischen Bild des SIRS.

Sepsis ist ein dynamisches Geschehen. Deshalb wurden in einer weiteren Übereinkunft die Begriffe schwere Sepsis, sepsisinduzierte Hypotension und septischer Schock getrennt definiert, stellen aber weiterhin einzelne Stadien eines kontinuierlich ineinander übergehenden Krankheitsgeschehens dar.

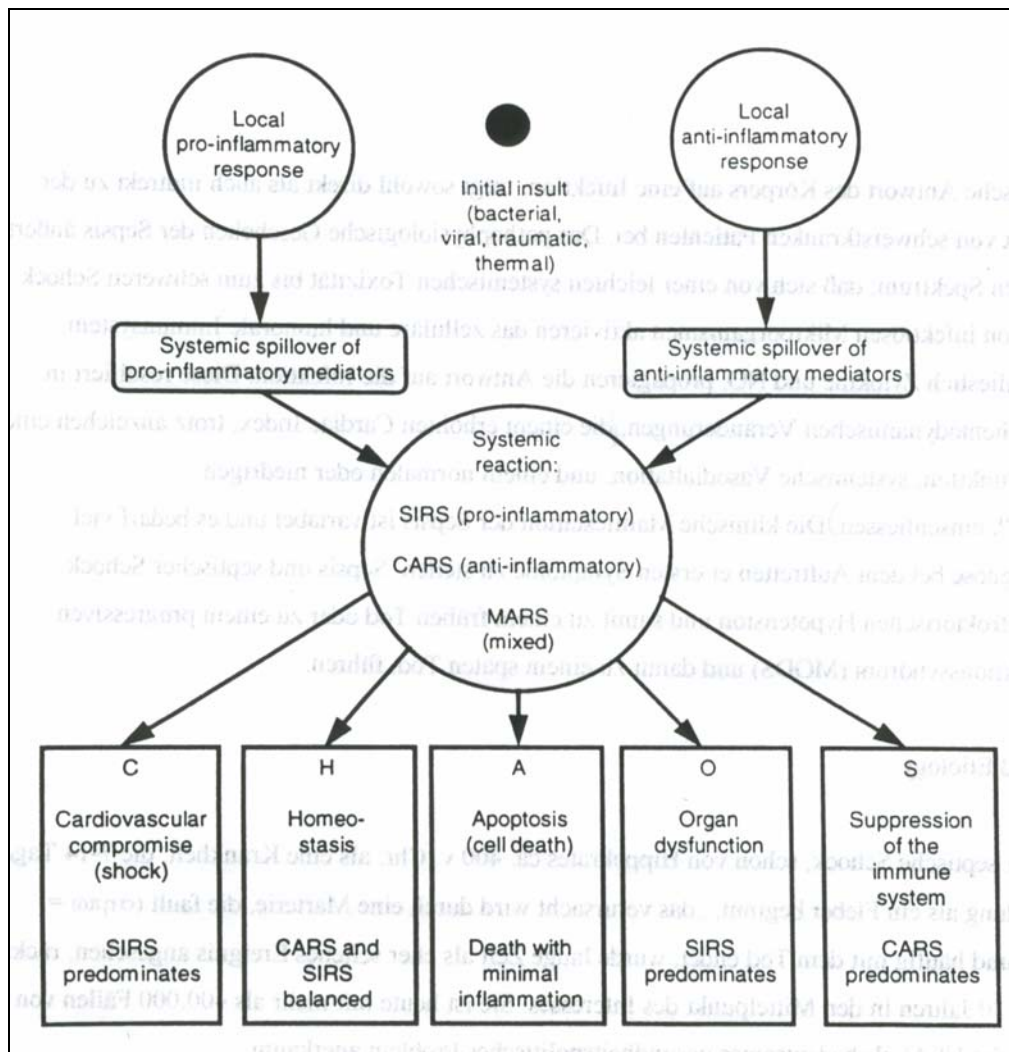


Abbildung 2 Darstellung des Konzeptes der klinischen Folgen von Sepsis, SIRS und MODS (Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. Crit Care Med 1996; 24: 1125-28)

2.1.3 Vorkommen

Die Sepsis wird häufig durch eine Infektion mit aeroben oder anaeroben Bakterien verursacht. Zu diesen Zustand können sowohl gram - positive als auch gram - negative Keime führen. Die gram - negativen aeroben sind die häufigsten, bedeutendsten Pathogene, da eine Infektion mit diesen die schlechteste Prognose hat. Escherichia coli, Klebsiella sp., und Pseudomonas aeruginosa sind sie häufigsten Vertreter dieser Gruppe. Andere Mikroorganismen wie Mykobakterien, Pilze, Viren, Ricketten und Protozoen können ein Syndrom verursachen, daß klinisch nicht von der bakteriellen Sepsis zu unterscheiden ist. Die häufigsten Infektionsorte

der Sepsis sind das Urogenitalsystem, der gastrointestinal Trakt, der Respirationstrakt, Wunden und vaskuläre Zugänge. Da die Peritonitis fast 75% der Sepsisfälle bei operativen Intensivpatienten verursacht, erschien uns für unsere Arbeit die CASP – Peritonitis als das geeignetste Mausmodell um die Effekte der Sepsis auf das Knochenmark zu studieren.

<i>Verteilung von Sepsisherden bei operierten Intensivpatienten</i>
74% Peritonitis
27% Pneumonie
9% Urogenitale - Infekte
6% Gefäßkatheter
7% andere Ursachen

Tabelle 1 Verteilung von Sepsisherden bei operierten Intensivpatienten

2.1.4 Resistenzen

Ein weiterer Faktor in der Zunahme und Problematik nosokomialer Infektionen ist auch der unkritische und ungezielte Einsatz von Antibiotika [Maki 1989]. Dadurch wird einerseits die natürliche Mikroflora der Patienten gestört, was Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Flora zugunsten resistenter, meist pathogener Keime hat. Andererseits wird die Resistenzen der Bakterien am Patienten und von diesem ausgehend im gesamten Umfeld (hier Krankenhaus) gefördert. Infektionen von Intensivpatienten werden heute häufig durch multiresistente Bakterien verursacht [Vincent 1995].

Mikroorganismen sind in der Lage, eine Resistenz gegen zahlreiche Fremdstoffe in ihrer Umgebung zu entwickeln. Die Resistenz der Mikroorganismen ist genetisch fixiert und tritt unter geeigneten Bedingungen als Merkmal einer Population auf. Zu unterscheiden ist die natürliche von der erwerbaren. Die natürliche Resistenz ist die stets vorhandene Unempfindlichkeit einer Erregerart auf einen bestimmten Wirkstoff. Die betreffende Spezies steht außerhalb seines Wirkungsspektrums. Als Ursache kommt das Fehlen eines zellulären Angriffspunktes oder dessen Unzugänglichkeit in

Frage. Dies kann durch einen der folgenden Faktoren bedingt sein: Permeationsbarriere, enzymatische Inaktivierung, geringe Affinität des Reaktionsortes. Der erworbenen Resistenz liegen mehrere Vorgänge zugrunde, die ein zunächst empfindliches Bakterium in ein unempfindliches überführen. Biochemisch gleichen die Mechanismen denen der natürlichen Resistenz. Sie entwickelt sich durch spontane Änderung im Genom der Bakterien (eine oder mehrere Mutationsschritte) oder durch Übertragung resistenztragender Zellbestandteile von einer bereits resistenten Zelle.

Unter klinischen Bedingungen wird noch zwischen einer primären und einer sekundären Resistenz unterschieden. Die primäre Resistenz ist die Unempfindlichkeit eines Erregers gegenüber einem Präparat vor Infektionsbeginn. Unter einer Chemotherapie kann sich bei zunächst empfindlichen Keimen eine sekundäre Resistenz entwickeln und führt in der Regel zum Versagen der eingeleiteten Therapie.

2.1.5 Pathophysiologie der Sepsis

Obwohl vor allem die Fortschritte in der Zellbiologie, Molekularbiologie und Immunologie in den letzten Jahren das Verständnis der Pathogenese der Sepsis erheblich erweitert haben ist dieser komplexe Vorgang auch heute nur teilweise verstanden. In den letzten Jahren verlagert sich die Aufmerksamkeit der Forschung von dem infizierenden Organismus hin zur Untersuchung der körpereigenen Antwort. Heute ist klar, daß eine inadäquate Entzündungsreaktion des Körpers auf die Aktivierung der körpereigenen Abwehrsysteme auf eine Infektion am Krankheitsverlauf einer Sepsis entscheidend beteiligt ist.

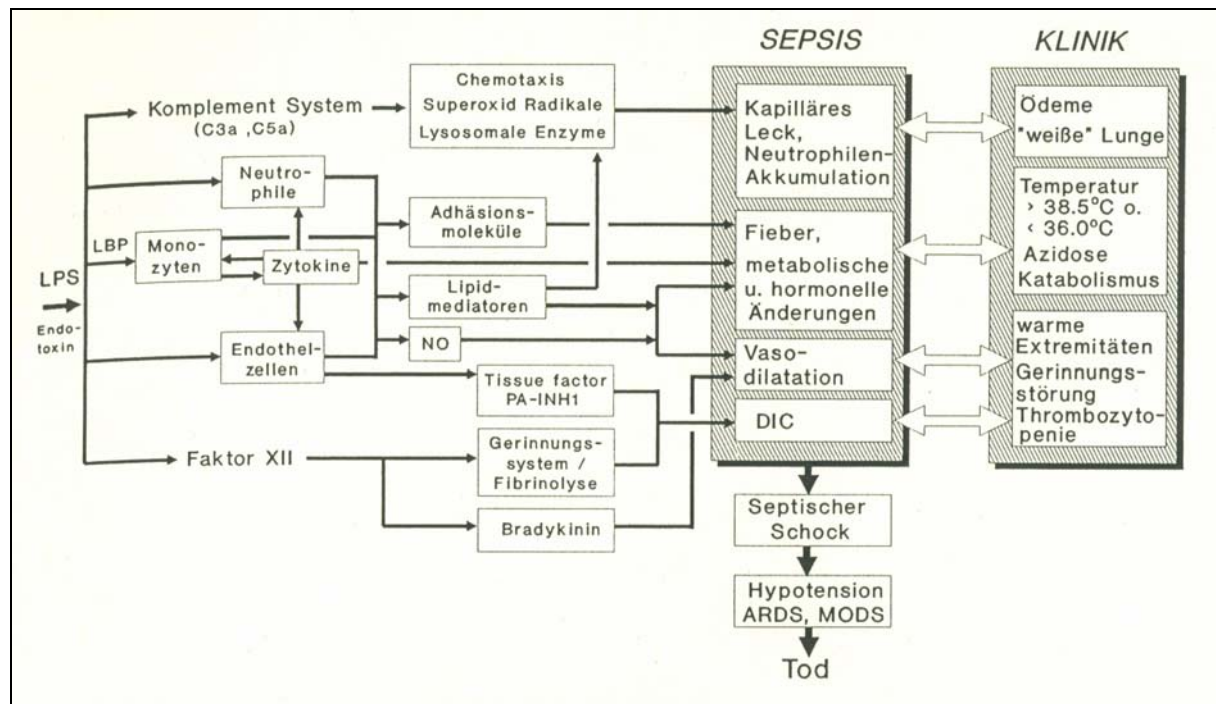


Abbildung 3 Mediatorsystem und Interaktionen in der Pathogenese der Sepsis (Glaser et al.)

Auch unabhängig von der Art der Primärinfektion führt ein Zusammenspiel der Virulenz des Erregers und der Immuninkompetenz des Wirtes zu einem Versagen der lokalen Abwehrmechanismen und einem Überwinden der Körperbarrieren durch Mikroorganismen. Dies hat eine Invasion in die Blutbahn zur Folge. Nach dem Eindringen in den Organismus kommt es in der Regel zu einer enormen Vermehrung der Keime. Damit verbunden ist eine beträchtliche Absterbrate infolge des natürlichen Turn-over und der Abwehrmaßnahmen des Körpers, die durch den Einsatz von wirksamen bakteriziden Antibiotika noch verstärkt sind. Bei Vorliegen einer gramnegativen Infektion werden durch die Lyse der Keime Zellbestandteile freigesetzt, unter denen das Endotoxin als Triggerfaktor in der Pathophysiologie der Sepsis eine besondere Rolle spielt [Glaser 1991, Rietschel 1992]. Im Gegensatz dazu stehen die Exotoxine, die von den Bakterien aktiv vor allem in der Wachstumsphase freigesetzt werden. Exotoxine stellen die wichtigsten Virulenzfaktoren der grampositiven Keime dar, werden aber auch regelmäßig bei gramnegativen Bakterien beobachtet und können ebenso wie das Endotoxin über die Mediatorkaskade ein Krankheitsbild in Gang setzen, welches im Schock und häufig mit dem Tod enden kann [Tanaka 1995].

Einmal in die Blutbahn gelangt setzen beide Toxintypen körpereigene systemische Abwehrmechanismen in Gang, die mit den zellulären Systemen (neutrophile Granulozyten, Monozyten / Makrophagen, Endothelzellen) beginnen und sich in dem plasmatischen Systemen (Komplement-, Kallikrein-Kinin- und Gerinnungssystem) fortsetzen.

Ist diese Aktivierung adäquat der Stärke der Noxe und können die Toxine rechtzeitig aus dem Blut eliminiert werden, wird die Infektion überwunden. Abhängig von der Immunlage des Patienten, seinen Vorerkrankungen sowie der Einwirkungsdauer und Stärke der Noxe kommt es jedoch häufig zu einer inadäquaten, exzessiven systemischen Entzündung (SIRS). Die Abwehrsysteme werden mit ihren Mediatoren selbst zum Angreifer und können sich im Sinne eines positiven Feedbacks sogar verstärken. Gelingt es nicht, die eskalierende Reaktion der körpereigenen Abwehrzellen mit toxischen Mediatorkonzentrationen zu unterbrechen, führt dies zur Organdysfunktion und Gerinnungsstörungen, über Schock und Multiorganversagen im weiteren Verlauf der Spirale bis hin zum Tod.

Lipopolysaccharide gelten als eine der potentesten biologischen Toxine, welche die Immunabwehr im Organismus stimulieren. Applikationen im Pikogrammbereich reichen aus, um Zellen des Immun-, Entzündungs- und Gefäßsystems zu stimulieren [Loppnow 1993].

Einige grundlegende Reaktionen, welche nach einer i.v. Injektion von Endotoxin oder nach der Zerstörung von Bakterien in vivo vonstatten gehen, sollen kurz erläutert werden.

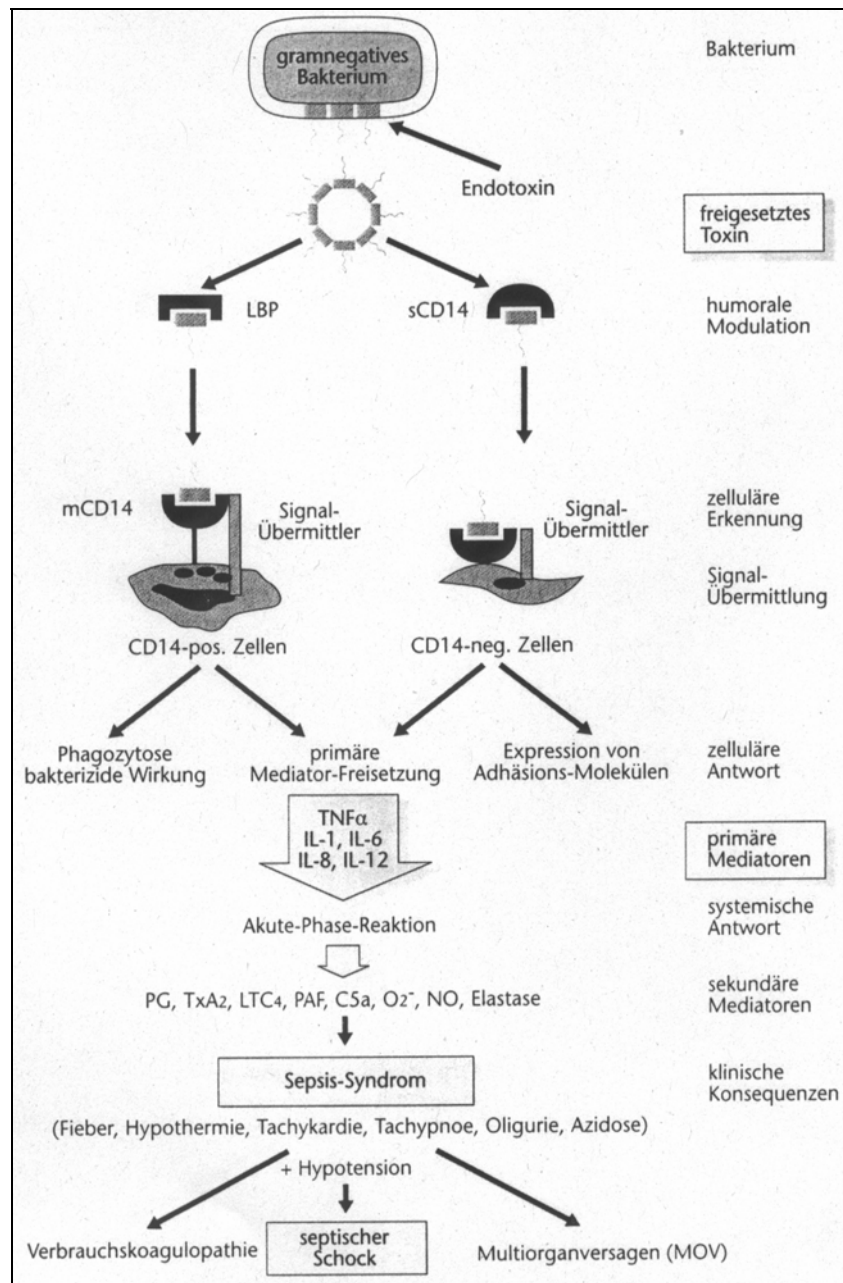


Abbildung 4 Schematisches Modell der Endotoxin-induzierten Aktivierung von CD14 positiven Zellen und klinische Folgereaktionen

Der Anteil an Endotoxin, welcher nicht durch humorale oder zelluläre Komponenten des Organismus neutralisiert wird, reagiert mit LBP (Lipopolysaccharid-bindendes Protein) oder sCD14 und aktiviert über diesen Zwischenschritt Zielzellen, endogene Mediatoren oder Adhäsionsmoleküle zu exprimieren, zu produzieren und freizusetzen [Ulevitch 1995]. Primäre Zielzellen sind Monozyten/ Makrophagen, Endothelzellen, Granulozyten und Lymphozyten. Wichtige Mediatoren wie TNF- α ,

IL-1, IL-6 und IL-8 werden produziert. Diese sind fähig, empfängliche (Zytokinrezeptor-positive) Zellen zu aktivieren, Lipidmediatoren (Plättchen-aktivierender Faktor PAF, Leukotriene, Prostaglandine), Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid (NO) und Proteasen (Elastase, Kollagenase [Jochum 1992]) zu produzieren und freizusetzen.

Im Gegensatz zu zytotoxischen Exotoxinen (z. B. porenbildendes Staphylococcus aureus Toxin oder Proteinsynthetase-hemmendes Pseudomonas Toxin A) scheint Endotoxin selbst keine zytotoxische Wirkung zu haben. Auch die makroskopischen klinischen Auswirkungen einer Endotoxinämie werden über die immunmodulatorischen Wirkungen des Toxins vermittelt. So induziert das Lipopolysaccharid nach Blockade der Effektoren weder Fieber noch hyperdynamie Veränderungen im Organismus. Die biologische Wirkung von Lipopolysaccharid ist an die Lipid A-Komponente des Makromoleküls gebunden [Galanos 1985].

Endotoxin führt nach der Kopplung von Lipid A an LBP über die Reaktion an CD14-Rezeptoren an der Oberfläche von monozytären Phagozyten zu deren Aktivierung. Aktivierte monozytäre Zellen zeigen vermehrte Chemotaxis, eine erhöhte Phagozytose- und Sekretionsaktivität. Sie sind morphologisch von den normalen, ruhenden mononukleären Zellen zu unterscheiden [Übersicht in: Johnston 1988]. Monozyten / Makrophagen produzieren außer den direkt bakteriziden und zytotoxischen Komponenten (Proteinasen, freie Radikale, Stickstoffmonoxid NO) auch wichtige Zytokine (IL-1 und IL-1ra, IL-6, TNF- α , Interferone, Wachstumsfaktoren) und modulieren so die lokale Entzündungsreaktion durch die Aktivierung weiterer Abwehrzellen. Der Lipidmediator Leukotrien B4 wirkt als starker chemotaktischer Faktor auf Leukozyten und induziert die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen.

Neutrophile Granulozyten werden bei einer Infektion durch LBP- gekoppeltes Lipopolysaccharid direkt über CD14 und indirekt durch Mediatoren aktiviert. Zu den humoralen Stimuli der Neutrophilen gehören nahezu alle in den pathophysiologischen Mechanismus der Entzündung involvierten Mediatoren. Hier seien nur einige genannt: Chemotaxine C3a, C5a und Leukotrien B4; Opsonine und Immunglobuline (Fc-Region); Kinine; Zytokine IL-1, IL-8, TNF- α sowie die Wachstumsfaktoren GM-CSF und G-CSF [Thiel 1996a]. Die Antwort der neutrophilen Granulozyten nach den Einwirkungen oben genannter Substanzen auf die Oberflächenrezeptoren besteht in einer gesteigerten Rezeptorexpression, in einer

Ausbildung von Adhäsionsmolekülen (CD11/CD18-Komplex), in der Steigerung der Phagozytoserate sowie in der Bildung und Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (respiratory burst) und proteolytischen Enzymen (Degranulation). Der aktive Eingriff der Neutrophilen in das Immunsystem besteht in der Ausschüttung von Zytokinen (IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- α), Wachstumsfaktoren (G- und M-CSF) und anderer Mediatoren wie zum Beispiel Leukotrien B₄.

Bei Patienten, welche auf eine Infektion adäquat reagieren, stellt das Zytokin-Netzwerk ein ausgewogenes System aus pro- und antiinflammatorischen Komponenten dar. Gerät dieses System jedoch aus dem Gleichgewicht infolge einer übermäßigen Stimulation, gewinnen die proinflammatorischen Zytokine die Überhand. Der klinische Schweregrad einer Sepsis korreliert dabei mit der Höhe der zirkulierenden Zytokinkonzentration [Kragstjerg 1996].

Die wichtigsten in der Pathogenese der Sepsis beteiligten Zytokine sollen noch einmal kurz beschrieben werden.

IL-1 und TNF- α sind die bedeutendsten endogenen proinflammatorischen Zytokine. Sie sind im Bereich von picomolaren Konzentrationen biologisch wirksam. TNF- α wird vorwiegend von Monozyten / Makrophagen gebildet. Der Stimulus für die Biosynthese ist die Reaktion des Oberflächenmoleküls CD14 mit dem LPS-LBP-Komplex und auch TNF- α selbst, IL-1, IL-2, GM-CSF bewirken die DNA-Transkription. Nach einer LPS-Exposition steigt die TNF- α -Freisetzung innerhalb von 1,5 bis 2 Stunden auf ein Maximum an, fällt danach ebenso rasch wieder ab und ist nach 4 Stunden fast nicht mehr nachzuweisen [Hesse 1988, Michie 1988]. Die biologische Halbwertszeit von TNF- α liegt bei etwa 15 Minuten. TNF- α Rezeptoren befinden sich auf nahezu allen Zellen außer den roten Blutkörperchen. Die Verbindung von extrazellulärem TNF- α und den Zelloberflächenrezeptoren bewirkt eine intrazelluläre Signaltransduktion mit Aktivierung der Phospholipase A₂ und von Proteinkinasen. Dies wiederum führt zur Freisetzung der second messenger, welche die biologischen Wirkungen von TNF- α vermitteln. Diese biologischen Effekte von TNF- α sind bei jeder Infektion klinisch zu beobachten und konnten durch die experimentelle Applikation von TNF- α in verschiedenen Studien nachvollzogen werden [Natanson 1989]. Schock, ARDS, Fieber, Anorexie, Stresshormon-Freisetzung, Induktion der Akut-Phase-Proteine, gesteigerter Zellmetabolismus, Insulin-Resistenz, erhöhte Zytotoxizität sind nur einige der Reaktionen auf TNF- α .

Neben den direkten Wirkungen von $\text{TNF-}\alpha$ über die second messenger wird eine Vielzahl der Effekte aber auch über sekundär freigesetzte Zytokine IL-1, IL-6, IL-8, $\text{IFN-}\gamma$, GM-CSF vermittelt. $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 wirken myokarddepressiv, dabei potenziert sich die Wirkung bei gleichzeitiger Anflutung an die Myokardzelle [Kumar 1996].

Die biologischen Effekte von IL-1 entsprechen weitgehend denen von $\text{TNF-}\alpha$. Nach intravenösen Applikationen bei Krebspatienten konnten folgende Symptome provoziert werden: Fieber, Müdigkeit, Anorexie, generalisierte Muskel- und Gelenkschmerzen, Kopfschmerzen, Neutropenie und Thrombozytopenie sowie bei höherer Dosierung einen dramatischen Abfall des Blutdruckes [Smith 1992]. Die Wirkungen werden auch bei IL-1 durch die Induktion von niedrigmolekularen Mediatoren wie Eicosanoide, Platelet Activating Factor und Stickstoffmonoxid und durch die Aktivierung der Endothelzellen vermittelt. Die Regulation der Akut-Phase-Protein-Bildung in der Leber geschieht parallel mit IL-6. Ein weiterer zytokinvermittelter Effekt von IL-1 ist die Stimulation der Hämatopoese über GM-CSF, G-CSF, M-CSF, IL-3. Während der Peak von $\text{TNF-}\alpha$ im Plasma bei 1,5 bis 2 Stunden liegt, erreicht IL-1 seinen Maximalwert nach etwa 3 Stunden [Wakabayashi 1991] und wird in erster Linie von monozytären Zellen, aber auch von Fibroblasten, Endothelzellen, Granulozyten und einigen anderen Zellen der lokalen und systemischen Abwehrsysteme gebildet.

IL-6 besitzt zwar nicht die kreislaufwirksame Potenz wie die zuvor beschriebenen IL-1 und $\text{TNF-}\alpha$, es gehört aber dennoch zu den proinflammatorischen Zytokinen. Es entfaltet eine pyrogene Aktivität, induziert die Bildung von Akut-Phase-Protein und modifiziert zusammen mit IL-1 die spezifische Immunantwort (B- und T-Zellen). IL-6 wird von monozytären Makrophagen und im weiteren Verlauf der Erkrankung auch von T-Zellen freigesetzt. Maximalwerte werden in der Regel etwa sechs Stunden nach einem Entzündungsreiz gemessen und die Höhe des Anstiegs ist mit dem fatalen Ausgang einer Sepsis positiv korreliert [Fisher 1993].

Für nahezu alle entzündungsfördernden Zytokine wurde ein positiver Feedback Mechanismus beschrieben, so daß sich in Folge einer massiven Stimulation des Systems beispielsweise durch Endotoxin eine Potenzierung entwickeln kann. Das biologische System aus inflammatorischen Zytokinen hat sich aber im Verlaufe der Evolution auch eigene Gegenregulatoren geschaffen. Dazu gehören die

antiinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-10, IL-13 und auch Wirkstoffe direkt gegen eine zu hohe Konzentration der proinflammatorischen Zytokine. Zu diesen gehören einerseits lösliche Rezeptoren von IL-1 und TNF- α , welche auf eine übermäßige Stimulierung der Zielzellen ausgeschüttet werden und im Kreislauf zirkulieren. Ein anderer Weg ist die Freisetzung von Antagonisten auf einen anhaltend hohen Reiz, wie dies beim Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) beschrieben ist.

Durch die Isolierung, Reinigung und rekombinante Produktion des IL-1ra-Proteins in größeren Mengen hat dieser Antagonist erhöhtes wissenschaftliches Interesse gefunden. Seine biologischen Wirkungen und seine Rolle im Wechselspiel der Zytokine sind weitgehend bekannt.

Die endogenen Mediatoren stimulieren rezeptortragende Zellen und Organe, was zu den sekundären und klinisch relevanten Reaktionen führt. Beispielsweise wirken TNF- α , IL-1 und IL-6 als endogene Pyrogene auf den Hypothalamus und induzieren Fieber über das Prostaglandin E₂. Die Hypophyse setzt ACTH frei (was wiederum zum Anstieg der Kortisolkonzentration führt) und die Hepatozyten produzieren und sezernieren Akut-Phase Proteine [Baumann 1994, Steel 1994]. Einige der Akut-Phase Proteine unterdrücken die LPS-abhängige Entzündungsreaktion, andere wie das LBP potenzieren sie.

Die Plasmasysteme werden von Endotoxinen direkt (Komplementsystem) oder indirekt über den Hagemann-Faktor (Faktor XII) frühzeitig aktiviert und spielen ebenso wie die Zytokinkaskade eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Sepsis und des septischen Schocks. Die Aktivierung des Komplementsystems über den klassischen antikörperabhängigen, ebenso wie über den alternativen Weg führen zur Umsetzung der Faktoren C3, C4 und C5 in die aktiven Komponenten C3a, C4a und C5a. Diese können Neutrophile und Makrophagen zur Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen und zur Freisetzung von Mediatoren über die Bindung an spezifische Rezeptoren anregen. Komplementfaktoren induzieren zudem eine Vasodilatation, erhöhen die Kapillarpermeabilität mit hämodynamischen Veränderungen und fördern die Aggregation von Thrombozyten und neutrophilen Granulozyten. Neben diesen systemaktivierenden Aufgaben besitzt das Komplementsystem mit den terminalen Komplementfaktoren C6 bis C9 eine zytotoxische Potenz. Diese Faktoren bilden nach Aktivierung einen „Membranangriffskomplex“, welcher lytische Zellwandläsionen in der Zielzelle

verursacht. Eine erhöhte Konzentration von aktiviertem Komplement ist mit der Mortalität assoziiert [Hack 1989].

Aktivierter Faktor XII triggert über seine Wechselwirkungen mit dem Faktor XI die Auslösung der intravasalen Blutgerinnung. Bei einer Störung des Gleichgewichtes zwischen Gerinnung und Fibrinolyse durch die systemische Anreicherung von Prothrombinaktivatoren (Faktor III) und den Verbrauch von fibrinolytischen Faktoren kommt es zu einer systemischen Gerinnungsneigung, bezeichnet als disseminierte intravasale Gerinnung. Blutgerinnsel können Kapillargebiete lebenswichtiger Organe verstopfen und führen zu Mikrozirkulationsstörungen. Durch den weitergehenden Verbrauch an Fibrinogen und Thrombozyten kommt es nachfolgend zu einer erhöhten Blutungsneigung. Zu einer Plättchenaktivierung führt auch der Platelet Activating Factor (PAF). Während er in niedrigerer Konzentration nur zu einer Aggregation von Thrombozyten führt, erreicht er in höheren Konzentrationen deren Degranulation, eine Aggregation und Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und eine Bronchokonstriktion, Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung der Kapillarwand.

Da Faktor XII auch in die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems auf der Ebene des Präkallikreins verwickelt ist, führt er zur Freisetzung der stark kreislaufwirksamen Kinine (insbesondere Bradykinin). Die Wirkung von Bradykinin an den Endothelien führt zu einer Vasodilatation mit Absenkung des peripheren Widerstandes und zu einer Erhöhung der Kapillarpermeabilität. Bradykinin wirkt über weitere Mediatoren (Katecolamine, Angiotensine und Eicosanoide) auch auf das Herz (Steigerung von Herzfrequenz und Schlagvolumen), die Lunge (Bronchokonstriktion) und die Nieren. Anhaltende Stimulationsreize wie beispielsweise ein streuender infektiöser Herd führen zu anhaltend hohen Kinin-Konzentrationen. Dies ist als prognostisch ungünstiger Faktor zu betrachten [Aasen 1983].

Die Aktivierung der membranständigen Phospholipase A₂ durch Mediatoren führt zur intrazellulären Bildung von Arachidonsäure. Über die plasmatischen Enzyme Cyclooxygenase und Lipoxygenase werden Prostaglandine, Thromboxan A₂ (TxA₂) und Leukotriene gebildet. Die in der Sepsis wirksamen Prostaglandine und das TxA₂ bewirken eine Vasokonstriktion und Thrombozytenaktivierung sowie eine Bronchokonstriktion. Dies führt zu verstärkter intravasaler Mikrothrombenbildung und zu Mikrozirkulationsstörungen. Leukotriene (vor allem LTB₄) und Prostaglandin E gelten als hochpotente Chemotaxine und bewirken die lokale Aktivierung der

akkumulierten Leukozyten. PGF_{2a} sowie LTB₄ sind darüber hinaus immunologisch bedeutsam, da sie eine Vielzahl von Immunantworten des zellulären und humoralen Immunsystems hemmen.

Die letztlich auf zellulärer und molekularer Ebene schädigenden Wirkstoffe sind die Sauerstoffradikale und das Stickstoffmonoxid. Die Substanzen besitzen einerseits eine Mediatorwirkung (Chemotaxis, Zellstimulierung von Leukozyten und Endothelzellen) und andererseits über ihr ungepaartes Elektron eine sehr hohe Reaktivität. Die Moleküle haben somit eine sehr kurze biologische Halbwertszeit (im Millisekunden- bis Sekundenbereich) und reagieren insbesondere mit in mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Membranphospholipide) vorkommenden Doppelbindungen. Die dadurch ausgelöste Schädigung der Zellwand führt zur Desintegration der Zelle und Lyse. Im Bezug auf eine Abwehrreaktion von eingedrungenen Fremdzellen (Bakterien) ist dies die ursprüngliche Aufgabe der freien Radikale. Aufgrund ihrer Molekülgröße können die Substanzen auch physiologische Barrieren überwinden. Dies spielt aufgrund der kürzeren Halbwertszeit bei den Sauerstoffradikalen eine geringere Rolle als bei Stickstoffmonoxid. Eine ausführliche Darstellung der pathophysiologischen Wirkung der Radikale findet sich bei Schoenberg [Schoenberg 1995].

2.1.6 Die hämodynamische Entwicklung

Die Eigenart des septischen Geschehens ist das hyperdynamische Profil [Wilson 1965]. Eine initiale kurzfristige Hypertonie wird ausgelöst durch den Ausstoß von Katecholaminen (Stresshormonen). Ein Abfall des peripheren Gefäßtonus, verursacht durch die Toxin- und Mediatoreinwirkungen (finaler Effektor Stickstoffmonoxid), tritt innerhalb ein bis eineinhalb Stunden nach Endotoxinfreisetzung auf [Goldfarb 1986, Ridings 1995]. Der Organismus versucht, diese Fehlfunktion durch eine Erhöhung der Herzfrequenz und des Schlagvolumens zu kompensieren (hyperdynamische Antwort). Die nur inadäquate Steigerung der Herzförderleistung wird einer reversiblen, multifaktoriellen Herzschädigung zugeschrieben [Parrillo 1989, Werdan 1991] und als akute septische Kardiomyopathie bezeichnet. Die Herzmuskelschädigung führt zu einer verminderten Auswurffraktion beider Herzkammern im Vergleich zur benötigten Mehrleistung, zu einer Vergrößerung des Herzens mit erhöhten end-diastolischen und end-

systolischen Volumina infolge einer Zunahme der Compliance. Die Kontraktilität der Herzmuskulatur ist verringert, so daß bei einer Erhöhung der Herzfrequenz und des Schlagvolumens (bzw. -index) das Herzzeitvolumen (bzw. Herzindex) nur inadäquat ansteigt [Parker 1984, Parker 1990, Werdan 1991].

Als Konsequenz der Mediatorokaskade in der Sepsis kommt es letztlich durch die Produktion und Freisetzung von Stickstoffmonoxid zu peripherer Vasodilatation mit einer Umverteilung des peripheren Blutangebotes und einem Versacken des Blutvolumens in dem peripheren Kapillarnetz. Die arteriovenösen Shunts werden durch lokale Einwirkungen geöffnet. Als makroskopisch-klinisches Pendant kommt es zu einer Erwärmung der Haut und zu einer Erhöhung des zentralvenösen Drucks in der Übergangsphase zum septischen Schock. Durch die lokalen Einwirkungen von Mediatoren auf die Endothelzellen kommt es auch zu einer Desintegration der Zellen mit erhöhter Permeabilität der Gefäßwände. Damit verringert sich das Volumenangebot durch Extravasation von Plasma.

Während es im peripheren Kreislauf durch die Vasodilatation zu einem Abfall des systemischen Gesamtwiderstandes kommt, resultiert die Anhäufung der Leukozyten und die Gefäßwandschädigung mit Bildung von Mikrothromben in der Lunge in einem Anstieg des pulmonalen Gesamtwiderstandes, des pulmonalkapillären Verschlussdruckes und des pulmonalarteriellen Druckes [Sibbald 1983, Dhainaut 1988]. Das klinisch korrelierende Bild dieser Lungenaffektion ist die Schocklunge, auch als "Adult Respiratory Distress Syndrome" (ARDS) bezeichnet. Durch verschiedene Schädigungsmechanismen wird das pulmonale Gefäßsystem beeinträchtigt, so daß es zu einem interstitiellen Lungenödem kommt. Infolgedessen wiederum ist die Oxygenierung des Blutes in der Lunge reduziert. Meßbar ist dies an einem reduzierten arteriellen Sauerstoffpartialdruck.

Die Kardiomyopathie resultiert aus einer reversiblen Myokarddepression, welche durch verschiedene Faktoren ausgelöst wird. Durch reflektorische Freisetzung von Katecholaminen kommt es zu einem Konzentrationsanstieg desselben im Blut. Myokardmuskelzellen versuchen einer Schädigung durch eine anhaltend hohe Katecholaminanflutung durch eine Desensibilisierung zu entgehen. Die Desensibilisierung kommt durch eine Reduktion der Anzahl der β -Adrenozeptoren an der Zelloberfläche sowie einer Zunahme der inhibitorischen G-Proteine an der inneren Zellmembran [Böhm 1989, Reithmann 1992, Reithmann 1993] zustande. Direkte Einwirkungen von Bakterienprodukten auf die Herzmuskelzelle ist nur bei

einzelnen Exotoxinen und nicht bei Endotoxinen nachweisbar. Endotoxine entfalten ihre Wirkung auf das Myokard über die Freisetzung von Zytokinen vorwiegend aus Monozyten / Makrophagen. Die kardiodepressive Wirkung von TNF- α wurde im Tierexperiment nachgewiesen [Natanson 1989, Schirmer 1989]. Die Wirkung wird durch TNF- α direkt hervorgerufen [Reithmann 1994] und resultiert aus einer Abnahme der β -Adrenozeptoren, der Zunahme der G-Proteine aber auch in einer Zunahme der Adenylatcyclase-Aktivität. TNF- α und IL-1 β sind mit einer früher als "myocardial depressant factor" bezeichneten Substanz identisch [Kumar 1996].

2.1.7 Klinik der Sepsis

Klinisch ist die Sepsis im initialen Stadium geprägt durch die lokale Manifestation der Primärinfektion sowie den systemischen Auswirkungen des SIRS. Die Lokalinfection kann bei einer primären Sepsis infolge direkter Einschwemmung der Erreger in die Blutbahn (invasive Maßnahmen) umgangen werden.

Typische unspezifische Anzeichen einer systemischen Entzündungsreaktion sind Fieber und Schüttelfrost, häufig in Schüben auftretend. Die Organmanifestationen des SIRS sind durch plötzliche respiratorische Insuffizienz, Oligurie, Vomitus oder Veränderungen der Bewußtseinslage klinisch zu erkennen. Die pathophysiologische Grundlage für diese Organbeeinträchtigungen sind vor allem Perfusionsstörungen infolge einer kardiovaskulären Insuffizienz. Bei ausgeprägter Schocksymptomatik kommt es zu mikrovaskulärer Stase und die Organe werden reduziert perfundiert. Es werden einerseits weniger Sauerstoffmoleküle antransportiert, andererseits die dann über die anaerobe Utilisation von Glukose entstehenden sauren Stoffwechselprodukte nicht abtransportiert. So kann eine metabolische Azidose infolge der hypoxischen Organschäden durch das Retardieren der sauren Metabolite im Gewebe verschleiert werden. Andererseits kann die daraus resultierende Hyperventilation zu einer respiratorischen Alkalose führen.

2.1.8 Therapie der Sepsis

2.1.8.1 Chirurgische Herdsanierung

Wichtig für eine optimale Therapie der Sepsis ist der Nachweis des Ausgangsherds. Liegt ein umschriebener Herd vor, sollte er chirurgisch saniert oder minimiert werden.

2.1.8.2 Antibiotikatherapie

Vor der Einleitung einer Antibiotikatherapie sollten diagnostische Untersuchungsmaterialien wie z. B. Blut, Urin und Bronchialsekret gewonnen werden. Die gezielte antibiotische Behandlung mit Erregernachweis und Antibiogramm ist dringend einer ungezielten Therapie vorzuziehen. Dies ist bei septischen Patienten in der initialen Phase nur in Einzelfällen möglich. Die ungezielte, kalkulierte antibiotische Initialtherapie muß sich somit nach dem potentiellen Ausgangsherd, nach der Grunderkrankung des Patienten und nach der hausspezifischen Erregerepidemiologie und Resistenzlage richten, zumal der Nachweis eines fakultativ pathogenen Mikroorganismus nur in ca. einem Viertel bis der Hälfte der Fälle gelingt.

Die antibiotische Therapie beginnt hochdosiert parenteral, geeignet sind Cephalosporine oder Carbapeneme, die bei Vorliegen von Schock-Zeichen mit Aminoglykosiden kombiniert werden.

2.1.8.3 Optimierung der Oxygenierung

Um das periphere Sauerstoffangebot zu verbessern, erfolgt die Therapie des gestörten pulmonalen Gasaustauschs durch Intubation und adäquate Respiratorbehandlung. Die Indikation zur frühzeitigen Beatmung ist allgemein anerkannt. Eine Erhöhung des Sauerstoffangebotes kann auch durch eine Steigerung des Herzzeitvolumens mittels differenzierter Volumen- und Katecholamintherapie erfolgen.

2.1.8.4 Volumengabe

Die Hypotension bei Sepsis sollte primär durch Volumengabe korrigiert werden, wobei die Therapie anhand der Füllungsdrücke mit Hilfe eines Thermodilutionskatheters gesteuert wird. Jedoch scheint die großzügige Volumenapplikation bei bestehender Kapillarleckage aufgrund der kurzen intravasalen Verweildauer problematisch zu sein. Mit einer Bluttransfusion läßt sich nicht nur das Sauerstoffangebot steigern, sondern auch eine effiziente Volumentherapie betreiben, da die transfundierten Erythrozyten den Intravasalraum auch bei Kapillarleckage nicht so schnell verlassen.

2.1.8.5 Katecholamintherapie

Eine weitere Möglichkeit zur hämodynamischen Stabilisierung im septischen Schock ist der Einsatz katecholaminerger Substanzen. Dobutamin verbessert die eingeschränkte ventrikuläre Kontraktilität und erhöht das periphere Sauerstoffangebot. Als Mittel der Wahl zur Tonisierung des peripheren Gefäßsystems wird das überwiegend α -adrenerg wirkende Noradrenalin angesehen. Es kommt nach adäquater Volumensubstitution durch die Noradrenalin-induzierte Anhebung des Blutdrucks zu einer Verbesserung der Diurese.

2.1.8.6 Adjuvante Therapiemaßnahmen

Die Applikation von humanen monoklonalen IgM-Antikörper gegen die Lipid A-Struktur von Endotoxin konnte in einer Patientensubgruppe mit gramnegativer Bakteriämie die Letalität einer Sepsis senken [Ziegler 1991]. Auch ein aus der Maus gewonnener Antikörper erzielte ähnliche Resultate [Greenman 1991]. Das entsprechende zugelassene Präparat wurde aber wieder vom Markt genommen, nachdem sich in einer weiteren Studie gezeigt hatte, daß durch die Applikation eine höhere Letalität als in der Placebogruppe bei Patienten ohne gramnegative Sepsis auftrat. Der Effekt einer Applikation von Bactericidal/Permeability Increasing Protein (BPI), welches LPS nicht nur bindet, sondern auch neutralisiert, wird derzeit noch untersucht.

Eine weitere therapeutische Möglichkeit ist die Beeinflussung einer Sepsis auf Zytokin-Ebene, wobei TNF- α als zentraler Mediator gilt. Die Neutralisierung von endogen freigesetztem TNF- α durch monoklonale Antikörper konnte im Tierexperiment die Letalität reduzieren [Hinshaw 1992, Sawyer 1993]. Nachfolgend durchgeführte Multicenterstudien verliefen jedoch enttäuschend. Dies muß unter dem Aspekt gesehen werden, daß TNF- α als endogener Faktor auch protektive Effekte in der Infektion hat. Auch der Phosphodiesterasehemmer Pentoxifyllin wirkt protektiv nur in einem therapeutischen Fenster in der Frühphase der Sepsis. Er kann die TNF- α -Produktion signifikant senken, wirkt aber im Gegensatz zu Antikörpern nicht komplett blockierend. Der Einsatz von Interleukin-1 Rezeptorantagonisten (IL-1ra) wurde nach initialen Tierversuchen ebenfalls als erfolgversprechend angesehen [Alexander 1992]. Folgestudien mit klinischen Einsätzen verliefen jedoch enttäuschend.

Diese Therapieansätze berücksichtigen nur einzelne Mediatoren aus dem Zytokinbereich. In der Sepsis kommt es jedoch zur Aktivierung einer Zytokinkaskade ebenso wie verschiedener anderer Kaskaden, z. B. des Komplementsystems.

2.1.9 Tierexperimentelle Sepsis-Modelle

Auf der Suche nach einem geeigneten Tier-Modell, das unter Laborbedingungen den klinischen Verlauf der Sepsis möglichst exakt wiedergibt, wurde im Laufe der Jahre eine Vielzahl von Modell-Ansätzen an verschiedenen Tierspezies entwickelt.

Zur Sepsisinduktion wurden neben der intravenösen Gabe von Endotoxin folgende Modelle beschrieben:

- die intravenöse Infusion lebender Mikroorganismen.
- das Einbringen von Faeces oder lebender Mikroorganismen in die Peritonealhöhle.
- die Implantation von infiziertem Fremdmaterial zur Auslösung einer Abszeßbildung.
- die Schädigung durch Ischämie und/oder Perforation der Darmwand.

Seit der Entdeckung der Endotoxine und deren zentraler Rolle im Rahmen der Pathophysiologie des gram-negativen septischen Schocks, wurde eine Fülle von Untersuchungen an unterschiedlichen Tierspezies durchgeführt, in denen zur Auslösung des septischen Geschehens des Endotoxin gram-negativer Keime (*E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) intravenös appliziert wurden. Es bestehen jedoch zum einen erhebliche Unterschiede zwischen den untersuchten Tierspezies bezüglich der Endotoxin induzierten hämodynamischen und metabolischen Veränderungen.

Zum anderen läßt sich das klinische Bild der gram-negativen Sepsis durch Endotoxininjektionen im Tierversuch nicht sicher imitieren. Während es bei septischen Patienten typischerweise zu einem Abfall des systemischen Gefäßwiderstandes bei normalem oder erhöhtem Herzzeitvolumen kommt, führt z.B. die Endotoxininjektion beim Hund zu einem raschen Abfall von Blutdruck und CO₂ mit Zunahme des peripheren Gefäßwiderstandes und vermehrtem venösem Pooling im Splanchnikusbereich. Somit ist eine Übertragung der Versuchsergebnisse auf den Menschen nur bedingt möglich.

Die intravenöse Infusion lebender Mikroorganismen im Bolus oder kontinuierlich erlaubt im Tierversuch eine gut standardisierbare und dem klinischen Bild weitgehend entsprechende Sepsis-Induktion.

Im Gegensatz zur klinischen Situation mit intermittierender Freisetzung von pathogenen Keimen aus einem septischen Fokus überfordert bei Bolusinjektionen die massive Überflutung des Organismus mit Bakterien das körpereigene Abwehrsystem der zellulären und humoralen Immunität. Zur Simulation der intermittierenden Keimfreisetzung aus einem septischen Fokus wurden verschiedene Modelle entwickelt. So implantierten Weinstein et al. mit Bariumsulfat und Faezes gefüllte Gelatine-Kapseln in die Peritonealhöhle von Ratten um eine intraperitoneale Abszeßbildung bzw. Peritonitis zu provozieren (Weinstein).

Ein gutes Sepsismodel ist das von Dr. N. Zantl entwickelte Colon Ascendens Stent Peritonitis- Modell (CASP). Dieses Model ist eine Weiterentwicklung der etablierten Colon - Ligatur und Punktion (CLP). Bei dem CASP- Model wird den Mäusen in Narkose das Peritoneum eröffnet und in das Colon ascendens ein Stent eingelegt. Anschließend wird das Abdomen wieder verschlossen. Der implantierte Stent gewährleistet einen kontinuierlichen Keimaustritt von Darmbakterien in das Peritoneum, ähnlich einer Nahtinsuffizienz, wie sie nach chirurgischen Abdominaleingriffen auftreten kann. Im Gegensatz zum CLP- Modell wird die

Kontinuität des Keimaustrittes bewahrt, da ein physiologischer Wundverschluß wie z.B. nach einer Cäkum-Punktion ausbleibt.

Das CASP- Model hat im Gegensatz zu der CLP den entscheidenden Vorteil der Umkehrbarkeit des letalen Verlaufes. Denn wenn die Tiere nur 3 Stunden dem Keimaustritt ausgesetzt sind, überleben alle. Sind die Tiere jedoch über mind. 6 Stunden der Peritonitis ausgesetzt ist der Verlauf dieses Modells zu 100 Prozent letal. Daher ist dieses Model zur Evaluation der Knochenmarksfunktion bei Sepsis bestens geeignet.

2.2 KNOCHENMARK

2.2.1 Hämatopoese

2.2.1.1 Knochenmark - Städte der Blutbildung

Im Knochenmark findet sich ein günstiges Milieu für das Wachstum und die Entwicklung der Stammzelle. Das Knochenmark besteht im wesentlichen aus einem bienenwabenförmigen, aus Retinakulumzellen und Fasern bestehenden Gerüst und einem Netzwerk von kleinsten Blutgefäßen.

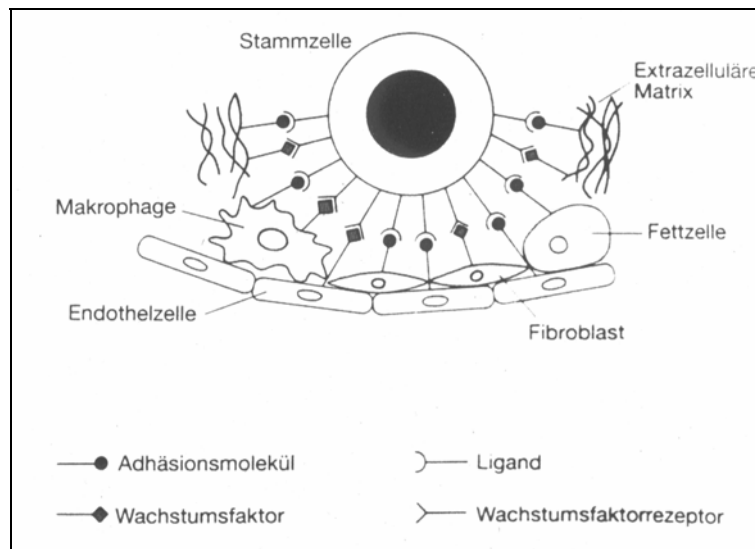


Abbildung 5 Die Blutbildung findet in einem Mikromilieu statt, das durch die Stromamatrix gebildet wird. Dabei gibt es spezifische Erkennungs- und Adhäsionsorte.

Man geht davon aus, daß alle Zellen der Lympho- und Hämatopoese eine gemeinsame Vorläuferzelle haben, die totipotente Stammzelle, aus der die verschiedenen pluripotenten Stammzellen der Erythropoese (Proerythroblasten), Granulozytopoese (Myeloblasten) und Megakaryozytopoese (Megakaryoblasten) hervorgehen.

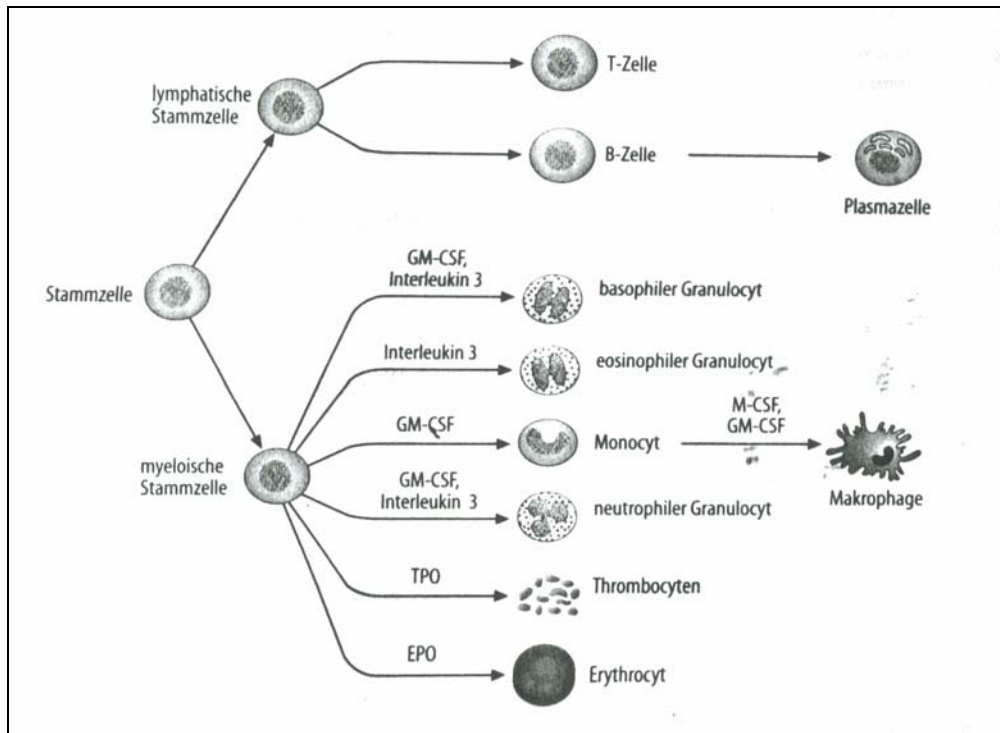


Abbildung 6 Die Entwicklung der einzelnen Blutzelllinien

Im Frühstadium der Fetalentwicklung finden sich im Dottersack die günstigsten Bedingungen für das Überleben und die Proliferation der Stammzellen, während in der späten Fetalentwicklung Leber u. Milz das geeignete Milieu bilden. Ab dem 6. bis 7. Fetalmonat ist das Knochenmark das wichtigste Organ für die Hämatopoese.

Fetus	0-2 Monate: Dottersack 2-7 Monate: Leber, Milz 5-9 Monat: Knochenmark
Kinder	Knochenmark (praktisch alle Knochen)
Erwachsener	Wirbelkörper, Rippen, Sternum, Schädel, Kreuzbein, Beckenknochen, prox. Ende von Humerus und Femur

Tabelle 2 Ort der Hämatopoese in Abhängigkeit vom Alter

2.2.2 Zellzyklus

2.2.2.1 G1-Phase / S-Phase

Die Zellzyklusprogression wird in der G1-Phase durch Wachstumsfaktoren gesteuert. Neben Wachstumsfaktoren können auch andere Faktoren die Signaltransduktionsketten induzieren, wie z. B. UV Licht, Stress, Hypoxie, Zytokine, bakterielles Lipopolysaccharid und Mediatoren, die nach Entzündungen aktiviert werden.

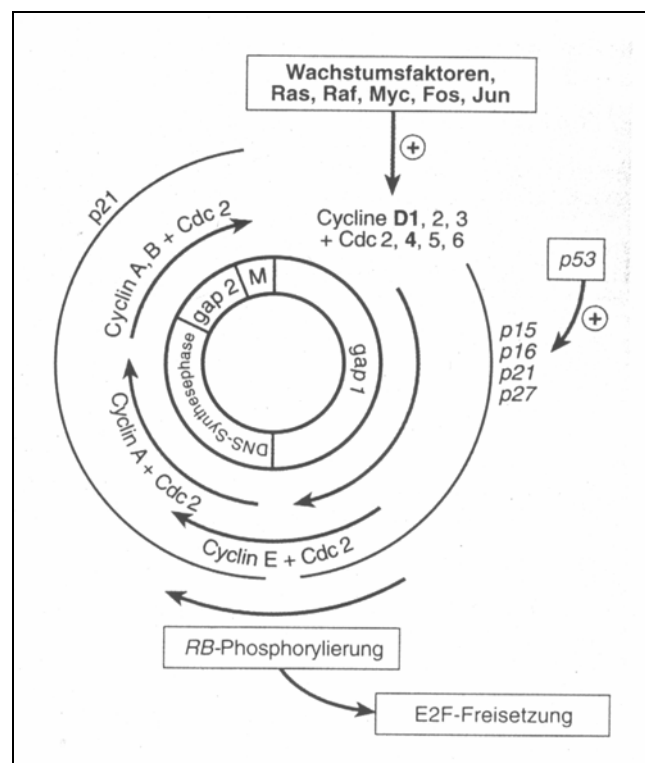


Abbildung 7 Der Zellzyklus und an seiner Regulation beteiligte Proteine. *Cdk*, *Cdc*: cyclinabhängige Proteinkinasen; *p15*, *p16*, *p21*, *p27*: Inhibitoren der Cdk, Cdc.

Die S-Phase des Zellzyklus beginnt mit dem Einsetzen der DNA-Replikation. Bei diesem Prozeß muß gewährleistet sein, daß die Verdoppelung des genetischen Materials ohne Fehler stattfindet. Außerdem muß verhindert werden, daß es zu einer Rereplikation kommt, d. h. das Erbgut darf nur einmal repliziert werden. Die molekularen Prozesse, welche die S-Phase regulieren sind noch nicht vollständig

bekannt. Es ist jedoch klar, daß auf der einen Seite Cyklin/CDK-Komplexe sowie Cyklin-Inhibitoren (CKI) eine wichtige Rolle spielen und auf der anderen Seite die Enzyme des DNA-Metabolismus wie z. B. Thymidinkinasen und DNA-Polymerasen. Beim Übergang von der G 1 - in die S-Phase verlieren die Zellen ihre Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren am sog. „*restriction point*“. Solche Zellen sind unwiderruflich verpflichtet, in die S-Phase einzutreten und den Zellzyklus zu durchlaufen [30,31]. Der G 1 /S-Übergang wird durch verschiedene CDKs reguliert. Die aktiven Cyclin D/CDK4- und Cyclin D/CDK6- Kinasen phosphorylieren pRB und setzen so den E2F-Transkriptionsfaktor frei, der dann eine Reihe von Genen aktiviert, die für die DNA-Synthese notwendig sind [8]. Dies sind z. B. die Thymidinkinase, die Dihydrofolatreduktase, Thymidylatsynthase, die DNA-Polymerase μ , cdc2, Cyclin E, Cyclin A und c-myc. Der Tumorsuppressor pRB kann als eigentlicher Regulator des *restriction point* angesehen werden. Cyclin E/CDK2 wurde als essentiell für die S-Phase-Regulation identifiziert. Zusätzlich spielt Cyclin A/CDK2 eine wichtige Rolle für die S-Phase-Regulation. Cyclin A erfüllt interessanterweise mehrere Funktionen:

1. es ist notwendig für die S-Phase-Induktion
2. es kontrolliert über die Cyclin A/CDK1 (cdc2)-Kinase die Mitose.

Nach erfolgter DNA-Replikation verlassen die Zellen die S-Phase und der Zellzyklus läuft weiter in die G 2 -Phase.

2.2.2.2 G 2 -/Mitose –Phase

In der G 2 -Phase beginnt die Kondensierung des Chromatins, damit in der Mitose die Chromosomensätze an die Tochterzellen weitergegeben werden können. In der G 2 -/M-Phase sind die mitotischen CDKs aktiv. Diese bestehen aus Cyclin A/CDK1 und Cyclin B/CDK1. Die Mitose wird in allen Organismen durch Cyclin B/CDK1 initiiert. Cyclin B/CDK1 phosphoryliert Histon H1 und Lamine, was dazu führt, dass das Chromatin kondensiert und die Kernmembran sich auflöst. Die Phosphorylierung von Histon H1 verursacht eine Dissoziation des Linker-Histons von der DNA, und die Lamin Phosphorylierung verhindert eine Polymerisierung dieses Proteoglykans. Gleichzeitig bildet sich die mitotische Spindel aus. Von den Centrosomen ausgehend bilden sich Mikrotubuli, die sich mit dem Kinetochor im Centromer eines jeden Chromosoms verbinden. Während der Metaphase erfolgt eine Anordnung der Chromosomen zwischen den Spindelpolen als Metaphasenplatte. In der Anaphase

werden die Schwester-Chromatiden auseinandergezogen. In der Telophase muß Cyklin B abgebaut werden, damit die Zellen in die Interphase gelangen können. Cyklin B enthält im N-Terminus eine sog. *cyclin destruction box*. Diese Signalsequenz ermöglicht eine Ubiquitylierung von Cyklin B und den Abbau durch Proteasomen. Der Abbau von Cyklin A erfolgt ähnlich, ist aber noch nicht vollständig bekannt.

2.2.3 Stammzelle

Bei ca. 1-3% der kernhaltigen Zellen im Knochenmark handelt es sich um Stammzellen. Es wird angenommen, daß wenige, vielleicht einige 100-1000 der sehr unreifen Stammzellen ausreichen, die gesamte Blutbildung eines Menschen ein Leben lang zu gewährleisten.

Der Bestand der Stammzellen wird durch Reduplikation aufrechterhalten, dabei besitzen die undeterminierten Stammzellen die Fähigkeit, in allen Blutzelllinien auszureifen. Da ihre Teilungsaktivität gering ist werden sie auch als sogenannte „sleeper cells“ bezeichnet. Im Gegensatz dazu sind die determinierten Stammzellen nur noch in eine bestimmte Richtung einer Blutzelllinie entwicklungsfähig. Durch Proliferation und Differenzierung entstehen aus diesen unreifen Vorstufen die funktionsfähigen Zellendstufen. Diese determinierten Stammzellen füllen somit die Proliferationspeicher auf und werden deshalb auch als „feeder cells“ bezeichnet (RIEDE und SCHÄFER,1995). Die Richtung der Differenzierung von Stamm- und Vorläuferzelle hängt vor allem von der Art der Wachstumsfaktoren ab, denen sie ausgesetzt sind. Die Stammzelle hat die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und trägt damit dazu bei, daß das gesamte Knochenmark beim Gesunden in einem Gleichgewicht konstant bleibt.

Das Zellerneuerungssystem des Knochenmarks kann in vier verschiedene Kompartimente untergliedert werden:

1. Kompartiment = Stammzellkompartiment, mit einer hierarchischen Gliederung lebenslang proliferierender Vorläuferzellen.
2. Kompartiment = Proliferationskompartiment, hier erfolgt die Proliferation und Differenzierung der unreifen hämatopoetischen Zellen.
3. Kompartiment = Reifungskompartiment, die proliferative Aktivität erlischt und die Zellen differenzieren vollständig aus.
4. Kompartiment = Funktionskompartiment, die völlig ausdifferenzierten Zellen treten in dieses Kompartiment über, aus dem sie bei entsprechender Stimulation wie z.B. verstärkter Verbrauch und Abbau in das periphere Blutsystem auswandern (RIEDE und SCHÄFER, 1995).

Experimentell kann man die Entwicklung von Stammzellen und Vorläuferzellen in "Colony Forming Assays" verfolgen. In einem speziellen Medium, das Methylzellulose, Erythropoetin und verschiedene Wachstumsfaktoren enthält, bilden sich nach ca. 10 Tagen aus jeweils einer Stammzelle Colony-forming units (CFU) und nach 14 Tagen Burst-forming units.

Aus der frühesten nachweisbaren myeloischen Vorläuferzelle entwickeln sich Granulozyten, Erythrozyten, Monozyten und Megakaryozyten, sie werden als CFU-GEMM bezeichnet.

In der erythroiden Reihe entwickeln sich via "burst-forming units" (BFU-E) aus den Erythroblasten die kernlosen Erythrozyten, die den Sauerstoff transportieren. Unter dem Einfluß von Interleukin-3 und GM-CSF (Granulocyte-Macrophage-Colony-Stimulating Factor) entstehen die CFU-GM, die später entweder über das Stadium der Monozyten in die Makrophagen oder in die neutrophilen Granulozyten differenzieren. Die basophilen und eosinophilen Granulozyten entwickeln sich via CFU-B und CFU-Eo. Die Monozyten und Granulozyten gehören zu den Phagozyten, die für die Immunabwehr am Infektionsherd verantwortlich sind. Schließlich entwickeln sich aus der pluripotenten Stammzelle die Zellen der lymphatischen Reihe, die T- und B-Lymphozyten. Die Lymphozyten sind für die adaptive Immunantwort verantwortlich.

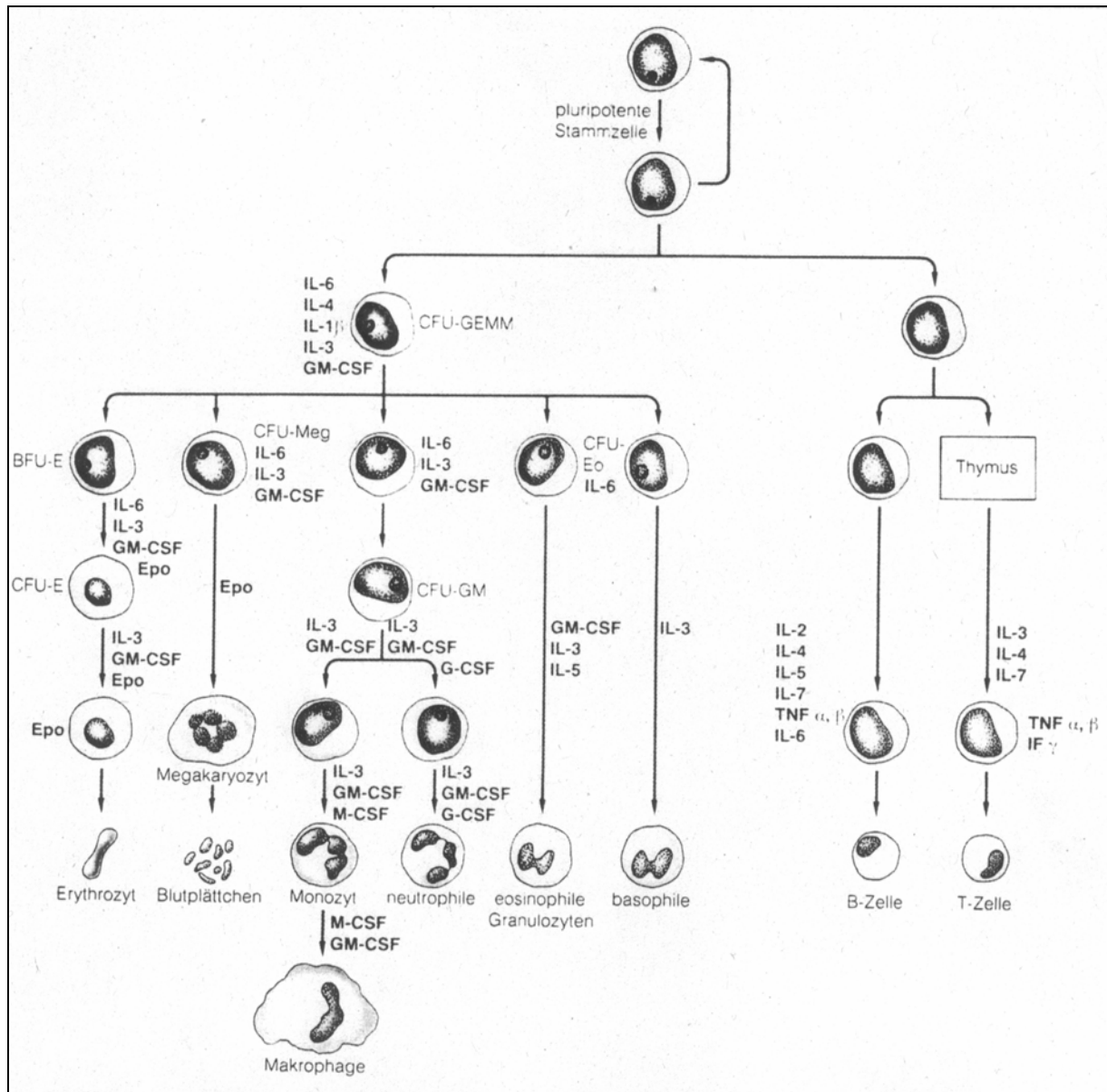


Abbildung 8 Interaktion zwischen der hämatopoetischen Entwicklung und Wachstumsfaktoren

2.2.4 Regulation der Knochenmarksproliferation

Die Regulation der Hämatopoese unterliegt dem Einfluß komplexer Mechanismen, die hämatopoetischen Zellen sind abhängig von dem lokalen Mikromilieu („microenvironment“). Dieses Microenvironment besteht aus verschiedenen Stromazellen, sezernierten und membran-gebundenen Zytokinen und einer komplexen extrazellulären Matrix. Die nicht- hämatopoetischen, seßhaften

Stromazellen synthetisieren und sezernieren sowohl Cytokine wie CSF's, Interleukine und Interferone als auch Proteine der extrazellulären Matrix wie Kollagene, Laminine und Proteoglycane (DORSHKIND et al., 1990; GREENBERGER et al., 1991; BEGEMANN et al., 1992). Das Microenvironment des Knochenmarks ist verantwortlich für die kontrollierte Retention reifender Zellen und Differenzierungs- und Proliferationsstimuli der hämatopoetischen Zellen. Ein wechselseitiges Zusammenspiel von adhäsiven und anti-adhäsiven Komponenten der extrazellulären Matrix wie auch membranständigen Molekülen auf Oberflächen der Stromazellen ist für das Verbleiben der unreifen Zellen im Knochenmark notwendig. Reifende hämatopoetischen Zellen exprimieren je nach Entwicklungsstatus verschiedene Rezeptoren und Zelladhäsionsmoleküle (CAMs= cell adhesion molecules).

Besonders das Wirkungsspektrum der beteiligten Zytokine, deren Wirkungen sowohl autokrin als auch parakrin vermittelt werden (BEGEMANN, 1992) haben einen entscheidenden Effekt auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose der blutbildenden Zellen.

Colony-stimulating- factor (CSF)	H-subunit ferritin
Granulocyte-Macrophage (GM)- CSF	Prostaglandin (PG) E ₁ und E ₂
Granulocyte (G)-CSF	Tumor-Necrose-Faktor (TNF)- α , - β
Eosinophil (EOS)- CSF	Interferon (IFN) - α , - β , - γ
(entspricht: IL-5)	Transforming growth factor (TGF) - β
Macrophage (M)-CSF	Activin
Multi-CSF	Inhibin
(entspricht: IL-3)	Leukemic inhibitory factor
Erythropoietin (EPO)	Oncostatin M
Genetically engineered CSFs	Chemokine
GM-CSF/IL-3 fusion protein (PIXY321)	Macrophage inflammatory protein (MIP)
IL-3/GM-CSF fusion protein	MIP 1 α ; MIP 1 β ;
	GRO- α
	GRO- β (MIP 2 α)
Interleukins (IL) (die nicht unter CSFs und Chemokine aufgeführt sind)	GRO- γ (MIP 2 β)
IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-11,	Platelet factor 4
IL-12, IL-13	IL-8
Non-CSFs, non-ILs	
Steel factor (SLF)	
Erythroid potentiating activity (EPA)	
Lactoferrin (LF)	

Tabelle 3 Zytokine und Wachstumsfaktoren, die zur Regulation der Hämatopoese beitragen.

Der Ort der Blutbildung oder Hämatopoese ist das Knochenmark. In den Knochenmarknischen befinden sich neben verschiedenen anderen Zellen die Ursprungszellen aller Blutzellen, die blutbildenden oder hämatopoetischen Stammzellen. Ganz unreife Stammzellen haben die Potenz, alle Blutzellen zu generieren, die roten (Erythrozyten), weißen (Leukozyten) und auch die Blutplättchen (Thrombozyten). Das ist ein überaus aktiver Prozeß. Beispielsweise sind die Leukozyten (ausgenommen einige Lymphozytenpopulationen) die kurzlebigsten Zellen im Organismus und werden innerhalb weniger Tage im Blut vollständig erneuert. Nicht viel anders verhält es sich mit den Blutplättchen, die im Grunde Zellplasmaabspaltungen großer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark sind. Etwas länger leben die hochspezialisierten kernlosen Erythrozyten. Nach 120 Tagen ist die Hälfte der roten Blutzellen durch neue ersetzt. Die hämatopoetischen Stammzellen haben damit eine sehr hohe Kapazität zu Teilung, Vermehrung und Differenzierung. Es konnte nachgewiesen werden, daß im Knochenmark etwa 13 Zellteilungen stattfinden müssen, um aus der unreifsten Stammzelle die funktionierende Blutzelle entstehen zu lassen.

Dieses Schema der Blutbildung aus einer hämatopoetischen Stammzelle wurde bereits 1909 durch den russischen Arzt Maximow als Hypothese während einer Vorlesung an der Berliner Charité entwickelt und in der *folia haematologica* publiziert. Der Nachweis, daß eine blutbildende Stammzelle tatsächlich in der Lage ist, alle Blutzellen zu generieren, gelang erst 60 Jahre später mit Hilfe von *in vitro* Experimenten in funktionellen Testsystemen.

2.2.5 Regulationsmechanismen der Hämatopoese

2.2.5.1 Hämatopoetische Wachstumsfaktoren und Zelldifferenzierung

Hämatopoetische Wachstumsfaktoren sind Glykoprotein- Hormone, welche die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen determinierten Stammzellen und die Funktion von ausgereiften Blutzellen regulieren.

Die Erkenntnis, daß zirkulierende Faktoren die Produktion der roten Blutkörperchen anregen, stammt aus der Arbeit von Carnot und Mitarbeitern aus dem Jahre 1906, in welcher die Erythropoese gesunder Kaninchen durch infundiertes Plasma aus

anämischen Tieren angeregt wurde [Carnot 1906]. In den sechziger Jahren entwickelten Pluznik und Mitarbeiter sowie eine Arbeitsgruppe um Bradley semisolid Kultursysteme, um Knochenmarks-Vorläuferzellen in vitro zu kultivieren [Pluznik 1965, Bradley 1966]. Das führte zu der Identifizierung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren. Aufgrund ihrer Potenz, Zellkolonien aus einzelnen Knochenmarks-Vorläufern zu induzieren, wurden sie als "Kolonie-stimulierende Faktoren" bezeichnet. Daneben konnte noch die Hämatopoese-stimulierende Potenz einiger Zytokine nachgewiesen werden.

Derzeit liegt die Indikation für eine klinische Applikation von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren in drei Bereichen:

1. die Wiederherstellung der Hämatopoese nach iatrogenen oder krankheitsbedingten.
2. Stimulierung und Produktion von funktionell vorbereiteten Effektorzellen mit Anti-Tumor Potenz, welche ebenso auch zu einer allgemeinen Wirtsabwehr befähigt sind.
3. Bekämpfung von malignen Erkrankungen durch Differenzierungsinduktion allein oder mit zusätzlicher Rekrutierung von Zellen in die S-Phase, um so die zytotoxische Aktivität von zirkulierenden Wirkstoffen zu unterstützen.

2.2.6 Kolonie- stimulierende Faktoren (CSF)

Diese Gruppe von in den hämatopoetischen Regelkreis eingreifenden Mediatoren setzt sich aus 4 gut charakterisierten Glykoproteinen zusammen, die einen stimulierenden Einfluß auf die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen ausüben. Diese Faktoren werden nach der Zielzelle auf die sie wirken benannt. Somit unterscheidet man das Multi-CSF (I-L3), Granulozyten-Makrophagen-CSF (GM-CSF), Granulozyten-CSF (G-CSF), Makrophagen-CSF (M-CSF) und das Erythropoietin (EPO, ESF = erythropoiesis stimulating factor).

Während IL-3 eine proliferationssteigernde Wirkung auf multipotente Stammzellen hat, nimmt GM-CSF Einfluß auf bipotente Vorläuferzellen und M-CSF bzw. G-CSF auf die Monozyten- und Makrophagen- bzw. Granulozytenausreifung.

Das Glykoprotein GM-CSF wird von T-Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen und Endothelzellen freigesetzt und bewirkt das Wachstum von Granulozyten- und

Makrophagenkolonien. Des Weiteren führt GM-CSF zu der Aktivierung von Makrophagen sowie neutrophiler und eosinophiler Granulozyten.

GM-CSF entfaltet seine Wirkung über die Bindung an einen Hochaffinitätsrezeptor, der u.a. auf reifen neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und eosinophilen Granulozyten gefunden werden kann. Erst nach Bindung an einen auf Granulozyten befindlichen Rezeptor greift G-CSF in den Regelkreis der Hämatopoese ein. Neben einer Induktion von Wachstum und Differenzierung reiferer Formen der Granulopoese wird G-CSF eine Rolle bei der Proliferation und Migration von Endothelzellen zugeschrieben. Zu der Einflußnahme der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren auf die Kinetik des Wachstums von Progenitorzellen und deren Differenzierung können diese auch die Lebenszeit und die Funktion der ausgereiften Blutzellen regulieren. So potenziert G-CSF die Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten, deren antimikrobielle Aktivität und die Produktion von Zytokinen [Vadas 1983].

Das therapeutische Einsatzgebiet von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren ist weit [Glaspy 1989]. Hier einige Beispiele, bei welchen G-CSF am Patienten eingesetzt wird:

- AIDS (als Begleittherapie zur antiretroviralen, antimikrobiellen und antitumoralen Medikation)
- Krebstherapie (zum Ausgleich einer myelotoxischen Therapie sowie einer Leukämie (z. B. Haarzell-Leukämie))
- Knochenmarktransplantation (zur raschen Wiederherstellung der Hämatopoese)
- aplastische Anämie (vereinzelt nach Krankheitsausprägung)
- Neutropenie (z. B. in einer kongenitalen Agranulozytose, der zyklischen Neutropenie oder auch bei neutropenischen Frühgeburten).

2.2.6.1 Granulozyten- Colony-stimulating-Factor (G-CSF)

Humanes G-CSF wurde zunächst aus humanen Zelllinien und Plazenta isoliert [Nicola 1985, Welte 1985, Nomura 1986]. Es wird inzwischen geklont und exprimiert in Bakterien und Säugetierzellen [Nagata 1986a, Nagata 1986b, Souza 1986, Komatsu 1987]. Es hat ein Molekulargewicht von 18-22 kDa. Das nicht-glykosilierte, bakteriell synthetisierte Molekül spielt heute die dominante Rolle im klinischen

Einsatz und in Studien. G-CSF wird, wie auch die anderen Wachstumsfaktoren auf je einem Gen kodiert. Für humanes G-CSF wurde dieses Gen auf dem Chromosom 17 lokalisiert [Simmers 1987]. G-CSF, welches in etwa 10 % der Seren gefunden werden kann, wird von Monozyten [Vellenga 1988], Fibroblasten und Endothelzellen [Bagby 1986, Koeffler 1987, Kaushansky 1988, Sieff 1988] produziert.

2.2.6.2 Erythropoetin (EPO)

Erythropoetin (EPO, ESF = erythropoiesis stimulating factor) wurde in den 50er Jahren das erste Mal von BORSOOK et al. in einem tierexperimentellen Rattenmodell isoliert. Dabei handelt es sich um ein Glykoprotein, das zu 90% in den Nieren synthetisiert wird und hauptsächlich auf die Proliferation und Differenzierung der roten Zellreihe Einfluß hat. Der genaue Wirkungsmechanismus dieses Peptidhormons ist bis heute noch nicht ganz geklärt. Man nimmt aber an, daß es zu einer Änderung des Phosphorylierungsgrades verschiedener Proteine kommt, was zur Aktivierung des eigenen EPO-Rezeptors und Anstieg der intrazellulären freien Kalzium-Konzentration kommt (VRENGDENHIL et al., 1993).

2.2.7 Wachstumsfaktoren und Inflammatorische Prozesse

Wachstumsfaktoren werden in großen Mengen als Antwort auf inflammatorische Prozesse nach Aktivierung der Produktionszelle synthetisiert. Antigene, Lektine oder Interleukin-1 induzieren T-Lymphozyten zur Produktion von GM-CSF und IL-3 [Wong 1985, Hermann 1988, Otsuka 1988]. Monozyten setzen G-CSF und GM-CSF nach einer Stimulierung durch Endotoxin frei. Die Freisetzung von M-CSF aus den Monozyten kommt erst nach einer Stimulierung mit Faktoren aus aktivierten T-Zellen, wie zum Beispiel IFN- γ , IL-3 und GM-CSF oder nach einer Exposition mit TNF- α [Horiguchi 1987, Vellenga 1988] zustande. TNF- α und IL-1, beide aus aktivierten monozytären Zellen stimulieren außerdem Fibroblasten und Endothelzellen zur Produktion von GM-CSF und G-CSF [Bagby 1986, Broudy 1986, Munker 1986, Zucali 1986, Koeffler 1987, Kaushansky 1988, Sieff 1988]. Dieses Netzwerk aus inflammatorischen Stimuli und Zytokinen deutet an, daß diese Wachstumsfaktoren

eine limitierende Rolle in der Hämatopoese und andererseits eine bedeutsame Rolle in der Wirtsreaktion auf eine Infektion oder Antigen-Präsentation spielen.

2.2.8 Apoptose

2.2.8.1 Definition

Bei dem programmierten Zelltod oder der Apoptose handelt es sich um die Aktivierung eines Programms, das in den Tod und der kompletten Auflösung der Zelle mündet. Die Apoptose ist für die normale Entwicklung notwendig, die Fehlregulation hingegen führt zu einem weiten Spektrum an Defekten, das vom embryonalen Abort bis zur Entwicklung von Karzinomen reicht. Therapeutika die Einfluß auf die Apoptose nehmen, würden eine neue Ära in der Behandlung von Karzinomen, Lymphomen, Entzündungen und Immundefekten eröffnen.

2.2.8.2 Vorkommen

Die Apoptose repräsentiert den programmierten Zelltod und ein konstanter Bestandteil der Zellmauserung. Daneben ist die Apoptose für alle diejenigen Atrophieformen typisch, die mit einem Zellverlust einhergehen. Sie ist auch ein Weg, über den sich der Organismus nach überstandener Entzündung überschüssiger Granulozyten oder Lymphozyten entledigt und kommt auch dann vor, wenn Spenderlymphozyten die Wirtszellen im Rahmen einer Graft-versus-host-Reaktion angreifen. Bei einigen hämatologischen Tumoren ist eine defekte Apoptose ein wesentlicher Schritt in der Tumorgenese. Die Zellen werden unsterblich und häufen sich im Gewebe an. Ein Beispiel dafür ist die chronisch-lymphatische Leukämie.

2.2.8.3 Regulation der Apoptose

In die Regulation der Apoptose sind im wesentlichen drei Kategorien an Genen involviert. Dabei handelt es sich einerseits um Gene, welche die Apoptose vorwiegend unterdrücken, wie viele der bcl-2 Gengruppe, andererseits um solche,

welche die Apoptose aktivieren, wie zum Beispiel die Interleukin-1 β converting enzyme (ICE) Gengruppe. Die dritte Gruppe nimmt eine Zwischenstellung ein. Zu ihr zählen die Gene für den Fas/Fas Liganden, p53, WAF1.

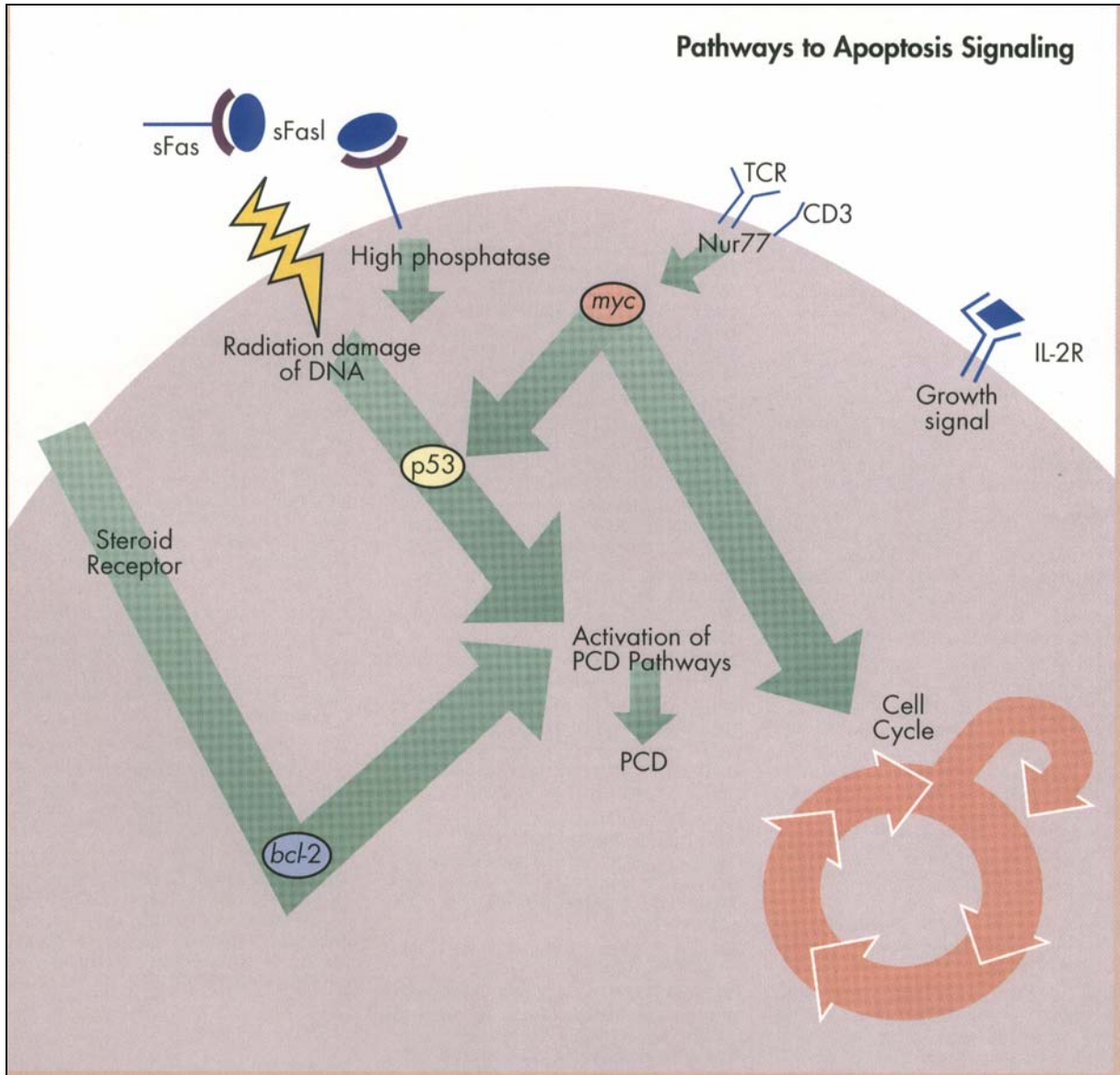


Abbildung 9 Mechanismen die eine Apoptose auslösen können.

2.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO), „Molekül des Jahres“ 1992 der Zeitschrift „Science“ und ursprünglich als „Endothelium Derived Relaxing Factor“ identifiziert, wird eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des hyperdynamen Kreislaufversagens im Verlauf des septischen Schock zugeschrieben.

Die Fähigkeit von Säugetierzellen, Stickoxid (NO) zu synthetisieren, wurde erstmals 1980 beschrieben. Im darauffolgenden Jahrzehnt wurden Fortschritte im Verständnis der biologischen Funktion von NO gemacht. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde NO nur als farbloses, umweltschädigendes Gas, das zum Beispiel bei dem Betrieb von Kraftfahrzeugen oder beim Rauchen von Zigaretten entsteht, betrachtet. Heute gilt NO als beinahe allgegenwärtiger biologischer Mediator, der an der Pathogenese von so verschiedenen Krankheiten, wie Hypertonie, Asthma, Demenz und Sepsis beteiligt ist.

2.3.1 Konstitutionelle und induzierbare NO- Synthese

Die Endothel-abhängige Vasorelaxation wurde zuerst von Furchgott und Zawadzki beschrieben. Im Jahre 1987 wurde NO als „Endothelial Derived Relaxing Factor“ (EDRF) von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen identifiziert (Wood et al., Moncada et al.).

NO wird aus L-Arginin durch das konstitutionelle, Ca^{2+} - abhängige Enzym NO-Synthase nicht nur im Endothel, sondern auch in einer Vielzahl anderer Gewebe wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten oder Thrombozyten gebildet. Aufgrund seiner Lipophilie penetriert NO rasch Zellmembranen, aktiviert in den Zielzellen die lösliche Guanylatzyklase und erhöht somit den Anteil an zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP). In der glatten Muskelzelle führt dieser Anstieg zu einer Erniedrigung des intrazellulären Kalziumgehaltes mit anschließender Relaxation der glatten Muskelzelle. NO wird durch Hämoglobin, Myoglobin und freie Radikale rasch inaktiviert, so daß die Halbwertszeit in biologischen Geweben nur wenige Sekunden beträgt. Inaktivierte Endprodukte des L-Arginin/NO-Stoffwechsels sind Nitrate und Nitrite. Durch Analoge des Substrats L-Arginin wie N^G -L-Arginin-

Methyl-Ester (L-NAME) oder N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) wird die Biosynthese von NO stereospezifisch und kompetitiv inhibiert.

Die ständige endotheliale Freisetzung von Stickoxid ist verantwortlich für einen basalen vasodilatativen Gefäßtonus. Stickstoffmonoxid wirkt nicht nur im Gefäßsystem als „cell-cell-messenger“, sondern auch im zentralen und peripheren Nervensystem. Darüber hinaus moduliert NO die Thrombozytenfunktion, die intravasale Adhäsion von Leukozyten, die Nierenfunktion und beeinflusst die glatte Muskulatur der Atemwege und des Gastrointestinaltraktes.

Mitte der 80er Jahre wurde durch Stuehr und Marletta gezeigt, daß Makrophagen der Maus nach Kontakt mit Endotoxin Nitrate und Nitrite produzieren. Nachfolgende Arbeiten ergaben dann, daß Stickoxid das primäre Produkt Endotoxin-aktivierter Macrophagen ist, dessen Synthese von der Aminosäure L-Arginin abhängt und durch L-Arginin-Analoga blockiert wird. Endotoxine und andere Immunstimulatoren wie Tumornekrosefaktor (TNF) und andere Zytokine (z.B. Interleukin-1 β) induzieren die NO-Synthese jedoch nicht nur in Makrophagen, sondern auch in anderen Geweben wie in Endothelzellen, in Hepatozyten und in der glatten Gefäßmuskulatur.

2.3.2 NO Synthese

Unter physiologischen Bedingungen entsteht NO enzymatisch unter Katalyse der Nitroxid- Synthase (NOS), einem autarken P450 Enzym- Komplex, aus dem endständigen Stickstoff des Guanidin Anteils der Aminosäure L-Arginin. Dabei wird L-Arginin zu L-Citrullin abgebaut, welches in den Harnstoffzyklus eingeschleust wird.

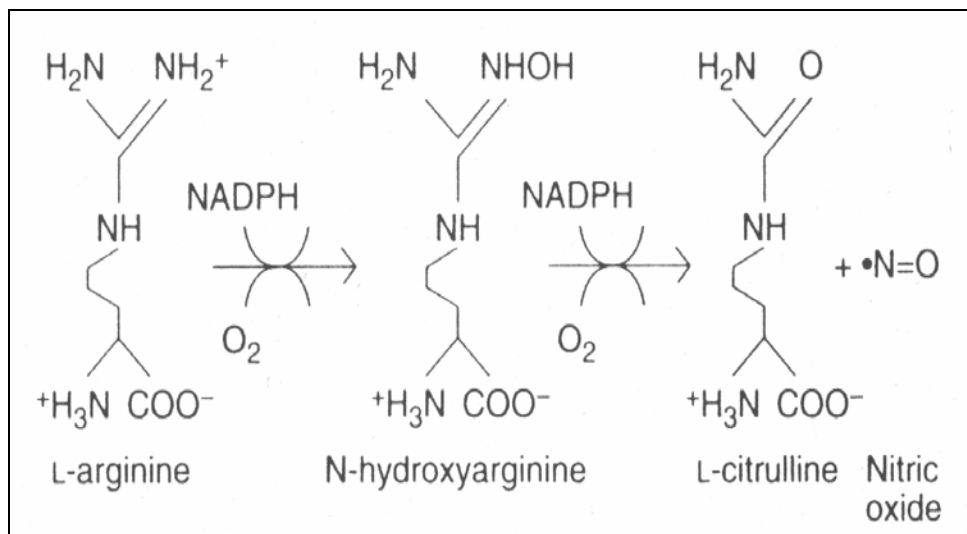


Abbildung 10 Darstellung der chemische Reaktion in der Synthese von Stickoxid. L-Arginin wird zu L-Citrulin und Stickoxid umgewandelt.

Das hochreaktive Radikal NO wird im biologischen Milieu innerhalb weniger Sekunden zu den stabilen Endprodukten Nitrit (NO₂⁻) und Nitrat (NO₃⁻) weiteroxidiert oder an Reaktionspartner, wie Häm- oder Thiolgruppen, gebunden. (Marletta 89, Moncada 91, Nathan 92).

Bis heute sind drei bedeutende Isoformen der NOS identifiziert: endothelial NOS (eNOS oder Typ 3) und neuronal NOS (nNOS oder Typ 1), welche konstitutiv expremiert werden und zusammen als konstitutive NOS bezeichnet werden (cNOS). Die Synthese der induzierbaren NOS (iNOS oder Typ 2) muß erst durch Endotoxine und Entzündungsmediatoren (Liu SF 93) in Makrophagen induziert werden.

Die induzierte NOS setzt die 1000-Fache Menge NO frei als die konstitutive NOS und die Produktion wird über Stunden aufrechterhalten. Deswegen ist der Effekt von NO, das von iNOS freigesetzt wird, wesentlich ausgeprägter und effektiver. Eine entscheidende Tatsache, die Festlegt ob die Folgen der NO-Freisetzung unter den jeweiligen klinischen Umständen förderlich oder nachteilig für die Gesundheit sind.

	nNOS	eNOS	iNOS
Chromosomen Lokalisation	12	7	17
Zellbestandteil	zytosolisch	membrangebunden	zytosolisch
Zellart	Neuronen Skelettmuskulatur	Endothel Thrombozyten Endocard Myocard	Immunzellen Vascular smooth muscle Endothel Endo/Myocard Hepatozyten Astrozyten Fibroblasten
Aktivierung	Kalziumabhängig	Kalziumabhängig	Kalziumunabhängig
Regulation			Glukokortikoide und Protein Synthese inhibitoren hemmen die Induktion
Antwort auf Stimulation	Konstitutionel	Konstitutionel	Induktion durch LPS/Zytokine führt nach 3-6 Stunden zu einer massiven NO-Produktion
	kurzzeitige Freisetzung (Sek.)	kurzzeitige Freisetzung (Sek.)	langfristige Freisetzung (Minuten/Stunden)
Freisetzungsmenge	NO-Freisetzung im Picomolarbereich	NO-Freisetzung im Picomolarbereich	NO-Freisetzung im Nanomolarbereich
Nonselective Hemmung	L-Arginin Analoge	L-Arginin Analoge	L-Arginin Analoge
Selective Inhibition			Aminoguanidin (in Entwicklung)

Tabelle 4 Auflistung der Unterschiede der einzelnen NO-Synthasen

Die Wirkung von NO hängt entscheidend von der Konzentration in der Effektorzelle ab. In kleineren Mengen wirkt NO, das dann in den meisten Fällen von der konstitutionellen NO-Synthese produziert wurde, in erster Linie regulativ über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase mit konsekutiver cGMP Erhöhung. In höheren Konzentrationen die fast ausschließlich durch die induzierbare NO-Synthese freigesetzt werden, entwickelt NO unabhängig von cGMP-Veränderungen zytostatische und zytotoxische Wirkungen durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette und der zellulären DNA-Synthese, sowie durch die Hemmung der Proteinbiosynthese. Darüber hinaus ist NO das Substrat der Synthese hochreaktiver freier Radikale wie z.B. Peroxynitrit.

2.3.3 Regulation der iNOS

Die Regulation der iNOS Synthese ist ein komplexer Vorgang, da er einer Vielzahl von transkriptionellen, posttranskriptionellen und posttranslationellen Mechanismen innerhalb der verschiedenen Zellarten unterliegt.

2.3.3.1 Transkriptionelle Regulation

Im Gegensatz zu den konstitutiven NOS enthält die iNOS ein fest gebundenes Kalmodulin Molekül. Dieses bewirkt die vollständige Aktivität des Enzyms auch bei niedrigen Kalziumkonzentration (Stuehr 91). Daher kann man davon ausgehen, daß die Transkription der iNOS-Genes eine wichtige Rolle in der Regulation des NO spielt. Die Transkription des iNOS-Genes wird sowohl in positive als auch negative Richtung von einer Reihe von proinflammatorischen Zytokinen reguliert. Ein geeigneter Stimulus, wie IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , Endotoxine oder Exotoxine, induzieren die NOS in den jeweiligen Zellen durch Gen Transkription, möglicherweise über den Transkriptionsfaktor Nuclear Faktor- kappa B (NF- κ B). Dieser Prozeß kann mit Glukokortikoiden unterbunden werden (Adcock IM 94).

Die NOS-Gen Expression kann aber auch auf posttranskriptionellen Weg reguliert werden. Dies geschieht wahrscheinlich indem die Stabilität der neu transkribierten mRNA verändert wird. (Vodovotz 93, Cetkovic-Cvrlje 93).

2.3.3.2 Die posttranslatorische Regulation

Die Verfügbarkeit an intrazellulärem L-Arginin spielt dabei eine entscheidende Rolle, da es der einzige physiologische Stickstoff- Donor bei der NO-Synthese ist. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, daß Hepatozyten, Makrophagen und pulmonale, arterielle Endothel Zellen auf die Stimulation durch proinflammatorischen Mediatoren mit einer Steigerung des L-Arginintransportes und anschließender erhöhter NO-Produktion reagieren (Bogle 92, Inoue 93, Lind 93). In Makrophagen scheint für den L-Arginintransport der kationische Aminosäuretransporter MCAT-2B, der in der Plasmamembran lokalisiert ist, verantwortlich zu sein. Er transportiert L-Arginin aus dem Extrazellulärraum in den Intrazellulärraum (Closs 93). Die L-Arginin-Konzentration kann auch noch durch intrazellulären Proteinabbau und durch endogene Synthese in Leber und Niere reguliert werden.

Es werden Kofaktoren benötigt, um das NO in seine aktive Form zu überführen. Wichtige in die Regulation der NO-Synthese eingreifende Kofaktoren sind NADPH als Elektron Donor (Stuehr und Griffith 93), Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase (G-6-PDH) (Blanchier 91, Coraliza 93) und Tetrahydrobiopterin (BH₄), das zwei inaktive NO-Isomere in die aktive, dimere Form verbindet (Stuehr und Griffith 92).

Vorgänge auf der Zelloberfläche führen zu einer Aktivierung der NOS- Isoformen: durch Gen Transkription im Fall der iNOS oder durch second messenger, wie Kalzium bei den cNOS. Diese Enzyme katalysieren bei ausreichender Substratmenge die Synthese des NO.

2.3.4 Die biologischen Wirkung von Stickoxid

2.3.4.1 NO und das kardiovaskuläre System

Die NO- aktivierte lösliche Guanylatcyclase in den mikrovaskulären Endothelzellen trägt entscheidend zur Vasodilatation bei (Ignarro 87) (MOY et al. 91). Zusätzlich zu den direkten hämodynamischen Effekten inhibiert NO die Adhäsion, die Aktivierung und die Aggregation der Thrombozyten (Mendelsohn ME 90) und hemmt die Leukozytenadhäsion am Endothel (KUBES et al. 91). Dadurch verleiht es der Endotheloberfläche eine antithrombotische Eigenschaft.

Es wird vermutet, daß NO bei der Entwicklung eines negativ inotropen Effekts am Herzen beteiligt ist (Finkel 92). Es beeinflusst die kardiale Relaxation während der Diastole (Henderson 92).

Neben diesen positiven Effekten werden aber auch negative Effekte festgestellt. Durch die überschießende Freisetzung von bakteriellen Toxinen, Zytokinen und anderen proinflammatorischen Mediatoren kann es während einer Sepsis aufgrund der Induktion der iNOS zu einer generalisierten NO- Freisetzung in den Gefäßmuskelzellen und Endothelzellen (NAKAYAMA et al. 92) und gesteigerten Umwandlung von L-Arginin zu NO, die einer Behandlung mit IL- 2 folgt, kommen. Dies führt zu einem dramatischen Abfall des peripheren Gefäßwiderstandes und einer negativen Inotropie am Herzen(BALLIGAND et al. 93) und scheint damit eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des hyperdynamischen Schocks einzunehmen. (Thiemermann et al. 93, NAVA et al. 92). In humanmedizinischen Studien bei septischen Patienten und bei solchen, die mit Zytokine behandelt wurden, konnten erhöhte Serumspiegel der Endprodukte der NO- Biosynthese, Nitrit und Nitrat, nachgewiesen werden (OCHOA et al. 1991).

2.3.4.2 NO und die Lungenfunktion

NO vermittelt die noradrenerge, noncholinerge (NANC) neural inhibierende Antwort der Atemwege (Belvisi 92). Diese kann entweder direkt oder über Zwischentransporter, wie Nitrocysteine, die stabiles NO tragen, geschehen. Der NANC- Mechanismus scheint das einzige neuronale bronchodilatatorische System der humanen Luftwege zu sein (Lammers 92), und es wird davon ausgegangen, daß NO als „breaking mechanism“ gegen die cholinerge Bronchokonstriktion fungiert. Dies ist wahrscheinlicher als ein direkter bronchodilatatorischer Effekt von NO.

Das ARDS (adult respiratory distress syndrome) spiegelt eine pulmonale Manifestation eines generalisierten Entzündungsprozess wieder, bei der eine weitverbreitete Induktion der iNOS in der verletzten Lunge auftritt.

2.3.4.3 NO als Neurotransmitter

NO wird auch von Neuronen und Gliazellen von zentralen und peripheren Nerven synthetisiert (Grozdanovic 94). Im Zentralen Nervensystem spielt NO eine entscheidende Rolle als Mediator der „memory functions“ (O'Dell 91) und als Modulator bei der Schmerzwahrnehmung (Haley 92). Neben der Wirkung als neuronaler Mediator bei der Bronchodilatation scheint NO auch neuronaler Mediator bei der Vasodilatation in dem Lungenkreislauf zu sein. Ebenso im Gastrointestinaltrakt: dort werden Erkrankungen wie die infantile hypertrophische Pylorusstenose und die Achalasie mit einem Verlust an Nerven, an welchen NO als Neurotransmitter fungiert, in Verbindung gebracht.

2.3.4.4 Die Wirkung von NO auf andere Organsysteme

Es wird die Möglichkeit diskutiert, daß NO im Gastrointestinaltrakt ein Verteidigungsmechanismus gegen pathogene Organismen sein könnte. Im endokrinen System könnte NO in die Regulation des Renin Produktion und die Na⁺ Homeostase in der Niere verwickelt sein. Sogar ein Effekt in der Schwangerschaft wird angenommen: NO könnte für die assoziierte Vasodilatation, die reduzierte systemische Gefäßresistenz und den erhöhten kardialen Output verantwortlich sein.

2.3.5 Stickstoffmonoxid Wirkungen in der Sepsis

2.3.5.1 Induzierbare NO-Synthese

Endotoxin führt zu Veränderungen der vaskulären Funktion in vivo und in vitro. Isolierte Gefäße septischer Ratten zeigen eine verminderte kontraktile Reaktion sowohl auf Noradrenalin als auch auf Stimulation sympathischer Nervenfasern. Die Gefäßreaktion konnte sowohl durch NO-Synthase-Inhibitoren (L-NMA) als auch durch Guanylatzyklase-Inhibitoren (Methylenblau) normalisiert werden.

Inhibition der NO-Synthese führte bei endotoxämischen Ratten zum Blutdruckanstieg und zur Wiederherstellung der vasopressorischen Antwort aus Noradrenalin. Leukozyten können ebenfalls direkt zur Gefäßdysfunktion im endotoxämischen oder septischen Organismus beitragen. Stimulierte Makrophagen führen durch NO-Freisetzung zur Vasorelaxation. Dieser Effekt war bei zerstörtem Endothel stärker ausgeprägt als bei intaktem Endothel.

2.3.5.2 Konstitutionelle NO-Synthese

Der Einfluß des Vagotonus durch Endotoxine und andere Immunstimulatoren über die iNOS ist erst Stunden nach der initialen Noxe wirksam. Zu den sofortigen Wirkungen von NO zählt die Beeinträchtigung der Endothel-abhängigen Vasodilatation. Bei anästhesierten Schafen wurde von Liste D. et al. beobachtet, daß 15 Minuten nach Ende einer 30 minütigen Endotoxin-Infusion der Azetylcholin-induzierte Blutdruckabfall signifikant kleiner war als bei der nichtendotoxämischen Kontrollgruppe. Endotoxin scheint jedoch nicht zu einer kompletten Hemmung der konstitutionellen NO-Synthese zu führen.

2.3.5.3 NO-Synthase-Inhibitoren in der Sepsis

Den septischen Schock kennzeichnet eine relative Hypovolämie bei erhöhtem Herzzeitvolumen und gleichzeitiger systemischer Vasodilatation. Durch das Versagen der mikrozirkulatorischen Regulation kommt es zur zellulären Hypoxie und zum Organversagen. Pathologische Veränderungen im L-Arginin/NO-Stoffwechsel

tragen vermutlich auf mehreren Wegen zum hyperdynamen Herz-Kreislaufversagen bei. Nach Immunstimulation kommt es sofort zur Beeinträchtigung der Endothel-abhängigen Vasodilatation aufgrund einer Hemmung der konstitutionellen NO-Synthase. Nach einigen Stunden ist die iNOS gebildet, produziert große Mengen an NO und führt zur Vasodilatation mit verminderter Reaktion auf endogene und exogene Vasokonstriktoren.

Als Endzustand findet sich Vasodilatation (unregelte NO-Produktion durch die iNOS) und Vasoplegie (einerseits verringerte vasokonstriktorische Antwort auf Katecholamine sowie andererseits Verminderung der regulatorischen Vasodilatation aufgrund der Hemmung der konstitutionellen NO-Synthase). Diese Veränderungen der mikrozirkulatorischen Regulation können zur Maldistribution des Blutflusses beitragen, da durch Katecholamine bevorzugt solche Gebiete kontrahiert werden, die nur relativ wenig von den Effekten der iNOS betroffen sind. Zudem können Gefäße, die noch relativ eng gestellt sind, möglicherweise wegen der Beeinflussung der konstitutionellen NO-Synthase nicht adäquat dilatieren. Da insbesondere der iNOS eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Sepsis zugeschrieben wird, stellt die Gabe von NO-Synthase-Inhibitoren eine mögliche therapeutische Option dar.

Obwohl im septischen Schock vermutlich sowohl die über cGMP vermittelten Effekte als auch die toxischen Wirkungen eine Rolle spielen, wird die Indikation zum Einsatz von NO-Synthase-Hemmern hauptsächlich in einer Verbesserung der Hämodynamik gesehen.

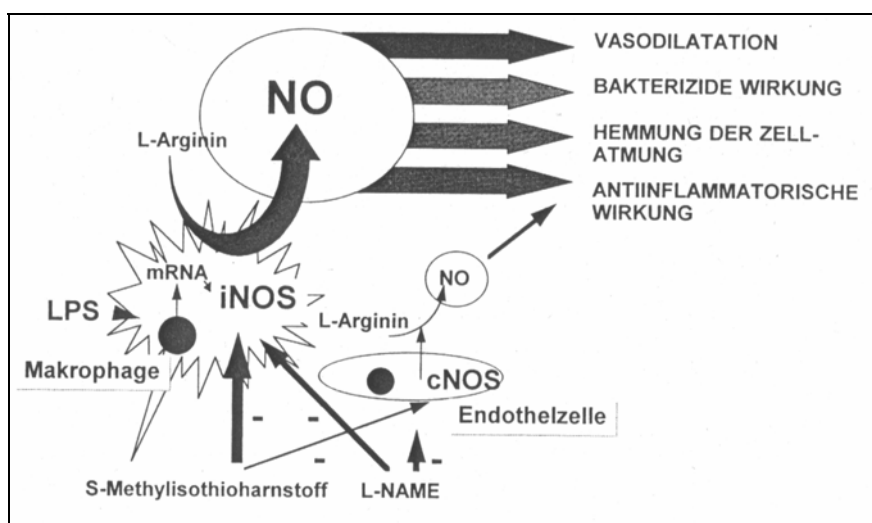


Abbildung 11 NO als potenter Aktivator in Rahmen des septischen Schocks

2.3.6 Stickoxid und seine kardiale Funktion im Rahmen der Sepsis

Eine Herzinsuffizienz trotz hohen Herzzeitvolumens mit verminderter Ejektionsfraktion und Verschiebung der Frank-Starling-Kurve findet sich regelhaft bei Patienten mit manifester Sepsis. Der genaue Mechanismus der myokardialen Dysfunktion ist nicht bekannt. Die Bedeutung eines eventuell alleine verantwortlichen „myocardial depressant factor“ ist noch nicht ausreichend belegt. Endotoxin und verschiedene Zytokine üben einen negativen inotropen Effekt aus, der durch NO vermittelt wird. Im Myokard wurde die iNOS und die konstitutionelle NOS nachgewiesen. Harding S.E. zeigt, daß an isolierten Myozyten endogenes wie exogenes NO zu einer Verringerung der Kontraktilität führt. Bislang ist jedoch unklar, welche Bedeutung NO für die myokardiale Funktion in vivo spielt und ob die iNOS zu der myokardialen Depression in der Sepsis beiträgt.

3 Material und Methodik

3.1 Materialliste und Bezugsquellen

3.1.1 Versuchstiere

Bei unseren Experimenten wurden ausschließlich weibliche Mäuse des Stammes Balb/c in einem Alter von ca. 6 Wochen und einem Gewicht von 20 - 25g verwandt, die von der Firma Charles River GmbH in Sulzfeld (Deutschland) bezogen wurden.

3.1.2 Meßgeräte und technisches Equipment

Sterilbank „Lamin Air“	Heraeus, Hanau, Deutschland
Bioreaktor (Brutschrank)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Operationsbesteck	Aescolap, Deutschland
Einmalkanülen „Microlance [®] 3“	Becton Dickinson, Dublin, Irland
Kühlzentrifuge J2-21	Beckmann, Palo Alto, USA
Cytospin 2	Shandon, Pittsburgh, USA
Lichtmikroskop ID 3	Zeiss, Jena, Deutschland
ELISA - Reader „Titertek Multiscan MCC/340	Eflab, Finnland
Durchflußzytometer (FACS) „EPICS XL“	Coulter, Hialech, USA
Durchflußzytometersoftware „System II [™] V. 1.0“	Coulter, Hialech, USA
Einmal Pipetten	Fa. Spicker, München, Dtl.
Einmal Pipettenspitzen	Fa. Spicker, München, Dtl.
Glaspipetten	Fa. Spicker, München, Dtl.
24 Well Gewebekulturplatte, steril	Greiner-Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
96 Well Gewebekulturplatte, steril	Greiner-Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
15 ml Polypropylenröhrchen mit Schraubverschluß	Falcon, New Jersey, USA
50 ml Polypropylenröhrchen mit Schraubverschluß	Falcon, New Jersey, USA
Polypropylenröhrchen zur FACS- Analyse	Falcon, New Jersey, USA

Eppendorf - Cups	Eppendorf, Hamburg, Dtl.
Cytospin- Filter	Shandon, Pittsburgh, USA
Cytospin- Kammern	Shandon, Pittsburgh, USA
Objektträger mit Mattrand	Fa. Spicker, München, Dtl.
Neubauer- Zählkammer „Assistent“	Fa. Spicker, München, Dtl.
Eukitt zum Eindeckeln	Kindler, Freiburg, Deutschland

3.1.3 Chemikalien und Enzyme

Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Gibco BRL, Eggenstein, Dtl.
BrdU Labeling and Detection Kit I	Boehringer, Mannheim, Dtl. Best. Nr. 1296 736
Differentialblutbild- Schnellfärbung „Quick-Diff“	Dade/ Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen, Dtl.
Fetales Kälberserum (FKS)	Seromed, Berlin, Dtl.
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Boehringer, Mannheim, Dtl.
Glycin	Gibco BRL, Eggenstein, Dtl.
Ethanol	70 % Gibco BRL, Eggenstein, Dtl.
L-Glutamin	200 mM Gibco BRL, Eggenstein, Dtl.
L-Arginin	1 mM Sigma, Deisenhofen, Dtl.
N-Methyl-L-Arginin (NMA)	0,25 mM Calbiochem, La Jolla, USA
Propidium Iodid (PI)	Sigma, Deisenhofen, Dtl.
Trypsin	Sigma, Deisenhofen, Dtl.
Trypanblau	Seromed, Berlin, Dtl.

S - Nitroso - Acetylpenicillamin (SNAP)

SNAP ist eine Substanz speziell für experimentelle Zwecke, deren Synthese in unserem Labor nach den Angaben von Field et al. (1978) erfolgte. Es wurde N - Acetyl - D,L - Penicillamin (10nM) langsam mit 2 ml 10 % konzentrierter Schwefelsäure in eine Mischung von 20 ml Methanol und 20 ml 1 N Salzsäure gelöst. Anschließend wurde unter 20 minütigem Rühren 20 ml

Natriumnitritlösung (20 mM) zugegeben. Das ausgefällte SNAP- Pulver wurde gewaschen, vakuumgetrocknet. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei +4°C. Unmittelbar vor Gebrauch wurde 2,2 mg SNAP - Pulver in 100 µl DMSO gelöst.

SNAP wurde zur NO - Freisetzung verwendet, da es in wässriger Lösung spontan ohne enzymatische Metabolisierung und unabhängig von anderen Faktoren große Mengen NO freisetzt.

3.1.4 Zytokine und Toxine zur Stimulation

rmGM-CSF	10ng/ml	Sigma, Diesenhofen, Deutschland
Neupogen (rhG-CSF)	100ng/ml	Amgen/Roch, München, Deutschland
TNF α	500U/ml	Genzyme, Rüsselsheim, Deutschland
Il-1 β	5 U/ml	Sigma, Diesenhofen, Deutschland
INF- γ	200U/ml	IC-Chemikalien, München, Dtl.
Lipopolysaccharid (LPS)	10mg/ml	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

3.1.5 Kulturmedium und Puffer

3.1.5.1 Kurzzeitkulturen

Das Basal Medium „ISCOVE“ (Seromed, Berlin, Deutschland) enthielt, 10 % Equine-Serum (Hy Clon Inc., Logan, Utah, USA), 10 % Fetales Kälberserum (FKS), 2 % L-Glutamat 200mM (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland) und 1 % eines Penicillin - Streptomycin Gemisches je 1000 IU /ml (Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland).

In einem Wasserbad wurden das Equine(Pferde)- Serum und das fötale Kälberserum (FKS) zur Inaktivierung der Komplementfaktoren für 30 Min. auf 56°C erhitzt.

Die Herstellung des Kurzzeitkulturmediums erfolgte stets unter sterilen Bedingungen. Es wurde für alle Versuchsansätze in sterilen Glas-Schraubverschluss-Flaschen (Labormaterial über Fa. Spicker, München, Deutschland) erneut zubereitet. Sollte einmal etwas Medium keine Verwendung finden, wurde es für maximal 48 h bei +4°C aufbewahrt.

3.1.5.2 Langzeitkulturmedium

Das Langzeitkulturmedium wurde zu quantitativen Stammzellendifferenzierung verwendet.

100 ml des 0,9 % Methylcellulose-Medium „Metho-Cult M 3434“ der Firma Stem Cell Technologies Inc. (Vancouver, Kanada) enthielt 1 % BSA, 2.0 ml L-Glutamin, Fetales Kälberserum (FKS), Transferrin, 0.0004 mM β -Mercaptoethanol, 3 U/ml rh-Erythropoietin, Insulin und verschiedene Interleukine (rm-SCF, rm-IL3, rh-IL6).

Die Verwendung dieses Mediums erfolgte ebenfalls unter der Sterilbank. Die Lagerung dieses Mediums erfolgte bei - 20 °C.

3.1.6 Wasch- und Arbeitspuffer

Als Puffer dienten je nach Arbeitsschritt entweder reines PBS oder PBS mit Zusatz von 2 % FKS. In 1 Liter Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) sind 13,7 mM Kochsalzlösung (NaCl), 2,7 mM Kaliumchlorid (KCl), 80,9 mM Na_2HPO_4 , 1,5 mM KH_2PO_4 enthalten. Der pH-Wert der gesamten Lösung liegt bei 7,4.

3.1.7 Grundprinzip der Durchflußzytometrie

Das Prinzip der Durchflußzytometrie besteht darin, mittels eines Laserstrahles einer definierten Wellenlänge einerseits fluoreszierende Antikörper anzuregen, andererseits durch eine bestimmte Lichtführung und Detektion der emittierten Fluoreszenzen eine quantitative Bestimmung der durch die Antikörper markierten Moleküle zu erhalten. Die erhaltenen Meßwerte werden mit Hilfe eines Computers ausgewertet.

Beim verwendeten Durchflußzytometer erfolgte die Anregung durch einen Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm, wobei einerseits die Absorptionsmaxima für die Farbstoffe Fluoresceinisozyanat (FITC) bei 525 nm und für Propidiumiodid (PI) bei 563 nm, andererseits die Zellgröße gemessen wurden. Bei logarithmischer Darstellung der Fluoreszenzintensitäten bzw. der Zellgröße ergibt sich so eine zweidimensionale Abbildung. Durch Eingrenzung (engl. „gate“) der Punktwolken lassen sich Meßbereiche festlegen, in denen dann wieder separat Fluoreszenzintensitäten gemessen werden können.

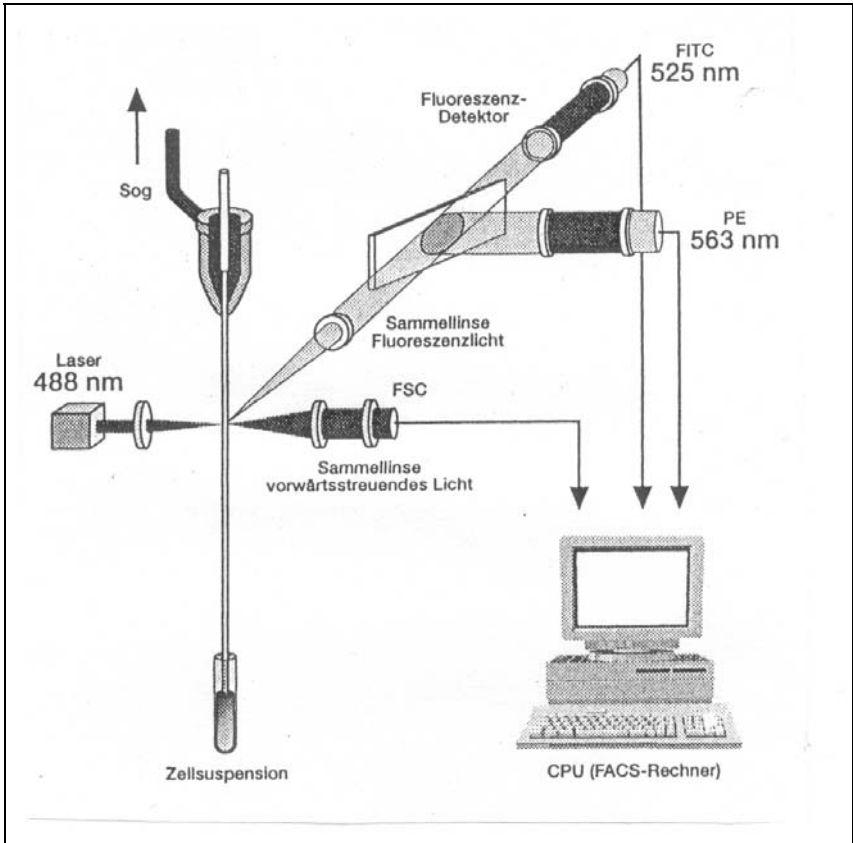


Abbildung 12 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines FACScan Durchflußzytometers

3.2 **Methodik**

3.2.1 **OP**

Die Knochenmark Entnahme erfolgte in einem sterilen Operationssaal der tierexperimentellen Abteilung des Klinikums Rechts der Isar. Es wurde stets auf sterile Bedingungen geachtet und die Instrumente jedes Mal neu sterilisiert.

Es wurden 6 Wochen alte Mäuse des Stammes Balb/c verwendet. Um diese zu töten wurden sie in einen Kanister geschlossen, in den Kohlendioxid eingeleitet wurde.

Vorsichtig wurde mit einer chirurgischen Schere die Bauchhaut der Maus eröffnet. Um die aseptischen Bedingungen beizubehalten wurde bei diesem Vorgang sorgfältig darauf geachtet, die Bauchorgane nicht zu verletzen. Mit der gleichen Schere wurde auch das Fell an den beiden Hinterläufen gespalten. Es war nun möglich das Fell mit sterilen Kanülen auf die Seite zu heften, so daß es zu keiner Kontamination für den weiteren Verlauf der Operation beitrug. Die kontaminierte Schere und Pinzette wurden nun zur Seite gelegt und neue sterile Instrumente verwendet.

Vorsichtig wurde des Femur aus der Acetabulum gelöst, nachdem das umgebende Muskelgewebe zur Seite präpariert wurde. Nun wurde die Tibia freipräpariert und zusammen mit dem Femur entnommen. Der gleiche Vorgang wurde an dem zweiten Hinterlauf wiederholt. Den beiden Femura und Tibiae wurde noch der restliche umgebende Weichteilmantel entfernt. Die gereinigten Knochen werden nun beidseits interkondylär eröffnet. Das so zugänglich gemachte Knochenmark wurde mit 5 ml einer PBS + 2% FKS - Lösung vorsichtig herausgespült. Die entnommenen Knochenmarkzellen werden in einen bereitstehenden mit 25 ml PBS + 2% FKS gefüllten Falcon-Röhrchen (50 ml) aufgefangen.

3.2.2 **Colon - Ascendens - Stent - Peritonitis (CASP)**

Das CASP - Modell ist eine Weiterentwicklung der etablierten Colon - Ligatur und Punction (CLP) Model unserer Arbeitsgruppe von Dr N. Zantl.

Balb/c - Mäusen wurde unter Äther- Narkose das Peritoneum eröffnet. In das freipräparierte Colon ascendens wurde durch eine vorher angelegte Öffnung ein 14 gauge Stent eingelegt und fixiert. Anschließend wurde das Abdomen wieder verschlossen. Der implantierte Stent gewährleistet einen kontinuierlichen Keimaustritt von Darmbakterien in das Peritoneum, ähnlich einer Nahtinsuffizienz nach operativen Eingriffen.

Nach 3h und 12h mit implantierten Stent wurden die Mäuse geopfert und das Knochenmark aus den Femura und Tibiae entnommen. Wurde der Plastikstent nach 3h entfernt, überlebten alle Mäuse. Erfolgt die Entnahme des Stent aber erst nach 12h, wurde eine 100 % Letalität durch massive Sepsis erreicht.

Als Kontrolle dienten sog. Sham - operierte Tiere, bei denen das Peritoneum nur eröffnet und gleich wieder verschlossen wurde.

3.2.3 Zell - Reinigung

Im Labor wurde während der gesamten Versuchsreihen unter der Sterilbank gearbeitet. Die Zellsuspension aus dem Op wurde bei 208 g für 10 Min. bei +4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde anschließend zur Lyse der Erythrozyten in 5 ml NH₄Cl aufgenommen und 5 Min. stehen gelassen. Um das restliche NH₄Cl und die lysierten Erythrozyten zu entfernen wurde die Suspension 5 Min. bei 208 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurde das Pellet in 3 ml PBS + 2% FKS - Lösung aufgenommen. Dieser Waschvorgang wurde 3 mal wiederholt.

Die gewaschene Knochenmarkzellen wurden erneut in 2 ml PBS + 2% FKS aufsuspendiert.

3.2.4 Zellzählung

Zur Prüfung der Vitalität und der Zellzahl der Knochenmarksuspension wurden 5 µl Zellsuspension mit 450 µl Trypanblau (ein Teil Trypanblau und zwei Teile PBS - Lösung) vermischt, um eine Verdünnung von 1 : 10 zu erhalten. Mit diesem Gemisch wurde eine Neubauer - Zählkammer beschichtet. Unter dem Mikroskop wurden die Zellzahl und die Vitalität der Zellen überprüft. Das Trypanblau kann durch

geschädigte Zellmembrane in das Zytoplasma eindringen. Somit erhalten avitale Zellen die typische blaue Anfärbung. Die vitalen Zellen erscheinen bei dieser Methode im Mikroskop farblos.

Um die Zellzahl zu bestimmen wurden nach den üblichen Regeln die vier äußeren Quadranten der Neubauer - Zählkammer ausgezählt. Die in der Knochenmarksuspension enthaltene Zellzahl errechnet sich mit Hilfe folgender Formel:

$$\frac{\sum \text{Zellen aus allen 4 Quadranten} \times 50 \times 10}{20} \times 1000 = \text{Zellen/ml}$$

3.2.5 Anlage der Zellkultur

Die Knochenmarksuspension wurde erneut bei 208 g bei 4 °C für 5 Min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde in Kulturmedium resuspendiert, um eine Endkonzentration von 2 Millionen Zellen pro Milliliter zu erhalten.

Aus dieser Suspension wurde je ein Milliliter in ein Well einer 24 Well - Gewebekulturplatte überführt. Somit befanden sich in jedem Well 1 ml Kulturmedium in dem 2 Millionen Zellen enthalten waren.

Es wurden nun je nach Ansatz verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren in verschiedenen Konzentrationen zugegeben. Mindestens ein Well wurde bei jedem Ansatz nicht stimuliert und als Kontrolle mitgeführt. War die Gewebekulturplatte vollständig beimpft und beschriftet, wurde sie für 24 h oder 48 h in den Brutschrank bei 37 ° C, 5 % CO₂ und gesättigtem Wasserdampf inkubiert.

Der Einfluss der einzelnen Zytokine auf die Proliferation der Knochenmarkszellen wurde durch Zugabe von Zytokinen (IL-1 β , TNF α , INF γ) bzw. LPS in Standardkonzentration (siehe Tabelle 5 Standardkonzentrationen) zu den Versuchsansätzen untersucht. In anderen Versuchen wurden die eingesetzten Zytokinkonzentration verdoppelt oder auf die Hälfte reduziert und einzelne Zytokine bzw. das LPS in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt. Als Proliferationsfaktoren wurden GM-CSF und G-CSF alleine und in Kombination mit den verschiedenen Zytokinen (IL-1 β , TNF α , INF γ) zu der Zellsuspension dazugegeben. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen, welche 24h und 48h bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigtem Wasserdampf inkubiert wurden.

Standardkonzentrationen	
IL- 1 β	0,5ng/ml
TNF α	500 U/ml
IFN γ	200 U/ml
LPS	10 μ g/ml
GM-CSF	10ng/ml
G-CSF	1ng/ml

Tabelle 6 Aufstellung der Standardkonzentrationen der wichtigsten von uns verwendeten Zytokine und Wachstumsfaktoren

3.2.6 Zellgewinnung aus der Gewebekulturplatte

Nach der Inkubation der stimulierten Gewebekulturplatte über 24 h oder 48 h werden in jedes Well 10 μ l Labeling - Solution (BrdU - Markierungs - Medium), die wie im Anleitungsprotokoll beschrieben hergestellt wurde, hinzugefügt und für weitere 4 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde jedem Well 50 μ l Überstand entnommen und dessen Nitritspiegel bestimmt. (s. Kap. 3.2.9 Nitritbestimmung / NO- Synthese)

Die noch in den Wells verbliebene Suspension wurde jeweils mit einer neuen 1 ml Glaspipette aufsuspendiert, entnommen und in ein 15 ml Falcon - Röhrchen überführt. Die in den Wells adhären Zellen wurden durch Zugabe von Trypsin - EDTA gelöst, welches vorher in einem Wasserbad auf 37 °C fünf Minuten vorgewärmt wurde. Aufgrund der zelltoxischen Wirkung des Trypsins war dessen Einwirkungszeit nur kurz. Die Ablösung wurde unter dem Aufsichtmikroskop beobachtet. War der Großteil der Zellen nicht länger adhären, wurde diese Zellsuspension zu den vorher entnommenen Zellen gegeben. Anschließend wurde 1ml PBS + 2 % FKS - Lösung zugegeben und bei 208 g und 4 °C für 10 Min. zentrifugiert. Bevor die Zellen in 250 μ l PBS zur Weiterverarbeitung aufgenommen wurden, wurden sie ein weiteres Mal mit PBS + 2 % FKS gewaschen.

Vor der Weiterverarbeitung wurden erneut 50 µl der Suspension entnommen, um eine wie oben in Kap. 3.2.4 Zellzählung beschriebene Vitalitätsprüfung mit Hilfe von Trypanblau durchzuführen.

3.2.7 Bestimmung der Proliferation mit BrdU

Die Proliferationsmessung erfolgte durch die Inkubation mit BrdU und Messung im FACS.

Bei dieser nicht radioaktiven Methode, im Gegensatz zur [³H] - TdR Messung, wird das Thymidinanalogue 5 - Bromo - 2' - deoxy-uridin

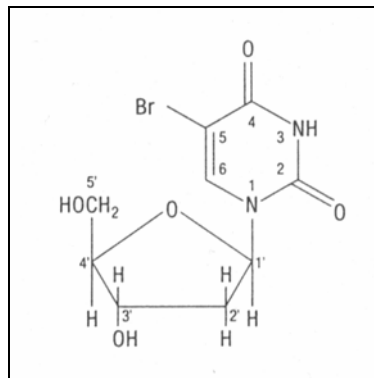


Abbildung 13 Molekulare Struktur des Thymidinanalogue 5 - Bromo - 2' - deoxy-uridin

anstelle von Thymidin in die zelluläre DNS eingebaut. Dieser Einbau erfolgt nur während der DNS Replikation in der S- Phase. Da Zellen nur in die S- Phase übertreten können, wenn sie die M- Phase durchlaufen haben, werden nur proliferierende Zellen markiert. Da BrdU keine Kreuzreaktionen mit anderen Zellbestandteilen zeigt, werden ruhende Zellen nicht markiert. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen BrdU und Fluoreszenzmikroskopie oder FACS läßt sich die Proliferationsrate quantitativ bestimmen.

Methode	Vorteile	Nachteile
BrdU Labeling and Detection Kit I	<ul style="list-style-type: none"> ■ Quantitative Bestimmung der Zellen, die sich in der S- Phase befinden ■ Nicht radioaktive Methode ■ Ergebnisse innerhalb 24 h 	<ul style="list-style-type: none"> ■ Proben können nicht lange aufgehoben werden

Tabelle 7 Übersicht über Vor- und Nachteile Der BrdU-Methode zum Nachweis der Proliferation

Die Messung erfolgte in Anlehnung an die „Technical Tips“ von A. Vanderplassen et al., der eine Methode beschreibt, die Proliferation mit Hilfe von BrdU im FACS zu messen ohne die DNS zu denaturieren.

Die durch Trypsinierung gewonnenen und in 200 µl PBS aufgenommenen Zellen wurden durch langsame Zugabe „drop by drop“ unter ständigem schütteln von 3 ml 70 % Ethanol (in 50 mM Glycin gepuffert und einem pH von 2.0) fixiert. Dabei wird nur die Zellmembran, jedoch nicht die DNS, denaturiert. Nach einer Inkubation von mindestens 24 h bei + 4 °C wurde das Ethanol - Zell - Gemisch bei 208 g über 10 min. zentrifugiert und anschließend mit 2 ml PBS gewaschen. Nun wurde zu der frei vorliegenden DNS 200 µl Anti - BrdU – Arbeitslösung gegeben. Diese Arbeitslösung besteht aus dem monoklonalen Antikörper „anti - BrdU“ und einer Nuklease zur Denaturierung der DNS. Dieses Gemisch wurde für 1 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und die DNS anschließend erneut herunterzentrifugiert (10 min. bei 208 g). Das Pellet wurde mit 200 µl Anti - Maus - Ig - Fluorescein Arbeitslösung resuspendiert und für 30 Min. bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigtem Wasserdampf inkubiert. Bei der Anti - Maus - Ig - Fluorescein Arbeitslösung handelt es sich um den Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markierten Antikörper, der „anti - BrdU“ Antikörper aufzuspüren und zu markieren vermag. Die Arbeitslösung wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt. Danach wurden die Zellen erneut für 10 Min. und 208 g zentrifugiert und das Pellet in 1 ml PBS, welches 5 µg Propidium Iodid (PI) enthielt, aufgenommen und 30 Min. im Dunkeln bei Raumtemperatur stehen gelassen. PI markiert die komplette in der Suspension enthaltene DNS.

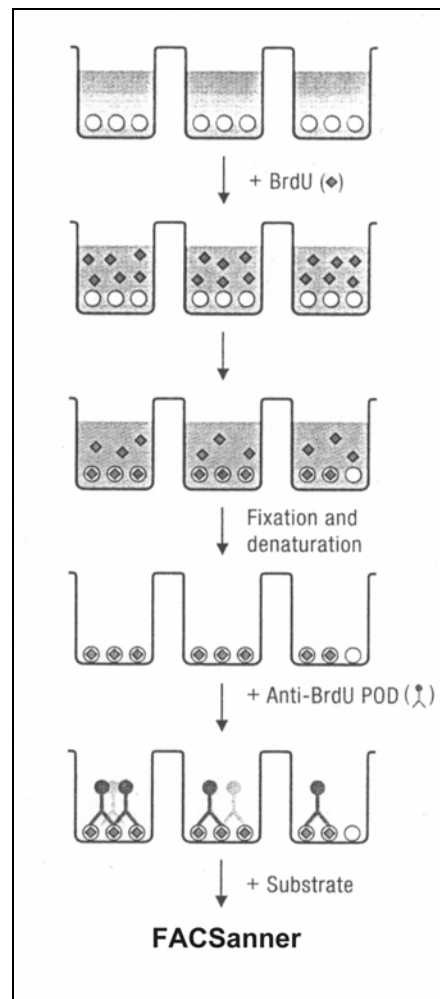


Abbildung 14 Schematische Darstellung des Versuchsablaufes

3.2.8 Messung mit der Durchflußzytometrie

Die computerunterstützte Messung mittels eines FSCcan Durchflußzytometers und der COULTER® EPICS® System II™ V. 1.0 Software (beide Fa. Coulter®, Hialech, USA) wurden folgendermaßen durchgeführt.

Um eine gute Standardisierung zu erreichen, wurde das Meßgerät mit speziellen Fluoreszenzpartikeln (Fa. Coulter®, Hialech, USA) täglich neu justiert. Für jede Messung wurden 10.000 Zellen in die Auswertung einbezogen. Durch eingrenzen des Meßbereiches, das sog. „gaten“, wurde der Meßbereich auf die interessierenden Knochenmarkszellen festgelegt.

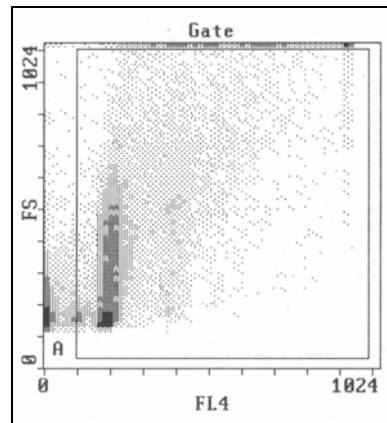


Abbildung 15 Abbildung eines Diagrammes welches unseren Messbereich festlegt. Nur die Zellen im großen Rechteck werden für die weiteren Messungen berücksichtigt.

Diese Zellpopulation wurde dann auf Fluoreszenz sowohl des grünen Fluoresceinisothiocyanats (FITC) als auch des roten Propidium Iodids (PI) gemessen. Das grüne Fluoresceinisothiocyanat gab Aufschluß über den relativen BrdU Anteil, das rote Propidium Iodid zeigt den relativen DNS Gehalt an. Werden diese Daten in entsprechenden Diagrammen dargestellt, ist eine Differenzierung in die unterschiedlichen Teilungsphasen (S-Phase, G0/G1-Phase und G2-Phase) möglich.

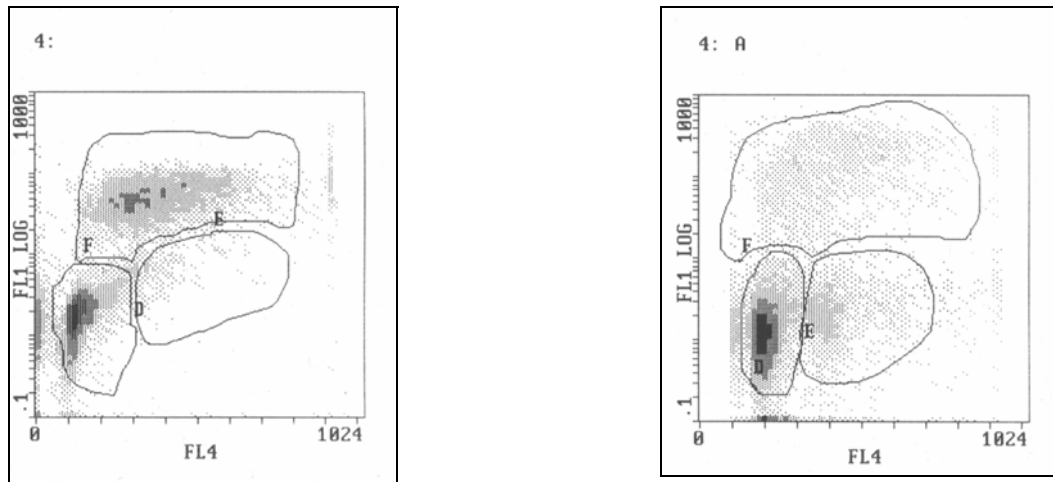


Abbildung 16 Diagramme welche darstellen wie viele Zellen sich in welchen Phase des Zellzyklus befinden. A: Viele Zellen in der S-Phase spricht für viele proliferierende Zellen. B: Wenige Zellen in der S-Phase spricht für eine geringe Proliferationsrate.

FS (forward-scatter/ Vorwärts-scatter) - Zellgröße

SS (side-scatter/ Seitwärts-scatter) - Granularität der Zelle

FL₁, FL₁ log, (Kanäle für spezifische Meßbereiche der apoptotischen Zellen)

3.2.9 Nitritbestimmung / NO- Synthese

Da es sich bei NO um ein instabiles Radikal handelt, das in wässriger Lösung zu Nitrit und Nitrat oxidiert wird, erfolgte die Messung der NO- Synthese durch Bestimmung der Nitritmenge im Überstand. Die Nitritmenge wurde mit Hilfe der Greiss- Reaktion (Greiss, 1879) ermittelt. Das Greiss- Reagenz (Greiss 1 und Greiss 2 zu gleichen Teilen) formt Nitrit in salpetrige Säure um. Diese führt nun zu einer Diazotierung von Arylaminen, die an einen purpurfarbenen Azofarbstoff binden. Photometrisch läßt sich die Menge Azofarbstoff bei einer Wellenlänge von 540 nm bestimmen.

In eine 96 Well- Mikrotiterplatte wurde die Standardkonzentration im Doppelansatz mit definiert exponentiell zunehmenden Konzentrationen vorgelegt. Jeweils 50 µl aus dem Überstand der Zellkulturen wurden in einem Doppelansatz in die Mikrotiterplatte pipettiert. War die Platte komplett beimpft, wurden 50 µl Greiss- Reagenz in jedes Well gegeben und sofort zur photometrischen Messung in den ELISA- Reader gegeben.

Greiss- 1: 1 g N- (1- Naphtyl-) Ethylendiamin-dihydrochlorid + 500 ml Aqua bidestilata

Greiss- 2: 10 g Sulfonylamid + 59 ml 85 %- ige H₃PO₄ + 500 ml Aqua bidestilata

3.2.10 Nitritbestimmung bei CASP- Mäusen

Weiter untersuchten wir die NO-Konzentration im Blut der CASP-Tiere als Nachweis der NO-Synthese. Nach der Narkose durch CO₂ wurde der Thorax und die Pleura mit sterilem chirurgischen Besteck eröffnet und in den großen Ventrikel ein Schnitt gesetzt, damit das noch schlagende Herz das Blut in die Thorakalhöhle pumpt. Das Blut wurde mit einer sterilen Pasteurpipette aufgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße für 30 - 60Min. bei RT. stehen gelassen. Anschließend wurde das Blut über 10 Min. bei 6000 UpM zentrifugiert, dann wurde das Serum abpipettiert und in Eppendorf-Reaktionsgefäße bei -20°C aufbewahrt. Der Nitrit-Nachweis im Serum erfolgte mit Hilfe der Hochdruck- Flüssigkeitschromatographie (HPLC - High Pressure Liquid Chromatography). Leider konnten wir in keinem Versuch aussagekräftige Werte gewinnen, dies dürfte an den geringen Mengen isoliertem Serum gelegen haben.

3.2.11 Stimulation der endogenen NO-Synthese

Die Zellkulturen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Mischung LPS + TNF α + IL1 β + INF γ stimuliert, um den Einfluß der einzelnen Zytokine auf die NO-Synthese der Knochenmarkszellen zu untersuchen. GM-CSF und G-CSF als Proliferationsfaktoren wurden alleine und in Kombination mit den verschiedenen Zytokinen zu der Zellsuspension dazugegeben

Als potentieller Inhibitor der NO-Synthase-Aktivität haben wir als Substrat-Analog N-Methyl-L-Arginin (NMA) in einer Konzentration von 0.25mM zu der Zellkultur in Kombination mit den Zytokinen und dem Zytokin-LPS-Mix gegeben. Als Kontrolle dienten die unstimulierten Zellen, welche 24h und 48h bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigtem Wasserdampf inkubiert wurden.

3.2.12 CFU

Um das Differenzierungspotential der Knochenmarkstammzellen quantitativ zu bestimmen, wurden je 10⁵ Zellen auf 1 ml Methyzellulose Medium gegeben. Dieses Medium wurde zusätzlich mit 1% BSA, 2mM L-Glutamin, 3U/ml rh-Erythropoietin,

FKS, Insulin, Transferrin, 10-4 Mercaptoethanol und den Interleukinen rm-SCF, rm-IL3, rh-IL6 versetzt. In Unterschiedlichen Ansätzen wurde mit Zytokinen und Wachstumsfaktoren stimuliert. Nach 14 Tagen Inkubation im Brutschank bei 37 °C, 5% CO₂ wurden die Petrischalen im Aufsichtsmikroskop betrachtet und die Zellkolonien „colony forming unit erythroid (CFU-E), „burst forming unit (BFU-E), „colony forming unit granulocyte-macrophage (CFU-GM) und „colony forming unit erythroid macrophage-magacaryocyte (CFU-GEMM) , „colony forming unit granulocyte“ (CFU-G) ausgezählt.

3.2.13 Cytospin

Von allen stimulierten Zellsuspensionen wurde für den Cytospin eine Verdünnung von 10⁵ Zellen pro 100 µl PBS erstellt. Diese Verdünnung wurde in vorbereitete und am Objektträger entsprechend beschriftete Zytospin- Kammern überführt und anschließend für 5 Min. zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren waren die Zellen an die Objektträger adhärent, so daß es nun möglich war, diese nach der Diff- Quick-Methode (Differentialblutbild- Schnellfärbung) zu färben. Dabei verweilten die Objektträger je 5 Min. in jedem Farbansatz. Danach wurden die Objektträger für ca. 24h an der Luft getrocknet und schließlich mit „Eukitt“ eingedeckelt.

4 Ergebnisse

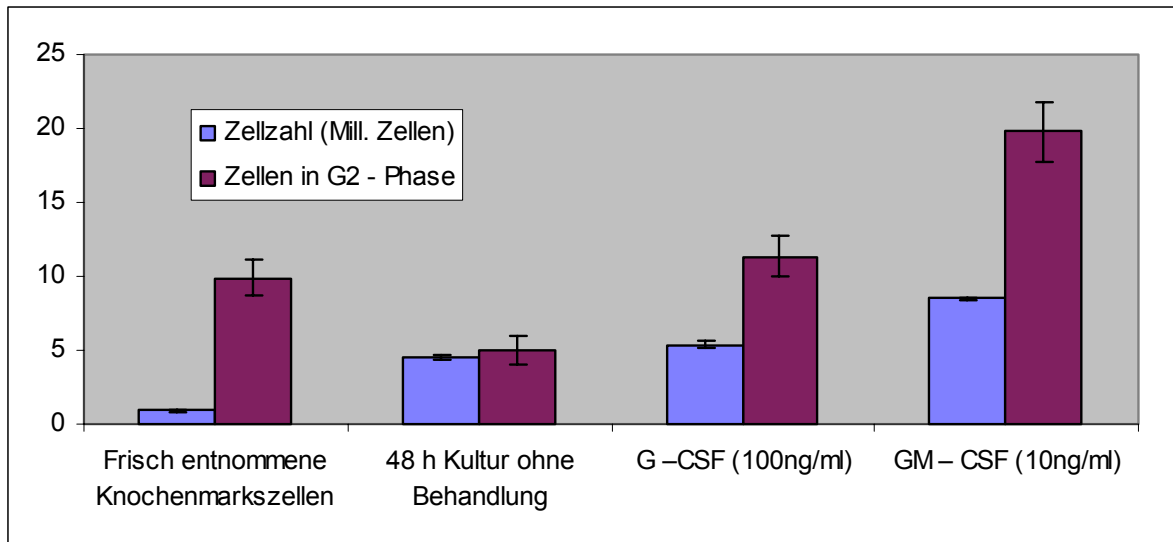
4.1 Proliferation frisch entnommener Knochenmarkszellen, (48 h Kultur ohne Behandlung, GM - CSF, G - CSF)

In der Zellkultur nahmen Vitalität und Proliferationsrate ab. Die Wachstumsfaktoren GM - CSF und G - CSF induzierten die Proliferation der Knochenmarkszellen (Abb.17).

Die Kultur der Zellen wirkte negativ auf die Vitalität und spontane Proliferationsrate. Frisch entnommene Knochenmarkszellen zeigten initial eine Proliferationsrate von $9,9 \pm 1,3$ % Anteil an Zellen in der S - Phase. Nach Kultur der Zellen über 48 h halbierte sich der Anteil der Zellen in der S - Phase auf $5,0 \pm 0,9$ %. Dieser Trend ließ sich auch bei den Zellzahlen erkennen. Im Anschluss an die Kultur lag die Zellzahl stets niedriger als zuvor. Eingesetzt wurden 2,0 Millionen Zellen die sich nach 48 h, in der nicht stimulierten auf $0,9 \pm 0,15$ Millionen Zellen reduzierten.

Die Stimulation der Knochenmarkszellen durch GM - CSF (10 ng/ml) führte wie erwartet zu einer Steigerung der Proliferationsrate. Befanden sich nach 48 h $5,0 \pm 0,9$ % der unbehandelten Zellen in der S – Phase, so waren es nach der Stimulation mit GM - CSF $19,8 \pm 2,0$ % Zellen. Die Zellzahl lag nach nicht stimulierter Kultur bei $0,9 \pm 0,15$ Millionen Zellen. Durch Stimulation mit GM - CSF stieg diese auf $1,73 \pm 0,08$ Millionen Zellen an. Die Stimulation durch 10 ng/ml GM - CSF erwies sich als optimale Konzentration. Geringere oder höhere Dosen zeigten keine weitere Proliferationssteigerung.

Während die Proliferationsrate durch GM - CSF auf das vierfache anwuchs, führte die Stimulation durch G – CSF in der Konzentration bis 100 ng/ml nur zur Verdopplung der Zellen in der S – Phase auf $11,3 \pm 1,4$ %.



	Frisch entnommene Knochenmarkszellen	48 h Kultur ohne Behandlung	G -CSF (100ng/ml)	GM - CSF (10ng/ml)
Zellzahl (Mill. Zellen)	0,9 ± 0,06	4,5 ± 0,15	5,4 ± 0,2	8,5 ± 0,08
Zellen in der G2 - Phase	9,9 ± 1,26	5,04 ± 0,98	11,3 ± 1,38 ^a	19,8 ± 2,01 ^a

Signifikanz: $p \leq 0,05$: a) gegenüber unbehandelt

Abbildung 17

Die Auswirkung der Zellkultur auf die Vitalität und Proliferationsrate

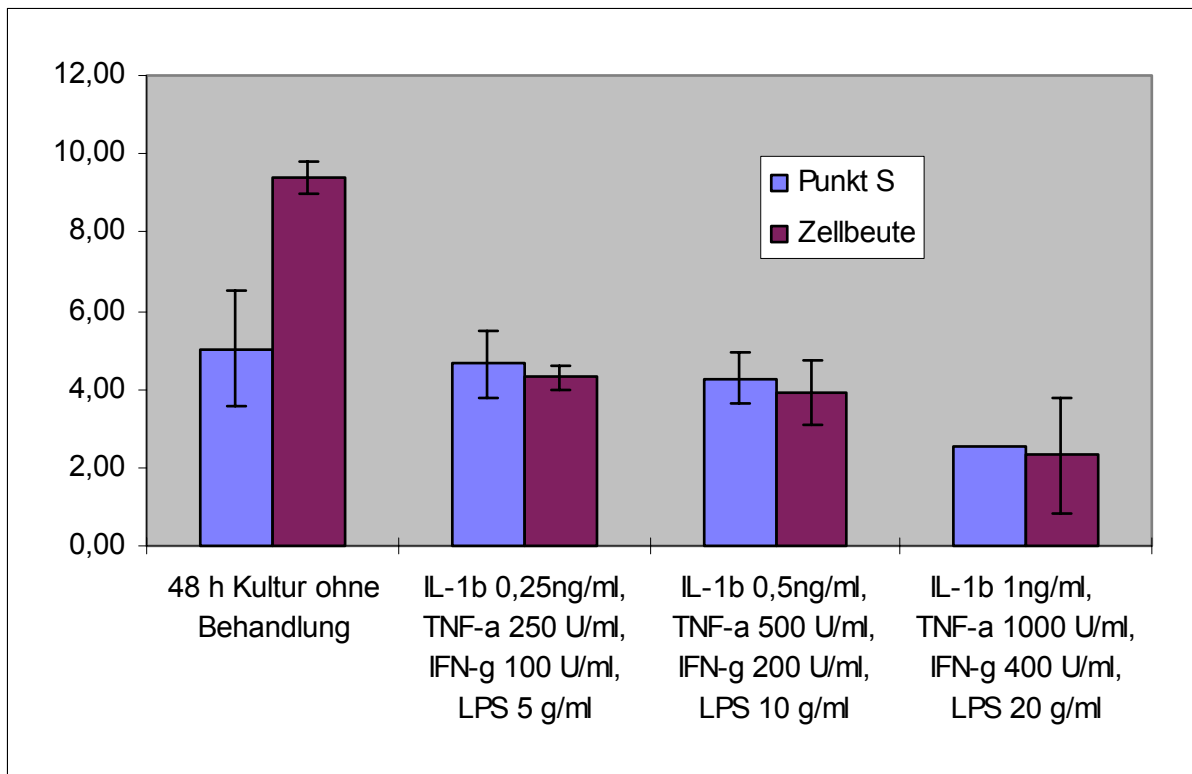
4.2 Proliferation stimulierter Knochenmarkszellen (IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS im Vergleich zu GM – CSF, IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS)

4.2.1 IL 1 β (0,5ng/ml), TNF α (500 U/ml), IFN γ (200 U/ml) und LPS (10 g/ml)

Die Zugabe von IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS zu der Zellkultur verminderte dosisabhängig die Proliferationsrate und Zellzahl. (Abb. 18)

Durch Zugabe von IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS sankt die Zellzahl signifikant von $0,94 \pm 0,15$ Mill. Zellen auf $0,39 \pm 0,03$ Mill. Zellen ab. Diese Reduzierung der Knochenmarkszellen spiegelte sich auch in der Abnahme der in der S - Phase befindlichen Zellen wieder. Befanden sich von 48 h in der unstimulierten Kultur $5,0 \pm 0,98$ % der Zellen in der S-Phase, so sank die Zahl der in der S-Phase befindlichen Zellen durch die Zugabe von IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS auf $4,3 \pm 0,84$ %. Dieser Unterschied ist nicht signifikant.

Die Wirkung der Kombination von IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS auf die Knochenmarkszellen war konzentrationsabhängig. Erfolgte eine Inkubation mit halber Standardkonzentration Konzentration von IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS ergab sich eine leichte Steigerung gegenüber der Standardmenge IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS auf $4,6 \pm 1,46$ % der in der S - Phase befindlichen Zellen. Wurden die Standardkonzentration von IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS verdoppelt nahmen die Anzahl der sich in der S - Phase befindlichen Zellen signifikant auf $2,53 \pm 0,63$ % ab. Diese Ergebnisse korrelierten ebenfalls mit den Werten der Zellzählung, da mit steigender IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS - Konzentration die Zellzahl absank.



	Zellen in Millionen	Zellen in der S - Phase in %
48 h Kultur ohne Behandlung	0,94 \pm 0,15	5,0 \pm 0,98
IL-1β 0,25ng/ml, TNF-α 250U/ml, IFN-γ 100U/ml, LPS 5 g/ml	0,43 \pm 0,08 ^a	4,6 \pm 1,46
IL-1β 0,5ng/ml, TNF-α 500U/ml, IFN-γ 200U/ml, LPS 10 g/ml	0,39 \pm 0,03 ^a	4,3 \pm 0,84
IL-1β 1ng/ml, TNF-α 1000U/ml, IFN-γ 400U/ml, LPS 20 g/ml	0,23 \pm 0,04 ^a	2,5 \pm 0,63 ^a

Signifikanz: $p \leq 0,05$: a) gegenüber Kultur ohne Stimulation

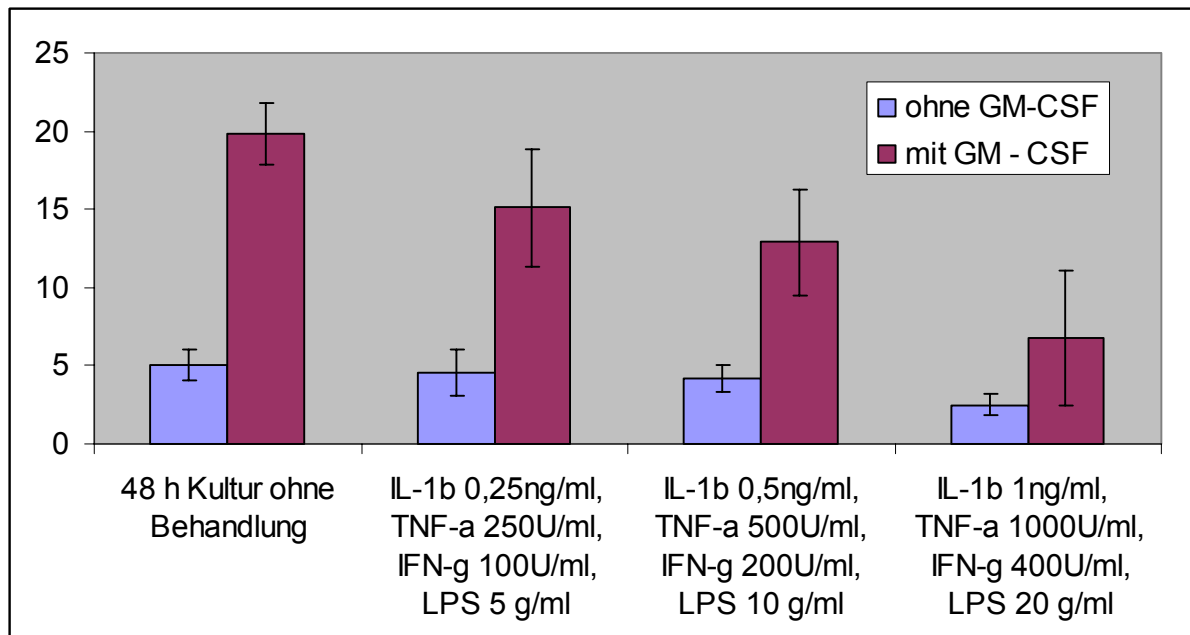
Abbildung 18 Die Kombination von *IL 1 β* , *TNF α* , *IFN γ* und *LPS* vermindert dosisabhängig die Proliferationsrate und Zellzahl

4.2.2 Die durch GM - CSF bedingte Steigerung der Proliferationsrate wurde dosisabhängig durch die Kombination von IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS supprimiert

Durch Zugabe des Wachstumsfaktors GM - CSF (10 ng/ml) und der Standardkonzentration der Kombination von IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS zur Kultur nahm die Proliferationsrate der 48 h inkubierten Knochenmarkszellen von 19,8 \pm 2,0% auf 12,9 \pm 3,4% ab. (Abb. 19)

Bei der Inkubation von GM-CSF (10ng/ml) und einer geringeren Konzentration des Zytokin-LPS-Gemisches (IL-1 β 0,25ng/ml, TNF- α 250U/ml, IFN- γ 100U/ml, LPS 5 g/ml) fiel die Abnahme der Proliferationsrate geringer aus als bei der Inkubation mit der Standardkonzentration der Kombination von GM-CSF, IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS. Bei einer Erhöhung der Konzentration des Zytokin-LPS-Gemisches auf das doppelte wurde die proliferationsstimulierende Wirkung von GM - CSF nahezu aufgehoben. Die Anteil der in der S-Phase befindlichen Knochenmarkszellen betrug bei hoher IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS- Konzentration nur 6,8 \pm 4,3% im Gegensatz zu 5,04 \pm 0,98% bei der 48 h Kultur ohne Behandlung.

Die Kultur von GM - CSF (10 ng/ml) mit IFN - γ (100 U/ml) und LPS (10 μ l/ml) senkte die Zellteilungsrate am stärksten bis auf 5,4 \pm 0,08 %.



	ohne GM-CSF	mit GM - CSF
48 h Kultur ohne Behandlung	5,0±0,98 %	19,8±2,0 %
IL-1β 0,25ng/ml, TNF-α 250U/ml, IFN-γ 100U/ml, LPS 5 g/ml	4,6±1,46 %	15,1±3,8 %
IL-1β 0,5ng/ml, TNF-α 500U/ml, IFN-γ 200U/ml, LPS 10 g/ml	4,2±0,84 %	12,9±3,4 %
IL-1β 1ng/ml, TNF-α 1000U/ml, IFN-γ 400U/ml, LPS 20 g/ml	2,5±0,63 % ^a	6,8±4,3 % ^a

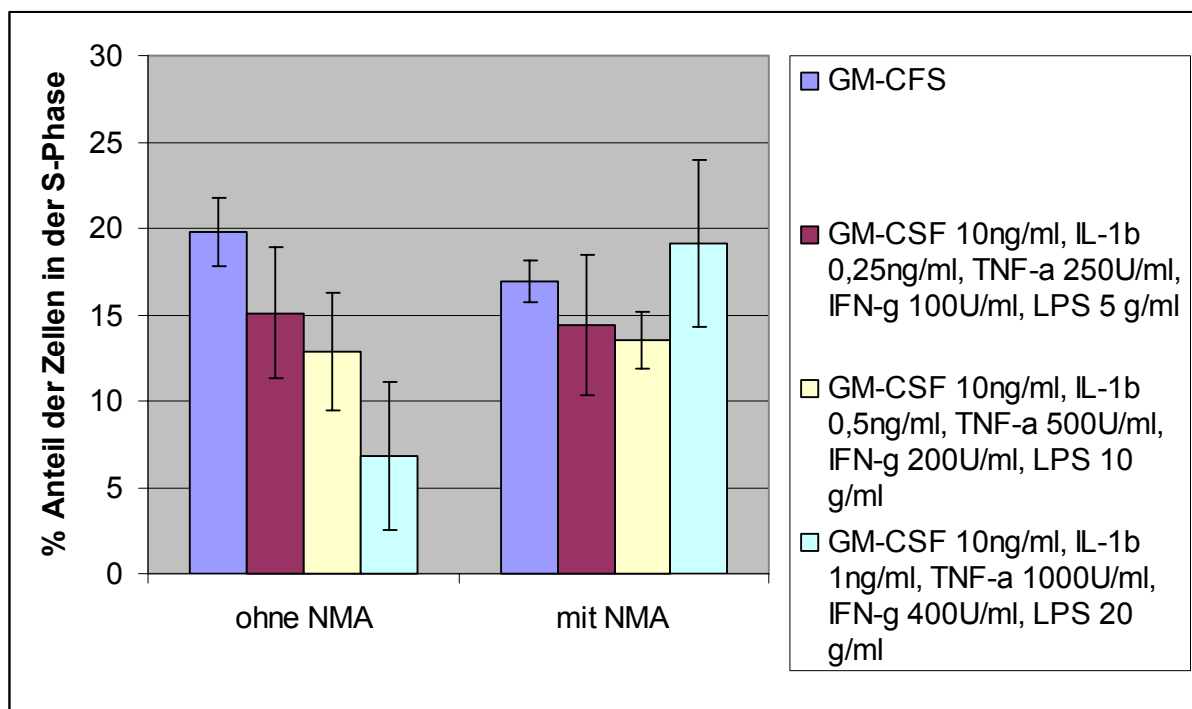
Signifikanz: $p \leq 0,05$: a) gegenüber Kontrolle

Abbildung 19 Die durch GM- CSF bedingte Steigerung der Proliferationsrate wird durch das Zytokin-LPS-Gemisch erneut supprimiert. Dargestellt wird der prozentuale Anteil der Zellen in der S-Phase.

4.2.3 Die Proliferationssuppression durch *IL 1β*, *TNF α*, *IFN γ* und *LPS* ließ sich mit *N - Methyl - L - Arginin (NMA)* antagonisieren.

Die durch GM-CSF stimulierte Proliferationsrate zeigte sich durch die Zugabe von N-Methyl –L-Arginin (NMA) nahezu unbeeinflusst. Es kam zu einer geringen Änderung der Zellteilungsrate von 19,8±2,0% auf 16,9±1,21% (Anteil der Zellen in der S-Phase).

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben nahm die GM-CSF bedingte Steigerung des Anteils der Zellen in der S-Phase dosisabhängig von $19,8 \pm 2,0\%$ auf $15,1 \pm 3,8\%$ bei der Inkubation mit niedriger und auf $6,8 \pm 4,3\%$ bei Inkubation mit hoher IL 1β , TNF α , IFN γ und LPS Konzentration ab. Diese Suppression der Proliferationsrate ließ sich durch Zugabe des NO- Synthesehemmers N- Methyl-L-Arginin $0,25 \text{ nM}$ (NMA) wieder antagonisieren, so daß mit $19,13 \pm 4,81\%$ die GM-CSF induzierte Proliferationsrate der Kontrollmäuse genau wieder erreicht wurde. (Abb. 20)



	ohne NMA	mit NMA 0,25 nM
GM-CSF	19,8±2,0 %	16,91±1,21 %
GM-CSF mit IL-1β 0,25ng/ml, TNF-α 250U/ml, IFN-γ 100U/ml, LPS 5 g/ml	15,1±3,8 %	14,43±4,09 %
GM-CSF mit IL-1β 0,5ng/ml, TNF-α 500U/ml, IFN-γ 200U/ml, LPS 10 g/ml	12,9±3,4 %	13,55±1,65 %
GM-CSF mit IL-1β 1ng/ml, TNF-α 1000U/ml, IFN-γ 400U/ml, LPS 20 g/ml	6,8±4,3 %	19,13±4,81 % ^a

Signifikanz: $p \leq 0,05$: a) ohne NMA

Abbildung 20 Die Proliferationssuppression durch GM - CSF mit IL 1β , TNF α , IFN γ und LPS ließ sich mit N - Methyl - L - Arginin (NMA) antagonisieren. Dargestellt wird der prozentuale Anteil der Zellen in der S-Phase.

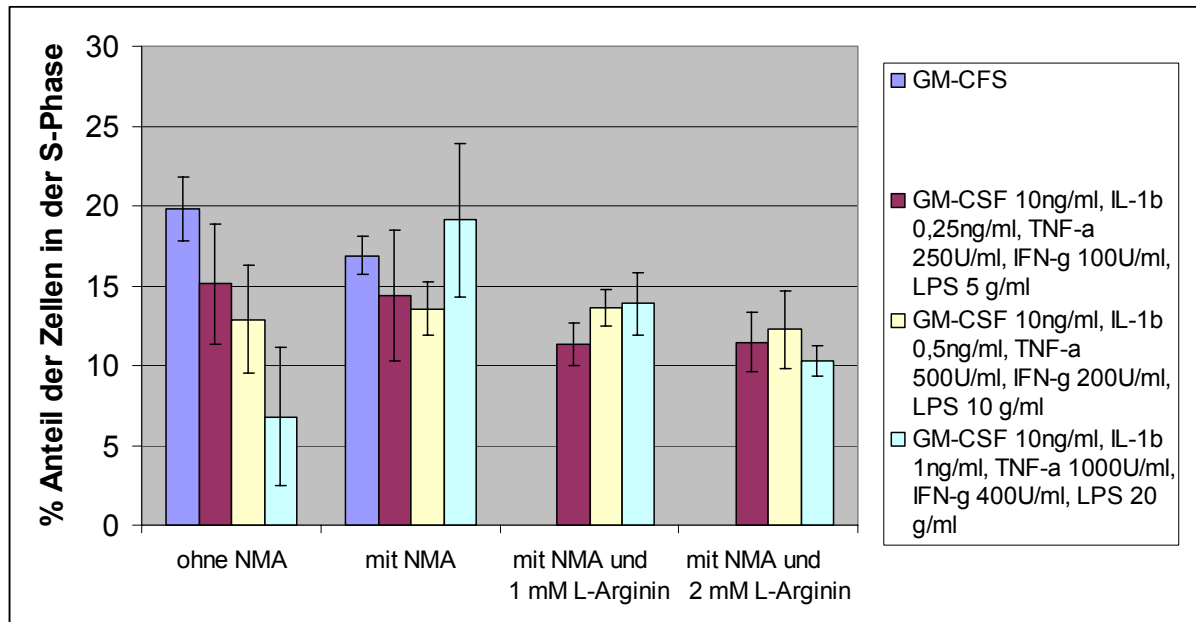
4.2.4 Antagonisierung des Proliferationssteigenden Effekts von N- Methyl- L- Arginin (NMA) durch L-Arginin

Wie vorhergehend beschrieben ließ sich Proliferationssuppression durch IL 1 β , TNF α , IFN γ und LPS I mit N - Methyl - L - Arginin (NMA) wieder aufheben.

Die Antagonisierung des NO-Synthesehemmers durch Gabe des Substrates L-Arginin führte wieder zur Suppression der Proliferation. (Abb. 21)

Bei den Versuchen mit GM-CSF (10ng/ml) und einer hohen Konzentration des Zytokin-LPS-Gemisches (IL-1 β 1ng/ml, TNF- α 1000U/ml, IFN- γ 400U/ml, LPS 20 g/ml) führte die Konzentration von 2 mM/ml L-Arginin zu einem signifikanten Absinken der Proliferationsrate auf 10,3 \pm 0,95 %. Durch niederkonzentrierte Gabe von L - Arginin (1mM/ml) fiel die Proliferationsrate nicht signifikant auf 13,63 \pm 1,11 % ab.

Bei Inkubation der Knochenmarkzellen mit GM - CSF, NMA, L - Arginin und niedere oder mittlere Konzentrationen des Zytokin-LPS-Gemisches zeigte sich ebenfalls eine deutliche erneute Suppression der Zellteilungsrate, es kam jedoch zu keiner signifikanten Hemmung der Proliftrationsrate.



	ohne NMA	mit NMA 0,25 nM	mit NMA 0,25 nM und 1 nM L-Arginin	mit NMA 0,25 nM und 2 nM L-Arginin
GM-CSF	19,8±2,0 %	16,91±1,21 %		
GM-CSF mit IL-1β 0,25ng/ml, TNF-α 250U/ml, IFN-γ 100U/ml, LPS 5 g/ml	15,1±3,8 %	14,43±4,09 %	11,30±1,32 %	11,45±1,87 %
GM-CSF mit IL-1β 0,5ng/ml, TNF- α 500U/ml, IFN-γ 200U/ml, LPS 10 g/ml	12,9±3,4 %	13,55±1,65 %	13,63±1,11 %	12,25±2,45 %
GM-CSF mit IL-1β 1ng/ml, TNF-α 1000U/ml, IFN-γ 400U/ml, LPS 20 g/ml	6,8±4,3 %	19,13±4,81 % ^a	13,87±1,98 %	10,30±0,95 % ^b

Signifikanz: p ≤ 0,05: a) gegenüber ohne NMA

b) gegenüber mit NMA

Abbildung 21

Die durch den das Zytokin-LPS- Gemisch verursachte Supprimierung der durch GM-CSF induzierte Stimulation der Proliferationsrate ließ sich mit Hilfe von NMA antagonisieren, dieser Effekt ließ sich durch das Substrat L-Arginin wieder aufheben. Dargestellt wird der prozentualer Anteil der Zellen in der S-Phase.

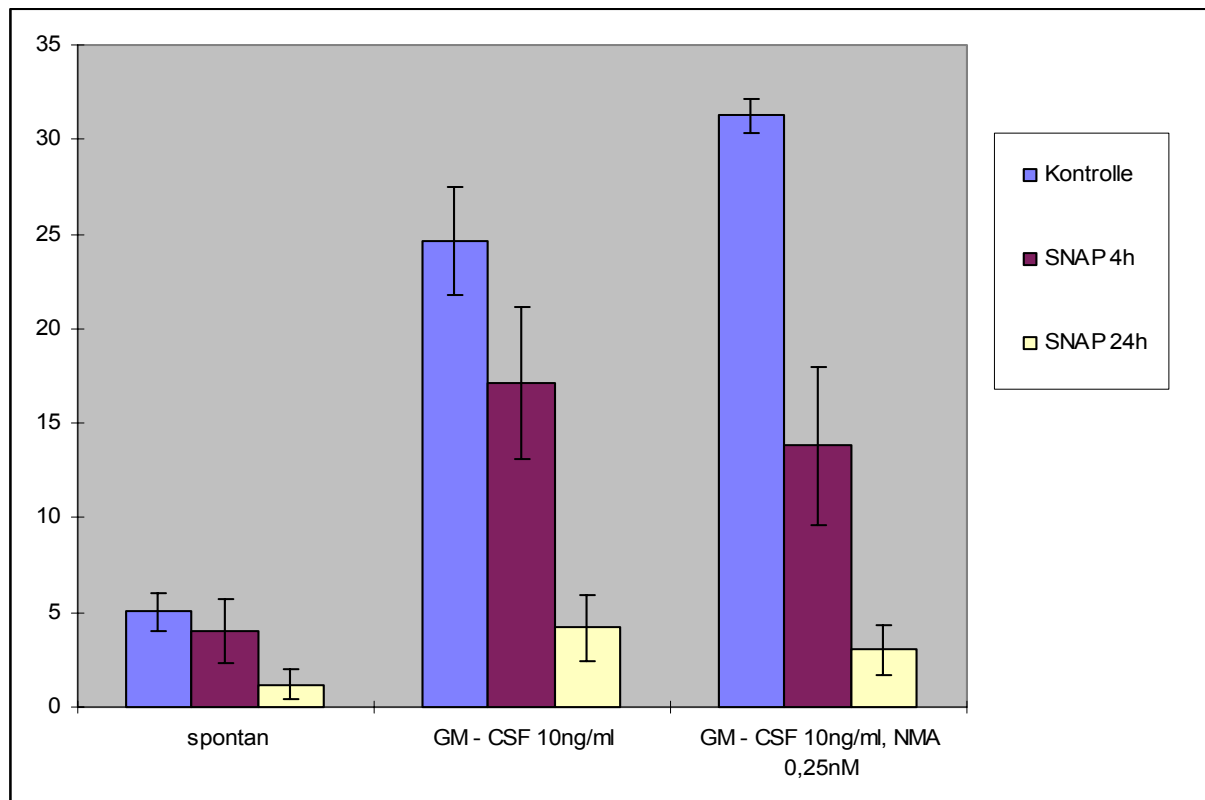
4.2.5 Die exogene NO - Exposition durch S-Nitroso-Acetylpenicillamin (SNAP) hebt die durch GM - CSF induzierte Poliferationssteigerung auf

Die Zellteilungsrate nicht stimulierten Knochenmarkszellen wurde durch eine exogene Stickoxid Exposition mit SNAP nicht signifikant beeinflusst. Die Inkubation mit SNAP über 4 Stunden führte zu NO_2 Werten im Überstand von $74,0 \pm 28,4$ nmol/ml. Dadurch wurde die durch GM - CSF induzierte Stimulation der Proliferation von $19,8 \pm 2,0$ % (GM-CSF) nur unwesentlich auf $17,1 \pm 3,9$ % (GM-CSF mit SNAP 4h) gesenkt.

Bei einer SNAP Exposition der Knochenmarkszellen über 24 Stunden wurden im Überstand noch höhere NO-Spiegel erreicht ($229,8 \pm 28,9$ nmol/ml NO_2 im Überstand). Dieser beträchtliche NO_2 - Wert hob die von GM - CSF induzierte Proliferationssteigerung vollständig auf. (Abb. 22)

Erwartungsgemäß wurde durch NMA die Hemmung der Proliferationsrate durch exogene NO- Exposition nicht verändert. Ein Einfluß auf die NO - Konzentration durch NMA blieb ebenfalls aus.

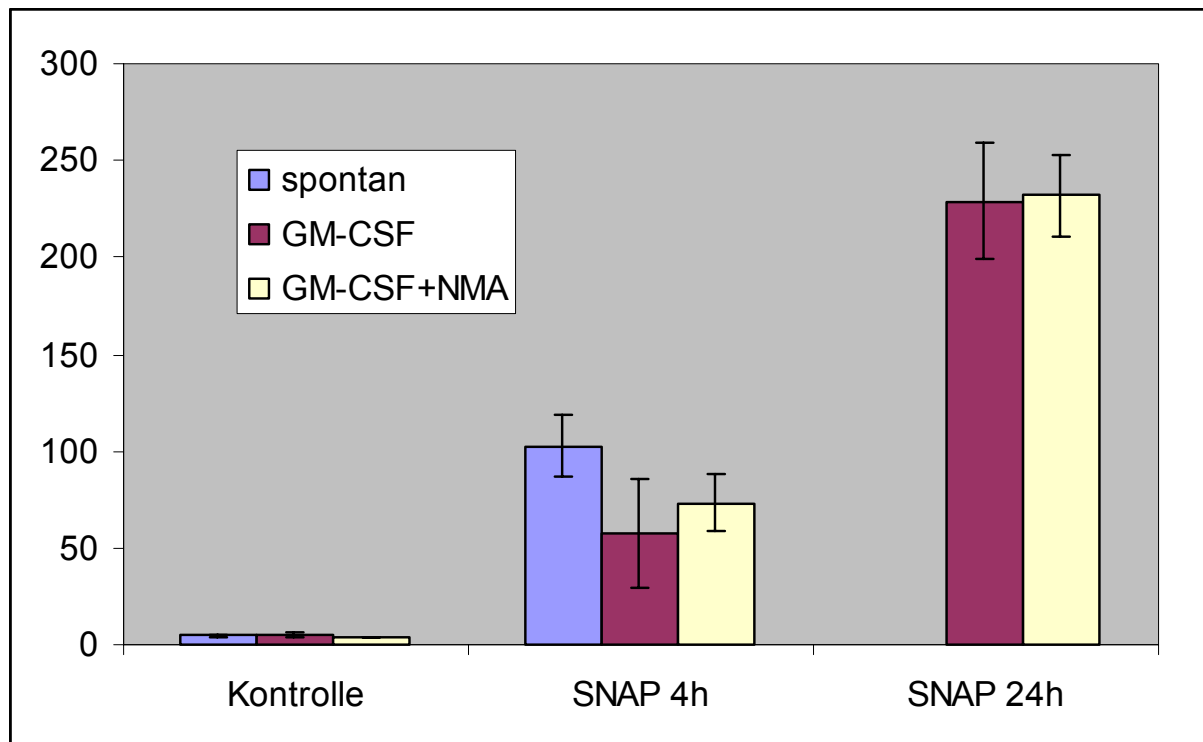
Die Inkubation mit 4h SNAP bei GM-CSF induzierter Knochenmarksproliferation ist nicht signifikant. Nach 24 h SNAP Exposition jedoch kommt es zu einem Signifikanten Anstieg der NO-Konzentration im Zellüberstand. Dabei ist zu beachten, daß die spontane Proliferation nicht mehr nachweisbar und die GM-CSF induzierte Proliferation komplett aufgehoben war. (Abb. 23)



	<i>Kontrolle</i>	<i>SNAP 4h</i>	<i>SNAP 24h</i>
spontan	5,04±1,01	4,025±1,66	1,2±0,82
GM- CSF 10 ng/ml	24,6125±2,87	17,125±3,98	4,2±1,72
GM-CSF 10ng/ml, NMA 0,25nM	31,25±0,92	13,8±4,42	3,05±1,31

Abbildung 22

Exogene NO - Exposition durch S-Nitroso-Acetylpenicillamin (SNAP) hob die durch GM - CSF induzierte Poliferationssteigerung auf. Dargestellt wird der prozentualer Anteil der Zellen in der S-Phase.



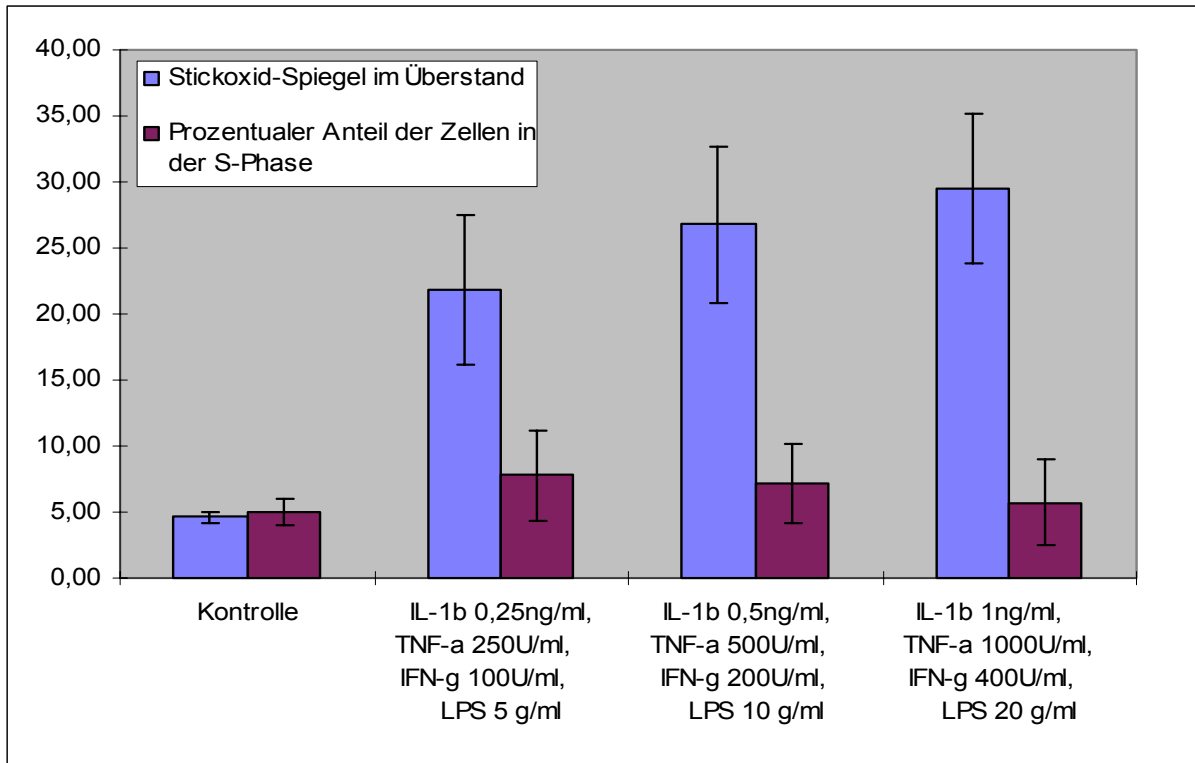
	<i>Kontrolle</i>	<i>SNAP 4h</i>	<i>SNAP 24h</i>
spontan	4,60±0,45	102,73±16,36	
GM-CSF	5,10±0,73	57,56±28,07	229,76±29,77
GM-CSF+NMA	3,90±0,24	73,14±15,00	232,20±21,33

Abbildung 23 Exogene NO - Exposition durch S-Nitroso-Acetylpenicillamin (SNAP) hob die durch GM - CSF induzierte Poliferationssteigerung auf. Dargestellt wird die Stickoxidfreisetzung in mmol/ml.

4.3 Auswirkungen der Stickoxid-Biosynthese auf die Proliferation von Knochenmarkszellen

4.3.1 Durch das Zytokin-LPS-Gemisches (IL-1 β 0,5ng/ml, TNF- α 500U/ml, IFN- γ 200U/ml, LPS 10 g/ml) wurde die Stickoxid - Biosynthese dosisabhängig induziert.

Die in vorhergehend beschriebene antiproliferative Wirkung des des Zytokin-LPS-Gemisches (IL-1 β 0,5ng/ml, TNF- α 500U/ml, IFN- γ 200U/ml, LPS 10 g/ml), geht mit einer erhöhten NO - Biosynthese der Knochenmarkszellen einher. Die Stickoxid - Synthese, die durch Bestimmung der NO₂- Konzentration im Kultur- Überstand quantifiziert wurde, stieg von 4,6 \pm 0,4 nmol/ml (ohne Stimulation) auf 21,8 \pm 5,5 nmol/ml bei niedriger Dosierung des CMMIX. Erfolgt die Inkubation mit hoher Konzentration des Zytokin-LPS-Gemisches, stieg der NO - Spiegel weiter auf 29,52 \pm 5,5 nmol/ml. (Abb. 24)



	Kontrolle	IL-1β 0,25ng/ml, TNF-α 250U/ml, IFN-γ 100U/ml, LPS 5 g/ml	IL-1β 0,5ng/ml, TNF-α 500U/ml, IFN-γ 200U/ml, LPS 10 g/ml	IL-1β 1ng/ml, TNF-α 1000U/ml, IFN-γ 400U/ml, LPS 20 g/ml
NO	4,60±0,45	21,82±5,62 ^a	26,80±5,92 ^a	29,52±5,70 ^a
Punkt S	5,04±1,01	7,78±3,45	7,15±2,99	5,73±3,24

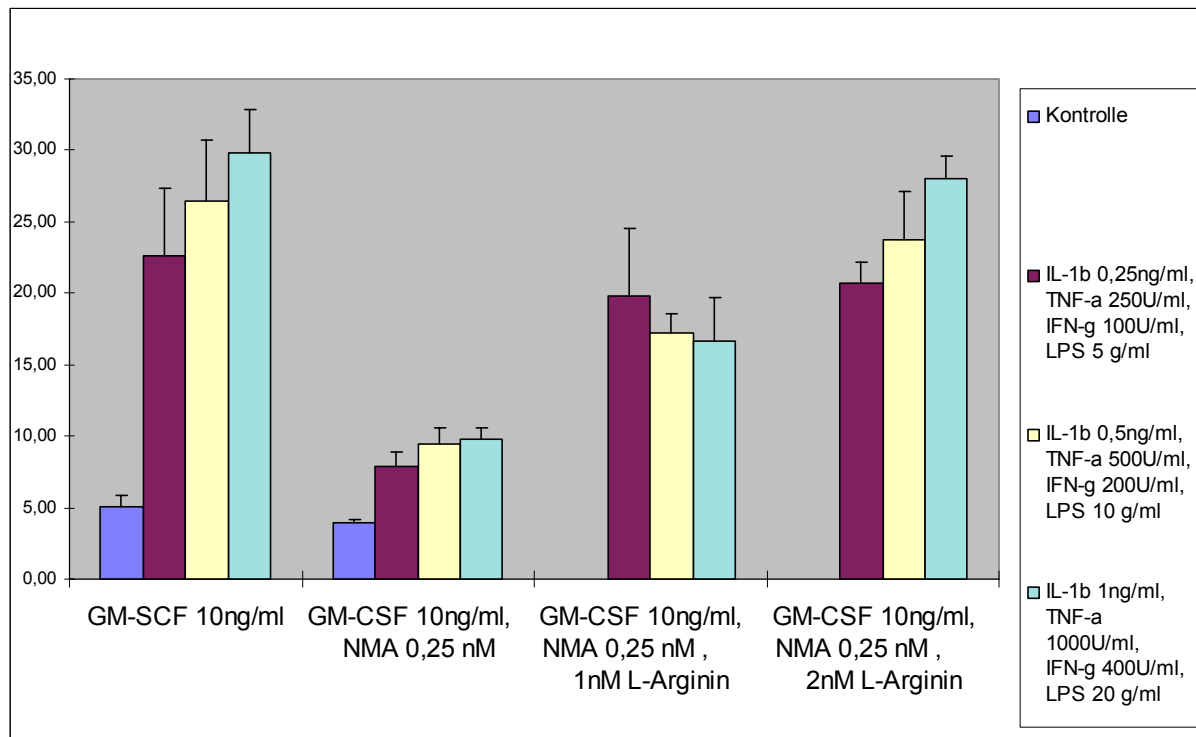
Signifikanz: $p \leq 0,05$: a) gegenüber ohne CM

Abbildung 24 Durch das Zytokin-LPS-Gemisch wurde die Stickoxid - Biosynthese dosisabhängig induziert. Dargestellt wird die Stickoxidfreisetzung in mmol/ml.

4.3.2 Die Induktion der Stickoxid - Synthese durch das Zytokin-LPS-Gemisch (IL-1 β 0,5ng/ml, TNF- α 500U/ml, IFN- γ 200U/ml, LPS 10 g/ml) ließ sich durch NMA hemmen und durch L - Arginin wieder herstellen.

Die Inkubation von Knochenmarkszellen mit GM - CSF (10ng/ml) beeinflusste die basale Stickoxid - Biosynthese nicht. Wurden jedoch die Knochenmarkszellen mit GM - CSF und dem Zytokin-LPS-Gemisch stimuliert, führte dies zu einem Abfall der Proliferationsrate bei gleichzeitigem Anstieg der NO – Biosynthese. Die NO₂-Konzentration im Kultur- Überstand stieg von 5,1 \pm 0,7 nmol/ml (GM - CSF 10ng/ml) auf 22,5 \pm 3,5 nmol/ml bei niedriger Dosis des Zytokin-LPS-Gemisches (IL-1 β 0,25ng/ml, TNF- α 250U/ml, IFN- γ 100U/ml, LPS 5 g/ml) und auf 29,7 \pm 3,1 nmol/ml bei hoher Dosis des Zytokin-LPS-Gemisches (IL-1 β 1ng/ml, TNF- α 1000U/ml, IFN- γ 400U/ml, LPS 20 g/ml).

Wie vorhergehend beschrieben führte die zusätzliche Gabe von NMA erneut zum Anstieg der Proliferation, analog verringerte NMA die durch das Zytokin-LPS-Gemisch induzierte Stickoxid- Synthese auf 7,9 \pm 1,02 nmol/ml bei niedriger und 9,84 \pm 0,76 nmol/ml bei hoher Dosierung des Zytokin-LPS-Gemisches. Diese NO-Spiegel liegen nur mäßig über der Basalproduktion an Stickoxid. Durch ein Überangebot der Substrates L- Arginin war es möglich, die beschriebene Induktion der Stickoxid- Spiegel wieder herzustellen. Die im Überstand gemessenen NO₂-Konzentrationen stiegen bei zusätzlicher Gabe von 2 mM L- Arginin erneut auf Werte ähnlich der vor der NMA Gabe an, bei niedriger 20,7 \pm 1,4 nmol/ml und 28,0 \pm 1,5 nmol/ml bei hoher Dosis der Zytokin-LPS-Mischung. (Abb. 25)



	Kontrolle	IL-1β 0,25ng/ml, TNF-α 250U/ml, IFN-γ 100U/ml, LPS 5 g/ml	IL-1β 0,5ng/ml, TNF-α 500U/ml, IFN-γ 200U/ml, LPS 10 g/ml	IL-1β 1ng/ml, TNF-α 1000U/ml, IFN-γ 400U/ml, LPS 20 g/ml
GM-SCF 10ng/ml	5,10± 0,73	22,58± 4,81	26,48± 4,21	29,78± 3,12
GM-CSF 10ng/ml, NMA 0,25 nM	3,90± 0,24	7,92 ± 1,02 ^a	9,44± 1,10 ^a	9,84± 0,76 ^a
GM-CSF 10ng/ml, NMA 0,25 nM, 1nM L-Arginin		19,83 ± 4,71 ^b	17,20± 1,35	16,70± 2,96
GM-CSF 10ng/ml, NMA 0,25 nM, 2nM L-Arginin		20,70± 1,46 ^b	23,80± 3,34 ^b	28,00±1,55 ^b

Signifikanz: $p \leq 0,05$: a) gegenüber GM-CSF

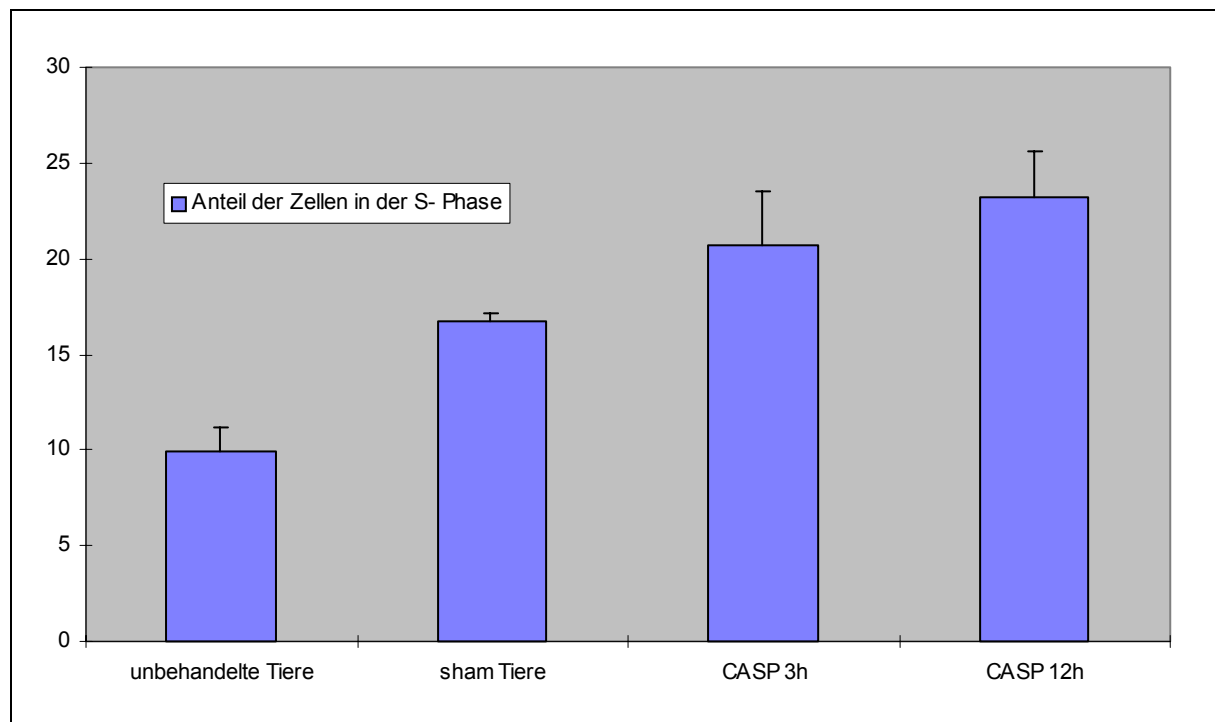
b) gegenüber GM-CSF und NMA

Abbildung 25 Die Induktion der Stickoxid - Synthese durch das Zytokin-LPS-Gemisch wurde durch NMA gehemmt und durch L - Arginin wieder restauriert. Dargestellt wird die Stickoxidfreisetzung in mmol/ml.

4.4 Der Einfluß der durch das CASP- Modell induzierten Peritonitis auf die Proliferation von Knochenmarkszellen

4.4.1 Die durch das CASP- Modell induzierte Peritonitis führte zu einer Erhöhung der Proliferationsrate im Knochenmark

Die Knochenmarkszellen der sham- operierten Tiere zeigten unmittelbar nach Entnahme mit einem Anteil an Zellen in der S-Phase von $16,7 \pm 0,4$ % eine deutlich erhöhte Proliferationsrate gegenüber Zellen von unbehandelten Mäusen ($9,9 \pm 1,3$ % Anteil der Zellen in der S- Phase). Die Induktion einer Peritonitis durch das CASP- Model führt zu einem weiteren Anstieg der Proliferationsrate der Knochenmarkszellen auf $20,7 \pm 2,8$ % bei Mäusen 2 Stunden nach CASP und auf $23,2 \pm 2,4$ % zwölf Stunden nach CASP. (Abb. 26)



	Unbehandelte Tiere	Sham Tiere	CASP 3h	CASP 12h
Anteil der Zellen in der S- Phase	9,9±1,3 %	16,7±0,4 %	20,7±2,8%	23,2±2,4%

Abbildung 26 Die durch das CASP- Modell induzierte Peritonitis führt zu einer Proliferationssteigerung im Knochenmark. (Anteil der Zellen in der S-Phase)

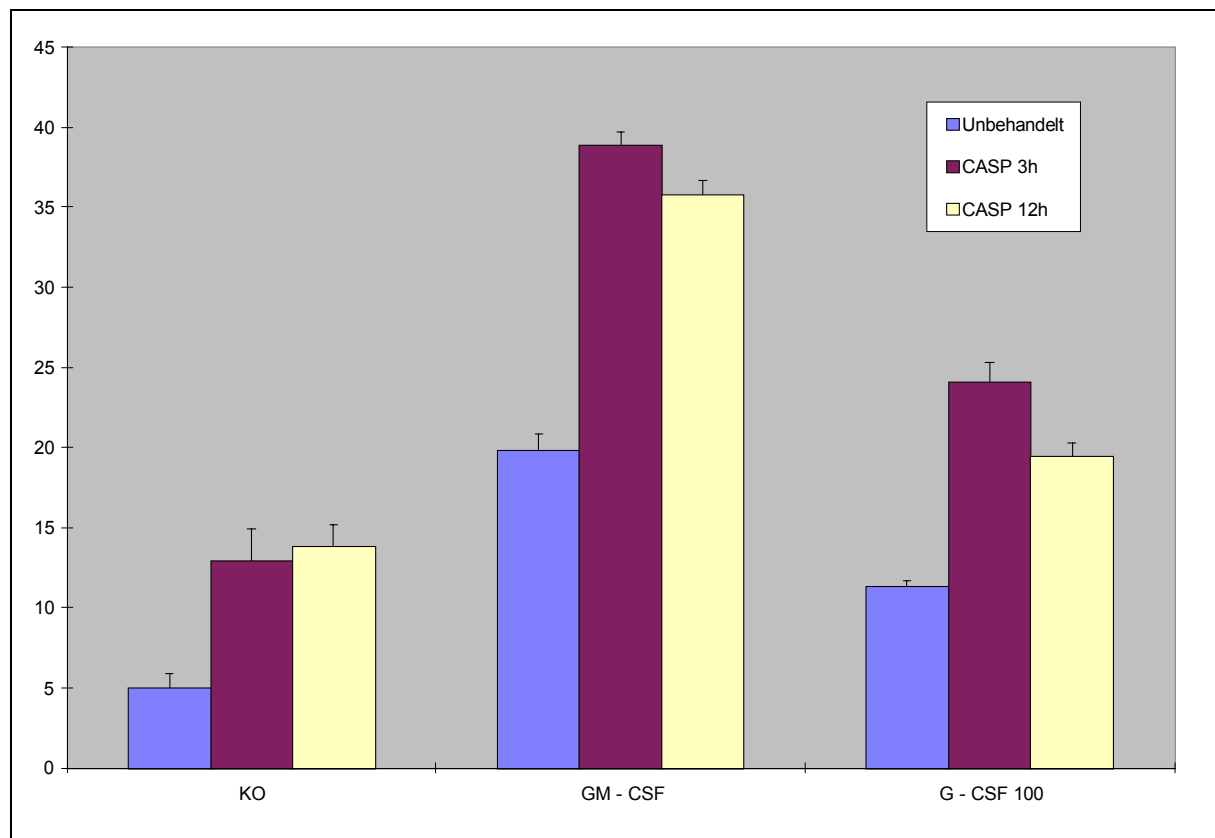
4.4.2 CASP und Kontrolle

Die Induktion einer Peritonitis im CASP- Modell führte schon unmittelbar nach Knochenmarksentnahme zu einer deutlichen Proliferationssteigerung gegenüber den unbehandelten und sham-operierten Tieren. In der Frühphase der Peritonitis auf 20,7±2,8% und in der Spätphase auf 23,2±2,4%. (siehe Abbildung 26)

4.4.3 Die Proliferationsrate ließ sich bei CASP- Mäusen durch GM - CSF in geringerem Maße stimulieren als bei unbehandelten Mäusen.

Wird das Knochenmark der CASP- Mäuse in Kultur über 48 Stunden genommen, sank bei der nicht stimulierten Kontrolle die Proliferationsrate ab auf $13,8 \pm 0,4\%$ (CASP 12h) und $12,9 \pm 1,01\%$ (CASP 3h).

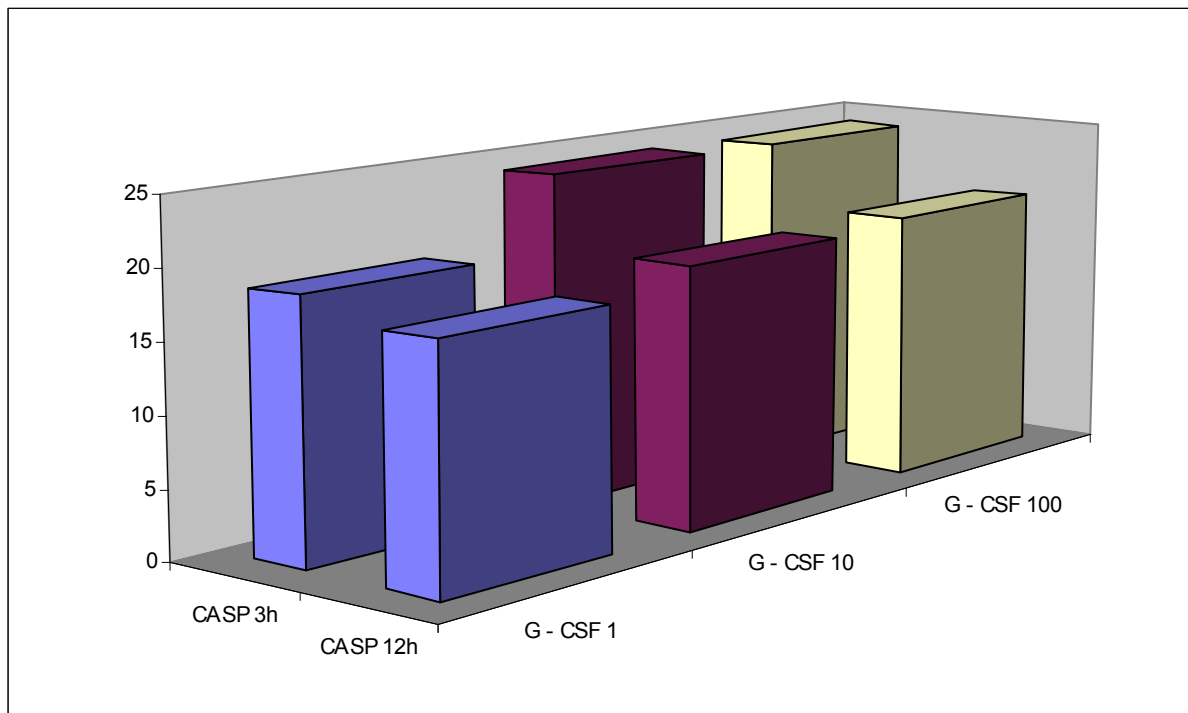
Wuchs die Proliferationsrate der Knochenmarkszellen in Kultur bei den unbehandelten Mäusen durch GM - CSF Gabe über 48 Stunden auf vierfache Werte ($5,0 \pm 0,9\%$ auf $19,8 \pm 2,0\%$) führte die Stimulation durch GM - CSF an Knochenmarkszellen von CASP- Mäusen nur zu dreifachen Werten ($12,9 \pm 0,1\%$ auf $38,98 \pm 0,79\%$ (beide Werte von CASP 3h)). Die CASP 3h Kultur führte zu einem stärkeren Proliferationsanstieg als die CASP 12h. (Abb. 27)



	Unbehandelt	CASP 3h	CASP 12h
Kontrolle	5,0± 0,9 %	12,9± 1,0 %	13,8± 0,4 %
GM - CSF	19,8± 2,0 %	38,9± 0,8 %	35,8± 1,2 %
G - CSF 100	11,3± 1,4 %	24,1± 0,9 %	19,5± 0,8 %

Abbildung 27 Die Proliferationsrate ließ sich bei CASP- Mäusen durch GM - CSF in geringerem Maße stimulieren als bei unbehandelten Mäusen. Dargestellt ist der Anteil der Zellen in der S-Phase.

Die Gabe von G - CSF bewirkte jedoch nur eine geringe Teilungsanregung. In der Kultur von Zellen aus unbehandelten Mäusen wird durch die G - CSF Gabe immerhin eine Verdopplung der Werte erreicht. Bei der G - CSF Gabe war in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100ng/ml kein Einfluß auf die Proliferation der Knochenmarkszellen zu verzeichnen. (Abb. 28)



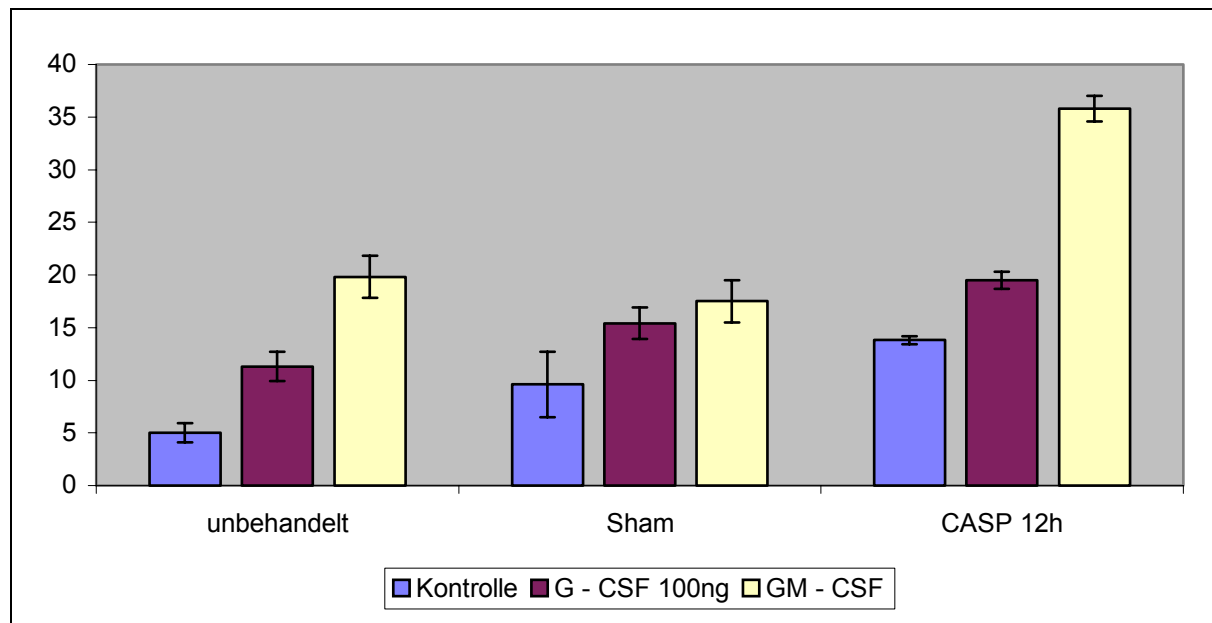
	CASP 3h	CASP 12h
G - CSF 1	18,65 ± 1,37	17,2 ± 1,93
G - CSF 10	24,15 ± 2,28	18,83 ± 1,89
G - CSF 100	24,1 ± 0,89	19,5 ± 0,8

Abbildung 28 Die Gabe von G – CSF in unterschiedlichen Dosierungen bewirkte nur eine geringe Teilungsanregung.

4.4.4 Die Knochenmarkszellen der sham- operierten Tiere zeigen durchwegs eine geringere Proliferationsrate im Vergleich mit CASP- Mäusen

Nach Kultur von Zellen der sham- operierten Tiere lag die Proliferationsrate mit $9,6 \pm 3,1$ % (Anteil der Zellen in der S- Phase) unter der bei CASP- Mäusen ($13,83 \pm 0,41$ bei CASP 12h). Jedoch war sie deutlich über der Zellteilungsrate bei unbehandelten Tieren mit $5,0 \pm 0,9$ %. Inkubation mit GM - CSF führt bei den sham- operierten Tieren nur zu einer Erhöhung der Proliferationsrate auf $17,52 \pm 2,08$ %.

Diese Proliferationsrate entspricht der Steigerung die durch die Inkubation mit G- CSF (100 ng/ml) erreicht wird ($5,4 \pm 1,59\%$ Zellen in der S-Phase). Bei CASP- Mäusen ist der Einfluß der beiden Wachstumsstimulanten anders: Die Wirkung von G- CSF ist nur sehr gering, im Gegensatz dazu führte GM – CSF zu eine Verdreifachung der Proliferationsrate. (Abb. 29)



	unbehandelt	Sham	CASP 12h
Kontrolle	5,0 ± 0,9	9,6 ± 3,1	13,8 ± 0,4
G - CSF 100ng	11,3 ± 1,4	15,4 ± 1,5	19,5 ± 0,8
GM - CSF	19,8 ± 2,0 ^a	17,5 ± 2,0	35,8 ± 1,2 ^a

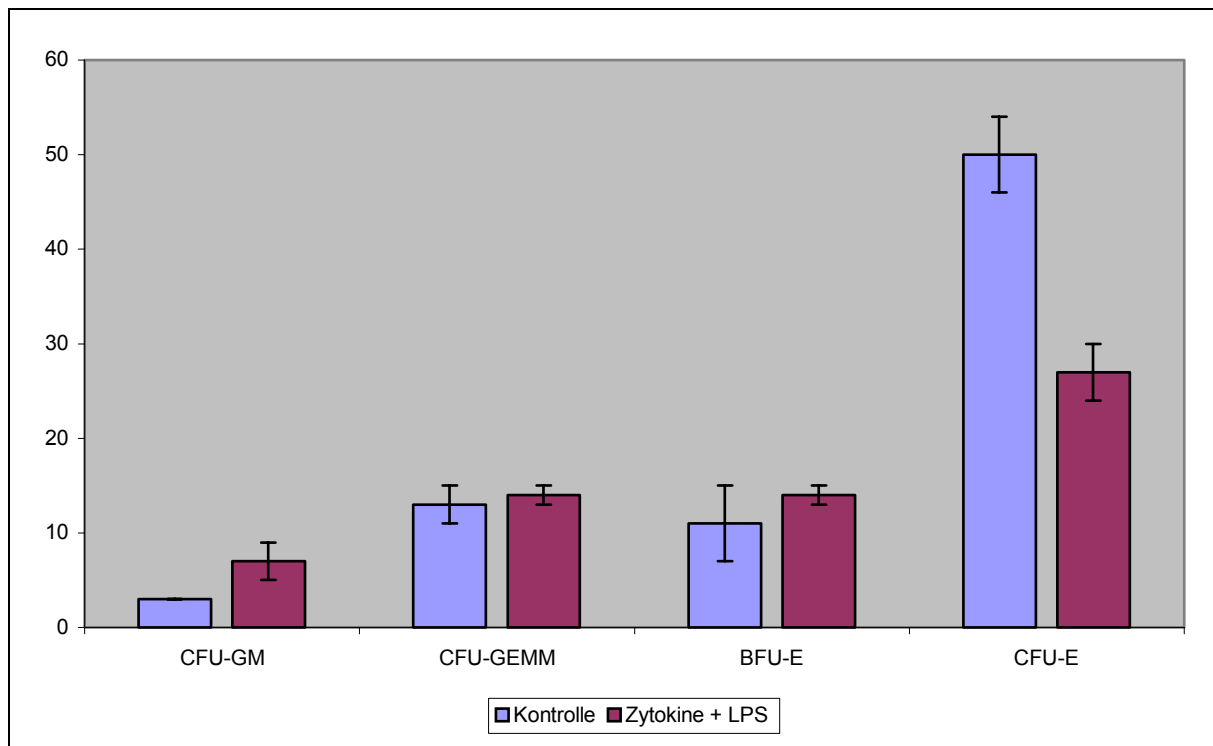
Signifikanz: $p \leq 0,05$: a) gegenüber Kontrolle

Abbildung 29 Die Knochenmarkszellen der sham- operierten Tiere zeigen eine geringere Proliferationsrate als CASP- Model Mäusen. Dargestellt ist der Anteil der Zellen in der S-Phase.

4.4.5 Colony forming units (CFU)

Die Stammzellfunktion un behandelter Mäuse zeigt unter Zugabe von niedriger und hoher Dosis an Zytokinen und LPS eine auffällige Ähnlichkeit mit den im CASP-Model gewonnenen Ergebnissen.

Die Inkubation mit Zytokine und LPS in niedriger Dosis führt zu einem Anstieg der Kolonienzahl vor allem der unreifen Zellreihen BFU-E und CFU-GEMM. Dieser Anstieg nimmt bei der hohen Konzentration von Zytokine und LPS wieder ein wenig ab. Die differenzierten Zellreihe CFU-E wird durch die Zytokine und LPS Mischung supprimiert, während die Phagozyten-Vorläuferreihe CFU-GM durch die hohe Dosis stimuliert wird. (Abb. 30)

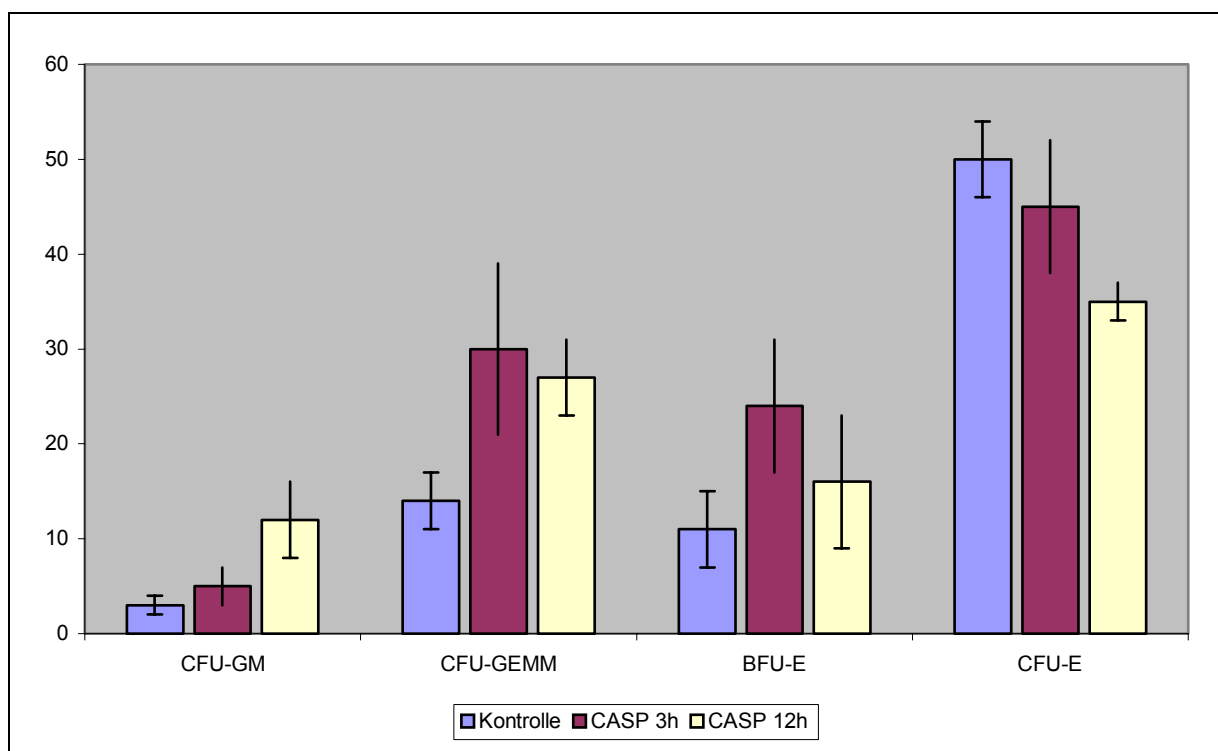


	CFU-GM	CFU-GEMM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	3 ± 0	13 ± 2	11 ± 4	50 ± 4
Zytokine + LPS	7 ± 2	14 ± 1	14 ± 1	27 ± 3

Abbildung 30 Die Inkubation mit Zytokine und LPS stimuliert unreife Knochenmarks-Stammzellen zu vermehrter Koloniebildung.

Die lange bestehende Peritonitis (CASP 12h) stimulierte vermehrt die unreifen Knochenmarksstammzellen. Bei den unreifen Zellreihen CFU-GEMM und BFU-E kam es zu einer signifikanten Verdopplung der Koloniezahlen, während es bei den differenzierteren Phagozyten- Vorläuferzellen CFU-GM zu einem geringen Anstieg und bei den differenzierteren Erythrozyten- Vorläuferzellen CFU-E zu einem leichten Abfall der Kolonienanzahl kam.

In der Frühphase der Peritonitis (CASP 3h) zeigten sich ähnliche, jedoch nicht signifikante Ergebnisse.



	CFU-GM	CFU- GEMM	BFU-E	CFU-E
Kontrolle	3 ± 1	14 ± 3	11 ± 4	50 ± 4
CASP 3h	5 ± 2	30 ± 9	24 ± 7	45 ± 7
CASP 12h	12 ± 4 ^a	27 ± 4	16 ± 7	35 ± 2

Signifikanz: $p \leq 0,05$: a) gegenüber Kontrolle

Abbildung 31 Das Peritonitismodell stimuliert unreife Knochenmarks-Stammzellen zu vermehrter Koloniebildung.

5 Diskussion

Anfang der 90er Jahre berichteten Allen et al. und Koury, daß das fließende Gleichgewicht der Hämatopoese durch die Proliferation und Apoptose im Knochenmark reguliert wird. Dabei ist davon auszugehen, daß jede Verschiebung eines dieser beiden Parameter entweder zu einer Expansion der Blutbildung führt und damit eine Zunahme der Zelldichte bewirkt, oder aber bei überwiegendem Zelluntergang unterschiedliche Grade der Hypoplasie entstehen. Ziel dieser Arbeit war die Reaktion des Proliferationszyklus muriner Knochenmarkszellen auf ein septisches Krankheitsbild im Tiermodell, der diffusen Peritonitis, und in vitro durch Inkubation mit typischen Sepsismediatoren in Kombination mit dem bakteriellen LPS zu untersuchen. Besonderes Augenmerk wurde auf die Expression von endogenem Stickoxid (NO) und dessen Einfluß auf die Proliferation der Knochenmarkszellen.

Mikrobielle Organismen und ihre Zellwandbestandteile (Exo- und Endotoxine) führen bei der Sepsis zu einer Vielzahl humoraler und zellulärer Reaktionen des Organismus. Bei überschwelliger Aktivierung verschiedener Kaskadensysteme wie Gerinnung, Fibrinolyse, Komplement- und Kallikreinsystem werden Proteinase, spezifische Sepsis Mediatoren und Proteinaseinhibitor Komplexe generiert, die vielfältige humorale Interaktionen auslösen und zum Teil Thrombozyten, Leukozyten und Endothelien stimulieren. Die verschiedenen, aktivierten Zellarten setzen daraufhin ihrerseits Zytokine und weitere spezifische Mediatoren frei, die eine modulatorische Wirkung auf die Hämatopoese im Knochenmark haben. Zytokine und LPS aktivieren dosisabhängig die endogene NO-Synthese. Die hämatogenen Veränderungen führen primär zu einer Neutropenie oder Neutrophilie, Thrombozytopenie und einer disseminierten intravasalen Coagulopathie (DIC) (Mammen EF 1998). Die Erythropoese wird im Gegensatz dazu nur im geringen Maße beeinflusst.

Die von uns ex vivo analysierten Knochenmarkszellen unbehandelter Balb/c Mäuse zeigten eine geringe spontane Proliferationsrate sowie eine geringe Zahl an apoptotischen Zellen. Sepsis oder das operative Trauma führen wahrscheinlich mit adäquater Stresshormonfreisetzung zu einer deutlichen Zunahme der Proliferation. Der Anteil an in der S-Phase befindlichen Knochenmarkszellen von unbehandelten Mäusen betrug $9,9 \pm 1,3\%$. Bei den Mäusen mit alleinigem operativen Trauma (sham-

operierte Tiere) zeigte sich unmittelbar nach Entnahme eine deutliche Erhöhung der Proliferationsrate, mit $16,7 \pm 0,4\%$ der Zellen in der S-Phase. Die Induktion einer Peritonitis (CASP 12h) führte zu einem weiteren Anstieg der Proliferationsrate auf $23,2 \pm 2,4\%$. Die Erhöhung der Replikationsrate der Hämatopoese durch das alleinige operative Trauma und möglicherweise durch weitere Faktoren, wie eine durch Katecholaminausschüttung oder durch Vasodilatoren (z.B. NO) verursachte Zunahme der Knochenmarksdurchblutung zurückgeführt werden.

Der Anstieg der Proliferation bei Sepsis entsprach den Ergebnissen, die Mammen EF et al. 1998 in seinen Versuchen erzielte. Doch spricht die Proliferationssteigerung bei den sham-operierten Tieren dafür, daß der Anstieg sowohl auf nicht-entzündliche und entzündliche Mechanismen zurückzuführen ist. Die Proliferationssteigerung des Knochenmarks bei Mäusen in Abhängigkeit von der Ausdehnung der Peritonitis zeigt, daß der Triggermechanismus bereits sehr frühzeitig aktiviert wird und auch durch länger dauernde Sepsis nicht weiter steigerbar ist. In der Frühphase der Peritonitis mit Austritt von Darminhalt über 3 Stunden (CASP 3h: $20,7 \pm 2,8\%$ Zellen in der S-Phase) zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie in der Spätphase (CASP 12 h: $23,2 \pm 2,4\%$ Zellen in der S-Phase). Die überschießende Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, die durch das Eindringen von Mikroorganismen in den Blutkreislauf oder eine Endotoxämie ausgelöst wird, könnte hierbei eine Rolle spielen. Die Annahme, daß der Triggermechanismus bereits frühzeitig aktiviert wird, wird durch Barreiros AP gestützt. In einer Arbeit über *S. typhimurium* Infektionen bei Balb/c Mäusen zeigt er, daß es bereits in der ersten Stunde nach Infektion zu einer Zunahme der Expression von mRNA, welche für die Synthese der proinflammatorischen Cytokine zuständig ist, kommt.

Das CD34⁺-Kompartiment der Knochenmarkszellen besteht aus Zellen, die selektiv durch GM-CSF oder G-CSF stimuliert werden und aus Zellen, die auf beide Wachstumsfaktoren reagieren. Wird das Knochenmark von Mäusen mit Peritonitis über 48 Stunden in einer Zellkultur inkubiert, vermochte GM-CSF die Proliferationsrate im Gegensatz zur nicht stimulierten Kontrollgruppe mehr als zu verdoppeln. Die Inkubation mit G-CSF bewirkte jedoch nur eine geringe Teilungsanregung. Eine alleinige Stimulation der granulozytären Reihe war nicht ausreichend um zu einem eindeutigen Proliferationsschub zu führen. Erst die Aktivierung der Monozyten und ihrer Vorstufen führte zu einer deutlichen Steigerung der Replikationsrate. Auf diese grundsätzliche Wirkung von G-CSF und GM-CSF

kann die Diskrepanz in der Proliferationsanregung jedoch nicht zurückgeführt werden. Betrachtet man nämlich die Zellkulturen nicht operierter Mäuse, nahm die Proliferationsrate der Knochenmarkszellen in 48 Stunden Zellkultur bei den unbehandelten Mäusen aufgrund der Stimulation durch GM-CSF auf vierfach erhöhte Werte zu ($5,0 \pm 0,9\%$ auf $19,8 \pm 2,0\%$ der Zellen in der S-Phase). Die Replikationsrate stieg aufgrund des Einflusses von G-CSF ebenfalls signifikant von $5,0 \pm 0,9\%$ auf $13,80 \pm 1,88\%$ der Zellen in der S-Phase. Dies macht deutlich, daß die Stimulationsfähigkeit von G-CSF erst durch die Aktivierung verschiedener Triggermechanismen im Verlauf des septischen Geschehens, herabgesetzt wird.

Als mögliche Ursache für diese Diskrepanz in der Stimulationsintensität von GM-CSF und G-CSF kommen verschiedene Faktoren in Frage. Im Zuge der Peritonitis könnte es zu einem relativen Anstieg GM-CSF sensibler Zellen kommen oder zu einer unterschiedlichen Expression an GM-CSF und G-CSF Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Andererseits könnte das septische Geschehen auch Auswirkungen auf die Signaltransduktion zugunsten von GM-CSF in den Knochenmarkszellen haben.

Die Tatsache, daß die Proliferationsrate durch eine länger dauernde Sepsis nicht weiter steigerbar ist, wohl aber durch die Zugabe von GM-CSF bestätigt das Ergebnis von Feder LS 1994, wonach LPS die Zell-Rezeptor-Oberflächendichte für GM-CSF erhöht. Feder stellte in seinen Studien mit hepatischen endothelialen Zellen und Macrophagen fest, daß Wachstumsfaktoren (GM-CSF und M-CSF) die Proliferationsrate von mit Endotoxin (LPS) beimpften Ratten stärker stimulieren als in unkontrollierten Kontrolltieren. In einer anderen Studie wurde die Fähigkeit von TNF und LPS beobachtet, die Anzahl von G-CSF Rezeptoren auf Myeloidzellen zu senken. Diese beiden Studien unterstützten unsere Ergebnisse.

Sind bei der experimentellen Peritonitis, einmal Mikroorganismen in die Blutbahn gelangt, setzen diese körpereigene systemische Abwehrmechanismen in Gang, beginnend mit den zellulären Systemen (neutrophile Granulozyten, Monozyten / Makrophagen, Endothelzellen) und plasmatischen Systemen (Komplement-, Kallikrein-Kinin- und Gerinnungssystem). Um die Auswirkung der Entzündungsreaktion auf die Proliferation und Differenzierung des zellulären System beurteilen zu können untersuchten wir die Stammzellfunktion durch Auszählen der „colony forming units“.

Die durch das CASP-Modell induzierte Peritonitis weist einen bedeutenden Einfluß auf die „colony forming capacity“ der hämatogenen Stammzelle auf. In der Frühphase der Peritonitis (CASP 3h) wurden vermehrt die unreifen Knochenmarkstammzellen stimuliert. Bei den unreifen Zellreihen CFU-GEMM und BFU-E kam es zu einer Verdopplung der Koloniezahlen, während es bei den differenzierteren Phagozyten- Vorläuferzellen CFU-GM zu einem geringen Anstieg und bei den differenzierteren Erythrozyten- Vorläuferzellen CFU-E zu einem leichten Abfall der Kolonienanzahl kam.

Demgegenüber bewirkte die länger bestehende Sepsis (CASP 12h) bei der Phagozyten- Vorläuferreihe CFU-GM einen starken Anstieg auf das 2-3 Fache im Vergleich zu den nicht operierten Mäusen. Bei den Vorläuferzellen der Erythrozyten der CFU-E Zelllinie bewirkte eine lang andauernde Sepsis (CASP 12h) einen signifikante Abfall der Kollonienanzahl. Bei den unreifen Vorläuferzellreihen CFU-GEMM und BFU-E kam es zu keiner signifikanten Veränderung.

Dieser absolute Anstieg der Kollonienanzahl spricht für eine intakte Proliferation und Differenzierung der Vorläuferzellen im Knochenmark. Die durch die septischen Bedingungen hervorgerufene Apoptose in den Knochenmarkszellen betrifft in erster Linie die differenzierten Knochenmarkszellen und nicht die Stammzellen.

Wurden die Knochenmarkszellen unbehandelter Mäuse mit LPS und der Zytokin-Mischung inkubiert zeigte sich eine auffallende Ähnlichkeit in dem Einfluß auf die Knochenmarkstammzellen mit der Spätphase der Peritonitis (CASP 12h). Die differenzierte Stammzellpopulation CFU-E wurde durch Inkubation mit LPS und der Zytokin-Mischung supprimiert, während es zu einer Steigerung der Kolonieanzahl bei den undifferenzierten Vorläuferzellreihen CFU-GEMM und BFU-E kam. Die Phagozyten-Vorläuferreihe CFU-GM wurde nur durch hohe Dosen von LPS und unserer Zytokin-Mischung simuliert. Ähnliche Ergebnisse wurden beim letal verlaufenden CASP Modell nach 12h beobachtet.

Diese Ergebnisse widersprechen teilweise Angaben aus der Literatur, da sowohl für $\text{INF}\gamma$ (Raefsky 1985) als auch für $\text{TNF}\alpha$ (Zhang 1995) eine antiproliferative Wirkung auf die hämatopoetische Koloniebildung beschrieben wurde. Wang beobachtete 1995, daß $\text{INF}\gamma$ die BFU-E Reihe mit viel niedrigeren Dosen supprimiert wurde als die CFU-E Reihe. Diese Studien beschreiben die antiproliferative Wirkung von $\text{INF}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$, jedoch die Wirkung von $\text{IL-1}\beta$ und LPS, sowie die Kombination

aller vier Zytokine wurde nicht untersucht. Dies könnte eine Erklärung für die abweichenden Ergebnisse in unserer Arbeit sein.

Aufgrund der Ähnlichkeit des Verhaltens der CFUs bei dem lang andauernden Sepsismodell mit der Inkubation von unstimulierten Knochenmarkszellen mit LPS und der Zytokin-Mischung, wird dieser eine wichtige Rolle für die Knochenmarksfunktion im Verlauf einer Sepsis zugeschrieben. Die Aktivierung und Hemmung der Hämatopoese ist ein sehr komplexer Prozeß bei dem Stickoxid und hochreaktive Sauerstoffradikale sowohl direkte als auch indirekte schädigende Wirkungen auf die Knochenmarkszellen und der DNS nehmen.

In den letzten Jahren wächst unser Wissen über das einzigartige Molekül NO stetig. Dabei werden immer neue biochemische Regelkreise, einschließlich des Zellzyklus, beschrieben welche von Stickoxid beeinflusst werden. Stickoxid inhibiert die Proliferation von Lymphozyten und Dendriten und vermindert die Stammzellfunktion.

Die von uns verwendete LPS/ Zytokin-Mischung führt zu einer dosisabhängigen Induktion der Stickoxid-Biosynthese im Knochenmark. Dies konnte auch schon in anderen Arbeiten gezeigt werden, wobei die Kombination LPS und $IFN\gamma$ das effektivste war. Von Corran wurde 1990 gezeigt, daß die Kombination von LPS mit den Zytokinen $INF\gamma$, $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ bei Hepatozyten zu einer Induktion der NO-Synthese führt. Die Inkubation von Knochenmarkszellen mit LPS und $IFN\gamma$ führt zu einer Expression von mRNA der induzierbaren Stickoxid- Synthetase (iNOS). Dies konnte sowohl in PCR Analysen als auch in Northern-blot Analysen gezeigt werden. (Khwaja, A et al.) Im Gegensatz zu den anderen Isoformen der NOS (e-NOS, c-NOS), die durch den intrazellulären Calcium-Spiegel reguliert werden und stets in geringen Konzentrationen in den unterschiedlichsten Zellen vorhanden sind, muß die iNOS immer de-novo synthetisiert werden. Weiterhin konnte bewiesen werden, daß besonders diese verwendete LPS /Zytokin Kombination zu einer Hochregulierung der MCAT-2B (cationic-anionic-acid transporter) Expression führte. Dieser Mechanismus führt zu einem verstärkten L-Arginin-Transport, welches das Substrat für die NO-Synthese darstellt. (Closs et al.)

In der Zellkultur führte die Inkubation von Knochenmerkszellen mit der LPS/ Zytokin Mischung zu einer dosisabhängige Suppression der GM-CSF induzierten Steigerung der Proliferation. Diese Suppression wurde wahrscheinlich durch Aktivierung der endogene Stickoxid-Biosynthese verursacht, wie die Messung der NO_2 -

Konzentration im Zellkultur-Überstand zeigten. In weiteren Experimenten konnten wir einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Anteil der proliferierenden Zellen und der NO_2 -Konzentration im Kultur-Überstand zeigen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß Stickoxid nicht die basale, aber die durch GM-CSF stimulierte Proliferation von Knochenmarkszellen supprimiert. Diese Suppression, der durch GM-CSF induzierten Proliferation durch Stickoxid wurde auch schon von Punjabi beschrieben. Bei der Proliferationshemmung wirkt Stickoxid möglicherweise durch die Freisetzung von hochreaktiven Sauerstoffradikale. Bei der direkten Wirkung handelt es sich primär um einer Desaminierung von Purin- und Pyrimininbasen die DNS oder eine Inaktivierung der Ribonucleotidreductase und einer daraus folgenden Suppression der Proliferation. Die indirekten Wirkung beruht überwiegend auf einer Aktivierung der Guanylatcyclase, nachdem es an dessen Hämoglobinteil gebunden hat. Dieses Enzym katalysiert die Umbau von Guanylat triphosphat (GTP) zu Guanylatzyclase 3`5`-monophosphat (c-GMP). Die Erhöhung der Konzentration des intrazellulären Messengers cGMP führt zu einem großen Teil der von NO ausgelösten Veränderungen in der Zelle. Die andere wichtige indirekte Wirkung beruht auf einer Veränderung der Redox- Potentiale in der Zelle. Dies führt zu einer Aktivierung von NF-kappa B, welches zu einer Hochregulation von $\text{TNF}\alpha$ führt. Diese überhöhten intrazellulären $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen führen zu einer verstärkten Expression des FAS- Liganden und von FAS (CD95), das die Apoptose der zellen einleiten kann. Die durch LPS/ Zytokin induzierte endogene NO-Biosynthese läßt sich durch N-methyl-arginine (NMA) zum größten Teil inhibieren. Maciejewski konnte mit seinen Experimenten zeigen, daß L-NMA als Stickoxid-Inhibitor die NO-Effekte auf die Knochenmarkszellen zum größten Teil rückgängig macht.

Die durch die LPS /Zytokin- Kombination herbeigeführte Suppression der durch GM-CSF stimulierten Knochenmarkszellen ließ sich in Anwesenheit von einen endogenen Stickoxidinhibitor wie NMA wieder restaurieren. Für diese Hypothese spricht auch, daß der Effekt der Antagonisierung mit Hilfe von NMA durch Zugabe L-Arginin wieder aufgehoben werden konnte. Die Zugabe des Substrates L-Arginin führte zu einer Steigerung der NO-Synthese und damit zu einer Abnahme der Proliferationsrate. Knochenmarkszellen von Mäusen die mit *Trypanosoma brucei* und Milzzellen die mit *Trypanosoma cruzi* infiziert wurden zeigten eine verstärkte NO-Synthese. In beiden Studien wurde dadurch die T-Lymphozyten-Proliferationsrate gesenkt. Durch NO-Inhibitoren wie N^G -methyl-l-arginine (NMA) oder N^G -nitro-l-

arginine methylester (L-NAME) konnte die Suppression der Proliferationsrate antagonisiert werden. Der Schweregrad der Anämie bei den mit *Trypanosoma brucei* infizierten Mäusen stand im direkten Zusammenhang mit der NO- Synthese und konnte durch L-NAME inhibiert werden.

Um diese entscheidende Funktion des Stickoxids zu beweisen und etwaige unspezifische Effekte der LPS / Zytokin- Kombination auszuschließen, setzten wir die Knochenmarkszellen einer exogenen NO- Quelle aus. Nach 24 h Inkubation hob die exogene NO- Exposition durch S-Nitro-Acetylpenicillamin (SNAP) die durch GM-CSF induzierte Proliferationssteigerung wieder auf. In Übereinstimmung mit diesen Daten zeigte Bidri et al. , daß aus dem Knochenmark von Mäusen gewonnene Mastzellen auf eine NO- Exposition innerhalb von Minuten mit einer Verminderung der intrazellulären cGMP- Konzentration reagierten. Dies führt zu einer dosisabhängigen Senkung des Wachstums.

Die NO-Synthese könnte also einem negativer Rückkopplungsmechanismus entsprechen durch den der Organismus den durch Sepsis induzierten, initialen Anstieg der Proliferation des Knochenmarks wieder begrenzt. Dafür spricht auch, daß nur die GM-CSF induzierte und nicht die basale Proliferation inhibiert wird und daß bei der NO-Exposition aus exogener Quelle die Suppression nicht schon nach 4 Stunden, sondern erst nach 24 Stunden beobachtet wird. Dabei würde es sich nicht um den einzigen negativen Rückkopplungsmechanismus von NO handeln. Bonham et al. zeigte einen negativen Rückkopplungsmechanismus bei Dendriten, die aus dem Knochenmark isoliert wurden. Die Stimulation der Dendriten durch LPS und $INF\gamma$ führte zur NO-Synthese. Die Erhöhung der NO-Konzentration führte zu einem Rückgang der Prolifationrate von T-Lymphzyten und einem Anstieg der Apoptoserate bei dendritischen Zellen. Beider Effekte ließen sich durch NMA antagonisieren.

Da die induzierbare NO-Synthetase durch Glucocorticoide und L-Arginin-Analoga hemmbar ist, die konstitutionelle NO-Synthetase jedoch nicht spricht dafür, daß die NO-Synthese bei Sepsis bevorzugt durch die iNOS katalysiert wird. Dafür gibt es in der Literatur diverse Anhalte, z.B. beschreibt Payen D et al. die Fähigkeit von $INF\alpha$ die iNOS RNS zu stabilisieren.

Die Zellverstärkung (cell recruitment) und der erhöhte Zellumsatz des Knochenmarks ist im Verlauf einer Sepsis von entscheidender Bedeutung. Stickoxid wird während eines septischen Geschehens in großen Mengen synthetisiert. Wie Angulo et al. und

Maciejewski et al. zeigen konnten handelt es sich bei Stickoxid um einen Suppressor der Knochenmarksproliferation bei Sepsis.

Wir konnten diese Aussagen mit unseren Experimenten bestätigen, NO besitzt eine starke inhibitorische Wirkung auf die Hämatopoese, vor allem auf das Monozyten-Macrophagensystems.

Für die Zukunft wäre es wünschenswert, wenn die NO-Produktion durch eine therapeutische Inhibition der iNOS möglich wäre. Einige Areitsgruppen haben schon erste Forschungen in dieser Richtung betrieben. So konnte Stosic-Grujicic et al. mit Substanzen wie Leflunomid oder Pentoxifyllin und Alrawi et al. mit IL-10 eine deutliche Hemmung der iNOS herbeiführen und damit der NO-Synthese vermindern. Leflunomide ist eine immunmodulatorische Substanz mit einer sehr guten Wirksamkeit im Bereich der Autoimmunerkrankungen. Es hemmt dosisabhängig die durch LPS und IFN- γ induzierte Aktivierung der iNOS in der Pathogenesis der Sepsis. Pentoxifyllin, eine ebenfalls bei durch T-Zelldysfunktion verursachten Autoimmunerkrankungen eingesetzte Substanz, hemmt dagegen das TNF- α und damit auch die Aktivierung der iNOS. Interleukin 10 (IL-10), bekannt für seine hemmende Wirkung vor allem der Synthese von IL-2, IFN- γ und der Antigenpräsentation durch Makrophagen, zeigte einen direkten hemmenden Effekt auf aktivierte Makrophagen und Monozyten. Das führte zur deutlichen Synthesehemmung der Zytokine TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 und den Wachstumsfaktoren GM-CSF und G-CSF. Die Synthesehemmung dieser Zytokine hat eine deutliche Abnahme der NO-Synthese zur folge.

Weiter konnten wir mit unseren erzielten Ergebnissen der experimentellen Peritonitis aufzeigen, daß die dadurch induzierte Sepsis unterschiedliche Auswirkungen auf die verschiedenen hämatopoetischen Zelllinien hat. Dabei kommt möglicherweise die dysregulatorische Wirkung der spezifischen Sepsismediatoren TNF α , INF- γ , IL-1 β und des LPS, als potentes Endotoxin, auf die Funktion des Knochenmarks zur Wirkung.

6 Zusammenfassung

Die Regulation der Hämatopoese unterliegt dem Zusammenspiel von komplexen, synergistisch und antagonistisch wirkenden Mechanismen. Eine wichtige Rolle spielen hierbei Interleukine, Wachstumsfaktoren, spezifische Proteine und das lokale Mikromilieu. Besonders in der kritischen Initialphase der Sepsis und im zeitlichen Verlauf dieses Krankheitsbildes kommt vor allem den Zytokinen $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und $\text{IFN}\gamma$ eine bedeutende Rolle zu. Diese Zytokine vermögen das induzierbare Enzym NOS (iNOS) zu aktivieren. Es entsteht das sehr kurzlebige, aber hochaktive NO, das im gesamten Organismus eine breitgefächerte, systemische Wirkung aufweist. Das in dieser Arbeit zur Sepsisimitation verwendete in-vivo Modell der CASP-Peritonitis bewirkt deutliche Veränderungen in der Knochenmarksfunktion. Es kommt zu Regulationsstörungen die die Proliferation, Differenzierung und Apoptose der einzelnen, von der Stammzelle ausgehenden Zellreihen betreffen. Die Dynamik der Hämatopoese ist während des septischen Geschehens v.a. durch die Zytokine $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{IL-1}\beta$, dem bakteriellen Entotoxin LPS und das vermehrt synthetisierte NO empfindlich gestört. Es kommt zu einer durch Wachstumsfaktoren, hier vor allem durch das GM-CSF gesteigerten Proliferation des Monozyten-Makrophagensystems. Die Erythropoese und die Differenzierung des megakaryotären Systems bleiben zum größten Teil unbeeinflusst. Das von LPS induzierte entzündliche Mediatorensystem führt zu einer Modulation der Oberflächenrezeptoren vor allem für das Wachstumsprotein GM-CSF. Im Knochenmark bewirkt dies eine Proliferationssteigerung der weißen Zellreihe, v.a. der neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten. Dieser Triggermechanismus wird bereits in der frühen Phase der Sepsis aktiviert und wird nicht mehr deutlich über die Gesamtdauer der Krankheit beeinflusst.

Das niedermolekulare NO bewirkt eine Suppression, der durch GM-CSF stimulierten Proliferation im Knochenmark. Die basale Proliferationsrate wird aber dabei nicht verändert. Die Knochenmarkssuppression entsteht einerseits durch die direkte schädigende NO-Wirkung und der indirekt- supprimierend und teilweise destruierende Wirkung der hochaktiven NO- Verbindungen und Produkte. Die endogene, induzierbare Synthese von NO kann durch spezielle NO- Synthase-Inhibitoren zum größten Teil rückgängig gemacht werden.

Die NO-Synthese konnte während der hochakuten initialen Phase der Sepsis als negativer feed-back-Mechanismus gewertet werden um die unkontrollierte Proliferationssteigerung und inadäquate Differenzierung v.a. der weißen Blutzellen zu begrenzen. Die Therapie mit NO-Synthese-Inhibitoren wird aufgrund dieser erbrachten Ergebnisse zusätzlich zur systemisch-spezifischen Antibiose, eine zukunftsweisende Rolle einnehmen. Diese beruht auf der drastischen Verbesserung und Stabilisierung der Hämodynamik und Verhinderung der unterschiedlich schädigenden Wirkungen durch NO.

7 Literaturverzeichnis

A. Vanderplasschen, E. Hanon, and P.- P. Pastoret „Flow Cytometric Measurement of Total DANN and Incorporated 5- Bromo- 2` - desoxy- uridine Using an Enzymatic DANN Denaturation Procedure

Abrahamsohn IA, Coffman RL (1995) Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in trypanosoma cruzi infection. J Immunol 155:3955-3963

Allen PD, Bustin SA, Macey MG, Johnston DH, Williams NS, Newland AC (1993) Programmed cell death (apoptosis) in immunity and haematological neoplasia. BJ Biomed Sci 50:135-149

Angulo I, Rogriguez R, Garcia B, Medina M, Navarro J, Subiza I (1995) Involvement of nitric oxide in bone marrow-derived suppressor activity. J Immunol 155:15-26

Barreiros AP, Schirmacher P, Laufenberg-Feldmann R, Meyer Zum Buschenfelde KH, Schlaak JF (2000) The early immune response in the liver of BALB/c mice infected with S. typhimurium. Scand J Immunol 51(5):472-478

Barthlen W, Stadler J, Lehn N, Miethke T, Bartels H, Siewert JR (1994) Serum levels of end products of nitric oxide synthesis correlates positively with tumor necrosis factor α and negatively with body temperature in patients with postoperative abdominal sepsis. Shock 2:398-401

Bevilacqua MP, Poder JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MA (1985) Interleukin 1 activation of vascular endothelium: Effects of procoagulant activity and leukocyte adhesion. Am J Pathol 121: 294-403

Bidri M, Becherel PA, Le-Goff L, Pieronie L, Guillosson JJ, Debre P, Arock M (1995) Involvement of cyclic nucleotides in the immunomodulatory effects of nitric oxide on murine mast cells. Biochem Biophys Res Commun 210:507-517

Bodey GP (1985) Overview of the problem of infections in the immunocompromised host. *Am J Med.* 29; 79(5B):56-61. Review.

Bohmann CA, Lu L, Li Y, Hoffman RA, Simmons RL, Thomson AW (1996) Nitric oxide production by mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Transplantation* 62:1871-1877

Bone RC (1991) The pathogenesis of sepsis. *Ann Int Med* 115:457-469

Bone RC (1996) Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med.* 24(7):1125-8.

Bonham CA, Lu L, Li Y, Hoffman RA, Simmons RL, Thomson AW (1996) Nitric oxide production by mouse bone marrow-derived dendritic cells. *Transplantation* 62:1871-1877

Callera F, Falcao RP (1997) Increased apoptotic cells in bone marrow biopsies from patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 98:18-20

Corran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Ochoa JB, Hebrbrecht BG, Flint SG, Simmons RL (1990) Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg* 212:462-471

Dofferhoff AS, de Jong HJ, Born VJ et al (1992) Complement activation and the production of inflammatory mediators during the treatment of severe sepsis in humans. *Scand J Infect Dis* 24:197-204

Dower SK, Urdal DL (1987) Interleukin 1 receptor. *Immunol Today* 8: 46-51

Ekert PG, Vaux DL (1997) Apoptosis, haemopoiesis and leukaemogenesis. *Baillieres Clin Haematol* 10:561-576

Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376

Gary I., Gershon RK, Waksman BH (1972) Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. I. The responding cell. *J Exp Med.* 1:136(1):128-42.

Gatell JM, Marrades R, el-Ebiary M, Torres A (1996) Severe pulmonary infections in AIDS patients. *Semin Respir Infect.* 11(2):119-28. Review.

Glauser MP, Heumann WD, Baumgartner JD, Cohen J (1994) Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock: an update. *Clin Infect Dis.* 18 Suppl 2:S205-16. Review.

Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M., Wood, K.S. (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.* 61: 866-879

IM Roitt (1993) Leitfaden der Immunologie, Blackwell Wissenschafts Verlag Berlin
Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia--United States, 1979-1987. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 1990 Jan 19;39(2):31-4.

Keller R (1987) Immunologie und Immunpathologie, Thieme Verlag Stuttgart, New York

Khwaja A, Carver J, Jones HM, Paterson D, Linch DC (1993) Expression and dynamic modulation of the human granulocyte colony-stimulating factor receptor in immature and differentiated myeloid cells. *Br J Haematol* 85:254-259

Koshland, D.E. Jr. (1992) The molecules of the year, *Science* 258: 1861

Koury MJ (1992) Programmed cell death (apoptosis) in hematopoiesis. *Exp Hematol* 20:391-394

Lardon F, Brockstaele DR, Snoeck HW, Peetermans ME (1993) Quantitative cell-cycle progression analysis of the first three successive cell cycles of granulocyte colony-stimulation factor and/or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-stimulated human CD34+ bone marrow cells in relation to their colony formation. *Blood* 81:3211-3216

Leder LS, Laskin DL (1994) Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric oxide production by GM-CSF, M-CSF and IL-1 β following acute endotoxemia. *J Leuko Biol* 55:507-513

Lotem J, Sachs L. (1994) Control of sensitivity to induction of apoptosis in myeloid leukemic cells by differentiation and bcl-2 dependent and independent pathways. *Cell Growth Differ.* 5(3):321-7.

Mabbott N, Sternberg J (1995) Bone marrow nitric oxide production and development of anemia in trypanosoma brucei-infected mice. *Infect immun* 63:1563-1566

Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, Cho HJ, Keefer LK, Nathan CF, Young NS (1995) Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. Contribution to inhibitory action of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Clin Invest* 1995 Aug;96(2):1085-92

Mammen EF (1998) The haematological manifestation of sepsis. *J Antimicrob Chemother* 41:17-24

Marks JD, Marks CB, Luce JM, Montgomery AB, Turner J, Murray JF (1990) Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. *Am Rev Respir Dis* 141: 94-97

Mentz F, Ouaz F, Michel A, Blanc C, Herve P, Bismuth G, Debre P, Merle-Beral H, Mossalayi MD (1994) Maturation of acute T-lymphoblastic leukemia cells after CD2 ligation and subsequent treatment with interleukin-2. *Blood.* 15;84(4):1182-92.

Mermel LA, Maki DG (1990) Bacterial pneumonia in solid organ transplantation. *Semin Respir Infect.* 5(1):10-29. Review.

Moncada S. (2000) Nitric oxide and cell respiration: physiology and pathology. *Verh K Acad Geneeskdg Belg.* 2000;62(3):171-9; discussion 179-81. Review.

Morrison DC, Silverstein R, Parmely MJ (1992) Novel approaches to the treatment of septic shock. In: Vincent JL (ed.): *Yearbook of intensive care and emergency medicine.* Springer- Verlag Berlin, Heidelberg, New- York 99-103

Nathan C.F., Hibbs J.B.Jr. (1991) Role of nitric-oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity; *Curr. Opin. Immunol.* 3; 65.

Oppenheim JJ, Gery I (1993) From lymphokine to interleukin 1. *Immunol Today* 14: 232-234

Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526

Parrillo JE (1993) Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med.* 20;328(20):1471-7. Review.

Payen D, Bernard C, Beloucif S (1996) Nitric oxide in sepsis. *Clin Chest Med* 17:333-350

Punjabi CJ, Laskin D, Heck DE, Laskin JD (1992) Production of nitric oxide by murine bone marrow cells - inverse correlation with cellular proliferation. *J Immunol* 149: 2179-2184

Punjabi CJ, Laskin JD, Hwang SM, MacEachern L, Laskin DL (1994) Enhanced production of nitric oxide by bone marrow cells and increased sensitivity to macrophage colony-stimulating factor (CSF) and granulocyte-macrophage CSF after benzene treatment of mice. *Blood* 83:3255-3263

Pusztai L, Lewis CE, Lorenzen J, McGee JO'D (1993) Growth factors: regulation of normal and neoplastic growth. *J Pathol.* 169(2):191-201. Review.

Rapport AP, Abbound CN, DiPersio JF (1992) GM-CSF and G-CSF: receptor biology, signal transduction and neutrophil activation. *Blood* 6: 43-57. Review.

Schmid HW, Walter U (1994) NO at work. *Cell* 78:919-925

Shaimi PJ, Weinberg JB (1996) Differential effects of nitric oxid on erythroid and myeloid colony growth from CD34⁺ human bone marrow cells. *Blood* 87:977-982

Sheih J-H, Gordon M, Jakubowski A, Peterson RHF, Gabrilove JL, Moor MAS (1993) Interleukin 1 modulation of cytokine receptors on human neutrophils: in vitro and in vivo studies. *Blood* 81:1745-1754

Stefani MM, Muller I, Louis JA (1994) Leishmania major-specific CD 8+ T cells are inducers and targets of nitric oxide produced by parasitized macrophages. *Eur J Immunol* 24:746-752

Stuehr, G.J., Marletta, M.A. (1985) Mammalian nitrate biosynthesis: Mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7738-7742

Urdal DL, Coll SM, Jackson JL, Dower SK (1988) Affinity purification and chemical analysis of the interleukin-1 receptor. *J Biol Chem.* 25: 263(6):2870-7.

Warner SJC, Auger KR, Libby P (1987) Interleukin 1 induces interleukin 1. Recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by adult cascular endothelial cells. *J Immunol* 139:1911-1917

Witt DR, Hoyme HE, Zonana J, Manchester DK, Fryns JP, Stevenson JG, Curry CJ, Hall JG (1987) Lymphedema in Noonan syndrome: clues to pathogenesis and prenatal diagnosis and review of the literature. *Am J Med Genet.* 27(4):841-56. Review.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Sebastian Rogenhofer
Wohnort	Platz der Einheit 2 93047 Regensburg
Geburtstag und -ort	12.05.1974 in München
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch
Eltern	Ildiko Rogenhofer (Apothekerin) Dr. med. Gert Rogenhofer (Arzt für Allgemeinmedizin und Psychotherapie)
Geschwister	Nina Rogenhofer (Studentin der Medizin)

Schulbildung

Sept. `80 bis Juli `84	Grundschule Lappersdorf - Kareth
Sept. `84 bis Juli `93	Privat - Gymnasium Pindl, Regensburg
	Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium

Nov. `93 bis Sept. `95	Vorklinik, Universität Regensburg
August `95	Physikum
Okt. `95 bis Sept. `99	Klinischer Abschnitt, Technische Universität München
März `97	1. Staatsexamen
August `98	2. Staatsexamen
Okt `98 bis Okt `99	Praktisches Jahr I: Orthopädie University of Toronto, Canada Klinikum Großhadern, München
	II: Innere Medizin (Hämatologie u. Onkologie) Städt. Krankenhaus München-Neuperlach
	III: Chirurgie Chirurgische Klinik u. Poliklinik; Klinikum Innenstadt, München
Nov `99	3. Staatsexamen

Famulaturen

Okt. '96	Chirurgie, Caritas Krankenhaus St. Josef, Regensburg
April '97	Allgemeinmedizin, Praxis Dr. Rogenhofer, Regensburg
Aug. '97 bis Sept. '97	Chirurgie, New York Downtown Hospital, New York, USA

Ärztliche Tätigkeit

Dez. '99-Nov '00	Abdominal- und Unfall-Chirurgie, Prof. Dr. med. R.P. Wirsching, Caritas Krankenhaus St. Josef, Regensburg
Dez. '00- Jetzt	Poliklinik und Klinik für Urologie der Universität Regensburg, Prof. Dr. W. Wieland, Caritas Krankenhaus St. Josef, Regensburg

Danksagung

Ohne der unermüdlichen Hilfe mehrerer Personen, die bei der Entstehung dieser Dissertationsarbeit beteiligt waren, würde diese sicher nicht in dieser Form vorliegen. Daher gilt mein besonderer Dank den Personen die mir in dieser Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen:

Herrn Prof. Dr. med. B. Holzmann, der mir als Doktorvater mit positiver und freundlicher Unterstützung beiseite stand und der Arbeit mit seiner Durchsicht den letzten Schliff verpasste. Ohne seiner interessanten Themenstellung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Herrn Dr. med. W. Barthlen ohne seine Hilfe und Unterstützung hätte ich diese Arbeit nie beginnen können. Er widmete sich auch neben seiner Tätigkeit in der Chirurgie meinen Fragen und stand mir mit Rat und Tat zur Seite.

Meiner Mitstreiterin und Freundin Carina Klemens, ohne deren Arrangement und tatkräftige Mithilfe diese Arbeit nicht mit so viel Spaß zu Stande gekommen wäre. Als hervorragend zusammenpassendes Team haben wir im Leben noch mehr als diese Arbeit gemeistert.

Frau Felicitas Altmeier, Heidi Beil-Möller und dem Team der Chirurgischen Forschergruppe „Sepsis“ der Technischen Universität München die mich freundlich in ihr Team aufnahmen und mit ständiger Hilfsbereitschaft mir bei allen labortechnischen Fragen zur Seite standen.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir dieses Studium und diese Dissertationsarbeit ermöglichten. Sie und meine Schwester standen und stehen mir immer mit viel Geduld und Interesse zur Seite und gaben mir immer guten Rat.