

Aus der Chirurgischen Forschung der  
Chirurgischen Universitätsklinik der Albert Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

Eingereicht über die Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere des Fachbereiches Veterinärmedizin der Freien Universität  
Berlin

**Therapie der *Pseudomonas aeruginosa*-Sepsis mit rhG-CSF (Filgrastim) unter besonderer Berücksichtigung der  
hämodynamischen Veränderungen und des klinischen Verlaufes.**

**- Eine experimentelle Studie am nicht anästhesierten,  
invasiv instrumentierten Schwein -**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Kai Boris Wiese  
Tierarzt  
Heidenheim

Berlin 1998  
Journal-Nr. 2137

**gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin der  
Freien Universität Berlin**

**Dekan: Univ.-Professor Dr. K. Hartung  
1. Gutachter: Univ.-Professor Dr. L. Brunnberg  
2. Gutachter: PD Dr. J. Haberstroh**

**Tag der Promotion: 2. Februar 1998**

**In Dankbarkeit gewidmet  
meiner Mutter und meinem Vater,  
sowie meinen Brüdern**

1	Einleitung.....	1
2	Schrifttum.....	2
2.1	Sepsis: Der epidemiologische Hintergrund.....	2
2.1.1	Prävalenz.....	2
2.1.2	Resistenzen.....	3
2.1.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	5
2.2	Definitionen.....	7

2.3 Pathophysiologie der Sepsis.....	10
2.4 Klinik der Sepsis.....	26
2.5 Therapie der Sepsis.....	27
2.6 Hämatopoetische Wachstumsfaktoren.....	30
3 Eigene Untersuchungen.....	36
3.1 Zielsetzung.....	36
3.2 Methode.....	36
3.2.1 Versuchstiere.....	36
3.2.2 Versuchsumgebung.....	37
3.2.3 Versuchsprotokoll.....	37
3.2.4 Vorbereitungsphase.....	40
3.2.5 Versuchsvorbereitung: Operative Instrumentierung.....	40
3.2.5.1 Anästhesie.....	40
3.2.5.2 Katheterimplantation.....	42
3.2.5.3 Postoperative Versorgung.....	45
3.2.6 Ernährung.....	46
3.2.7 Versuchsphase.....	47
3.2.7.1 Aufbereitung des <i>Pseudomonas aeruginosa</i> -Stammes.....	47
3.2.7.2 Sepsisinduktion.....	48
3.2.7.3 Therapie mit rhG-CSF.....	49
3.2.7.4 Untersuchung und Probengewinnung.....	49
3.2.7.5 Kalkulierte hämodynamische Parameter.....	52
3.2.7.6 Modifizierung des APACHE II Klassifizierungssystems.....	54
3.2.7.6.1 Anpassung der physiologischen Parameter.....	54
3.2.7.6.2 Altersverteilung.....	55
3.2.7.6.3 Chronische Vorerkrankungen.....	55
3.2.7.7 Labormethoden.....	56
3.2.7.7.1 Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra).....	56
3.2.7.7.2 Leukocyte Neutral Proteinase Inhibitor (LNPI) .....	56
3.2.7.7.3 Prokollagen-III-Peptid.....	56
3.2.7.7.4 Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....	56
3.2.7.7.5 Endotoxin.....	57
3.2.7.7.6 Kleines Blutbild.....	57
3.2.7.7.7 Klinische Chemie.....	57
3.2.8 Auswertung der Meßergebnisse.....	58
4 Ergebnisse.....	60

4.1 Ergebnisse der klinischen Untersuchungen.....	60
4.1.1 Körpertemperatur.....	63
4.1.2 Herzfrequenz.....	64
4.1.3 Atemfrequenz.....	65
4.2 Ergebnisse der Druckmessungen.....	66
4.2.1 Arterieller Druck.....	67
4.2.2 Pulmonalarterieller Druck.....	67
4.2.3 Pulmonalkapillärer Verschlussdruck.....	69
4.3 Ergebnisse der hämodynamischen Kalkulationen.....	70
4.3.1 Herzindex.....	70
4.3.2 Schlagvolumenindex.....	71
4.3.3 Peripherer Gefäßwiderstandsindex.....	72
4.3.4 Pulmonalvaskulärer Widerstandsindex.....	73
4.4 Ergebnisse der Blutbildbestimmungen.....	75
4.4.1 Leukozyten.....	75
4.4.2 Thrombozyten.....	77
4.4.3 Erythrozyten.....	78
4.4.4 Hämatokrit.....	79
4.4.5 Hämoglobingehalt.....	79
4.5 Ausgewählte Ergebnisse der arteriellen Blutgasbestimmungen.....	80
4.5.1 Kohlendioxid-Partialdruck.....	80
4.5.2 Sauerstoff-Partialdruck.....	81
4.6 Ermittelte modifizierter APACHE II Score.....	82
4.7 Laborbestimmungen.....	83
4.7.1 Endotoxin.....	83
4.7.2 Ergebnisse der Mediatorenbestimmungen.....	85
4.7.2.1 Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ .....	85
4.7.2.2 Interleukin-1 Rezeptorantagonist.....	88
4.7.2.3 Leukocyte Neutral Proteinase Inhibitor.....	91
4.7.3 Organmanifestationen.....	92
4.7.3.1 Prokollagen-III-Peptid.....	92
4.7.3.2 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase.....	93
4.7.3.3 Gesamtbilirubin.....	93
4.7.3.4 Kreatinin.....	94
4.7.3.5 Harnstoff.....	94
5 Diskussion.....	95

5.1 Tiermodell.....	95
5.2 Pathologischen Veränderungen.....	96
5.3 Diskussion der Applikation von G-CSF in der Sepsis.....	109
5.4 Diskussion des Applikationszeitpunktes von G-CSF.....	116
5.5 Wirkung von G-CSF auf die neutrophilen Granulozyten.....	119
5.6 Immunsuppression in der Sepsis.....	123
5.7 Konsequenzen aus unseren Ergebnissen.....	127
5.8 Änderungsvorschläge für zukünftige Sepsis-Studien unter Verwendung von rhG-CSF.....	127
6 Zusammenfassung.....	130
7 Summary.....	132
8 Anhang.....	134
8.1 Literaturverzeichnis.....	134
8.2 Ergebnistabellen.....	152
8.3 Verwendete Einheiten und Abkürzungen.....	165
8.3.1 physikalische und biochemische Einheiten.....	165
8.3.2 Verwendete Abkürzungen.....	167
9 Danksagung.....	169
10 Lebenslauf.....	171

## **1 Einleitung**

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 extreme entzündliche Reaktion in Gang setzen und so eine erhebliche Morbidität und Mortalität verursachen. 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 mit letalem Ausgang. Sepsis, vor allem mit der Entwicklung eines septischen Schocks führt schnell und oft dramatisch zum Tode. Eine zivilisierte Gesellschaft darf so etwas nicht zulassen.

Mit der Intention, in dieses dramatische Geschehen mit neuen Begleitmaßnahmen der Kausaltherapie eingreifen zu können, führten wir die hier beschriebene Studie durch.

## **2 Schrifttum**

### **2.1 Sepsis: Der epidemiologische Hintergrund**

#### **2.1.1 Prävalenz**

In einer Zeit, in welcher die Medizin große Fortschritte in Diagnostik und Therapie macht und so Heilung von Krankheitskomplexen ermöglicht, bei welchen noch vor Jahren eine nahezu infauste Prognose gestellt werden mußte, erlangen nosokomiale Infektionen und Sepsiserkrankungen eine zunehmende Bedeutung. In den USA liegt die Inzidenz der Sepsis bei 400 000 bis 500 000 Erkrankungen. Etwa die Hälfte dieser 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, welche zum Ergebnis hatte, daß bei einer Prävalenz von 3,5 % nosokomialer Infektionen die Sepsis einen Anteil von 8,3 % hatte (entspricht einem Anteil von 5 Sepsisfällen auf 1000 Patienten des gesamten Patientengutes [Rüden 1995]).

Allgemeiner Auffassungen nach ist die Zunahme an diesen schweren Krankheitskomplikationen auf die Fortschritte in 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, immuninkompetente Frühgeborene, schwereren Grunderkrankungen (Blutzelltumoren, solide Tumoren, HIV-Infektionen [Witt 1987, Gatell 1996]) und artifiziiellen 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. Die Überschneidungen ergeben sich aus polymikrobiellen Infektionen in durchschnittlich 30 % der Patienten.

### 2.1.2 Resistenzen

Ein weiterer Faktor in der Zunahme und Problematik nosokomialer Infektionen ist auch der während langer Zeit unkritische und ungezielte Einsatz von Antibiotika [Maki 1989]. Dadurch wird einerseits die natürliche Mikroflora der Patienten gestört mit Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Flora zugunsten resistenter, meist pathogener Keime, andererseits werden die Resistenzen der Bakterien am Patienten und von diesem ausgehend im gesamten Umfeld (hier Krankenhaus) gefördert. Infektionen der Intensivpatienten werden heute vorwiegend durch resistente 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 vererbaren. Die natürliche Resistenz ist die stets vorhandene Unempfindlichkeit einer Erregerart für 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.

Die Resistenzübertragung kann auf folgende Weisen erfolgen:

Transformation (Aufnahme isolierter DNA und Rekombination in zelleigenes Erbgut, dies spielt im natürlichen Milieu kaum eine Rolle),

Transduktion (Übertragung von genetischer Information von einer Bakterie auf eine andere mittels Phagen, aufgrund deren ein speziesspezifischer Mechanismus),

Konjugation (Übertragung von Erbinformation über eine Plasmabrücke, das übertragene Segment kann dabei relativ groß sein, z. B. ein komplettes Plasmid. Dieser Transfer wird vor allem bei gramnegativen Keimen beobachtet und ist nicht speziesspezifisch).

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.

### 2.1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa*, 1882 als pathogener Keim entdeckt, wurde zunächst nur in Verbindung mit dem von ihm verursachten blau-grünen Eiter gesehen. Seit den 60er Jahren tritt der gramnegative Erreger vermehrt im Zusammenhang mit systemischen Infektionen auf. Seit den 90er Jahren wird *P. aeruginosa* auch zunehmend bei immungeschwächten Patienten als Krankheitserreger diagnostiziert.

*P. aeruginosa* ist als Pathogen von zentraler Bedeutung bei einer Vielzahl von nosokomialen und allgemein erworbenen Infektionen, insbesondere bei Endokarditis, Knochen- und Gelenkentzündungen, Augenerkrankungen, Haut- und Bindegewebserkrankungen und vor allem bei Infektionen des unteren und oberen Respirationstraktes. *Pseudomonas* verursacht mannigfaltige, häufig fatale Erkrankungen im geschwächten Organismus und hat die höchste Mortalität aller durch gramnegative Keime verursachten Bakteriämien [Young 1990]. Im immunkompetenten Organismus hat dabei *P. aeruginosa* in der Regel keine Chance, eine Infektion zu setzen. Gefährdet sind Patienten mit Abwehrschwächen wie iatrogene Immununterdrückung, angeborene und erworbene Immundefizienzen (u. a. HIV-Infektion, Diabetes mellitus), großflächigen Verbrennungen, chronische Lungenerkrankungen (z. B. zystische Fibrose, chronisch obstruktive Lungenerkrankungen) und bei Beeinträchtigung der natürlichen Barrieren infolge einer Intubation über längere Zeit (Intensivpatient).

Heute spielt *P. aeruginosa* in 10 bis 28 % der nosokomialen Infektionen eine Rolle [Pories 1991, Smith 1991, Jarvis 1992, Verbist 1993, Pilz 1994, Vincent 1995].

*P. aeruginosa* ist zwar nicht der Keim mit der höchsten Inzidenz bei nosokomialen Infektionen, er zeigt dabei aber ein aggressiveres Verhalten als andere Krankheitserreger. Die Mortalitätsrate bei *Pseudomonas*-Infektionen liegt deutlich höher als bei Infektionen durch andere Mikroorganismen (45 zu 14 %) [Bodey 1985, Bispe 1988, Mallolas 1991, Taylor 1995].

Im folgenden sind kurz die Virulenzfaktoren von *P. aeruginosa* aufgeführt und deren Rolle im Infektionsgeschehen aufgeführt:

Adhäsine	initiale Kolonisierung der Lunge oder von Wunden
Neuramidase	verstärkt die Pili-vermittelte Adhärenz
Exoenzym S	durch eine ADP-Ribosylierung wird insbesondere die Phagozytose beeinträchtigt
Exotoxin A	ähnlich dem Diphtheria-Toxin ein Proteinsynthetasehemmer
Elastaseaktivität	schädigt das Lungengewebe und ebenso Blutgefäße
weitere Proteasen	Lungen- und Gewebsschädigungen
Alginate-Synthese	Adhärenz, Phagozytoseabwehr
Lipopolysaccharid (LPS)	septischer Schock
Antibiotikaresistenz	Beeinflusst eine effektive Therapie

Auch bei *Pseudomonas* liegt den Pathogenesemechanismen in der Sepsis und im septischen Schock in allererster Reihe der Zellwandbestandteil Lipopolysaccharid zugrunde.

## 2.2 Definitionen

Schottmüller 1914:

"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. Die Kriterien, welche die Diagnose Sepsis begründen, sind heute weitgehend festgelegt. Außerdem wurde ein neues, international gebräuchliches Schlagwort geprägt: Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS).

SIRS und Sepsis werden nach den Kriterien einer 1991 abgehaltenen Konsensus-Konferenz aus Vertretern der American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine definiert und diagnostiziert [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 PaCO<sub>2</sub> < 32 mmHg
- Leukozytenzahl > 12 x 10<sup>9</sup>/l (oder < 4 x 10<sup>9</sup>/l oder > 10 % unreife neutrophile Granulozyten)

Die Sepsis entspricht diesem klinischen Bild einer Allgemeinenzündung mit einer bakteriellen Ursache.

Eine SIRS kann neben der infektiösen Ursache bei folgenden Erkrankungen auftreten: Pankreatitis, Ischämie, multiple Traumen und Gewebsverletzungen, hämorrhagischer Schock, immunbedingte Organschäden sowie nach exogener Zufuhr von potenten Entzündungsmediatoren.

Eine dritte Übereinkunft betrifft die Begriffe Infektion, Bakteriämie und Sepsis. Der Begriff Septikämie sollte gestrichen werden.

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 der 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.

infektiöse Ursache      nichtinfektiöse Erkrankung

↑ ↓

Mediatorenfreisetzung

⇄

	allgemeine Entzündungsreaktion	
septisches Geschehen		Nichtinfektiös
	Organversagen	

	Multiorganversagen	
	Schock	
	Systemic Inflammatory Response Syndrome	

## 2.3 Pathophysiologie der Sepsis

Prinzipiell gibt es kaum einen Unterschied zwischen der Pathophysiologie einer lokalen Entzündungsreaktion und einer Sepsis im Sinne einer systemischen Entzündung. Die inadäquate Reaktion des Körpers auf die Aktivierung der körpereigenen Abwehrsysteme durch eine Infektion ist für den Krankheitsverlauf einer Sepsis entscheidend.

Nahezu einheitlich und 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 und damit auch immer zu einer gewissen Absterberate infolge des natürlichen Turnover und der Abwehrmaßnahmen des Körpers. Durch den Einsatz von wirksamen bakteriziden Antibiotika geschieht dies massiv. 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, so bezeichnet, da sie von den Bakterien aktiv vor allem in der Wachstumsphase liberiert 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 in einem Schock und häufig im Tod enden kann [Tanaka 1995].

Beide Toxintypen setzen, einmal in die Blutbahn gelangt, körpereigene systemische Abwehrmechanismen in Gang, beginnend mit den zellulären Systemen (neutrophile Granulozyten, Monozyten / Makrophagen, Endothelzellen) und plasmatischen Systemen (Komplement-, Kallikrein-Kinin- und Gerinnungssystem).

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 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 Substrate, welche die Immunabwehr im Organismus stimulieren. Applikationen im Pikogrammbereich reichen aus, um Zellen des Immun-, Entzündungs- und Gefäßsystems zu stimulieren [Loppnow 1993].

Einige grundsätzliche Reaktionen, welche nach einer Injektion von Endotoxin oder nach der Zerstörung von Bakterien *in vivo* vonstatten gehen, sollen kurz erläutert werden (s. a. Abb. 1).

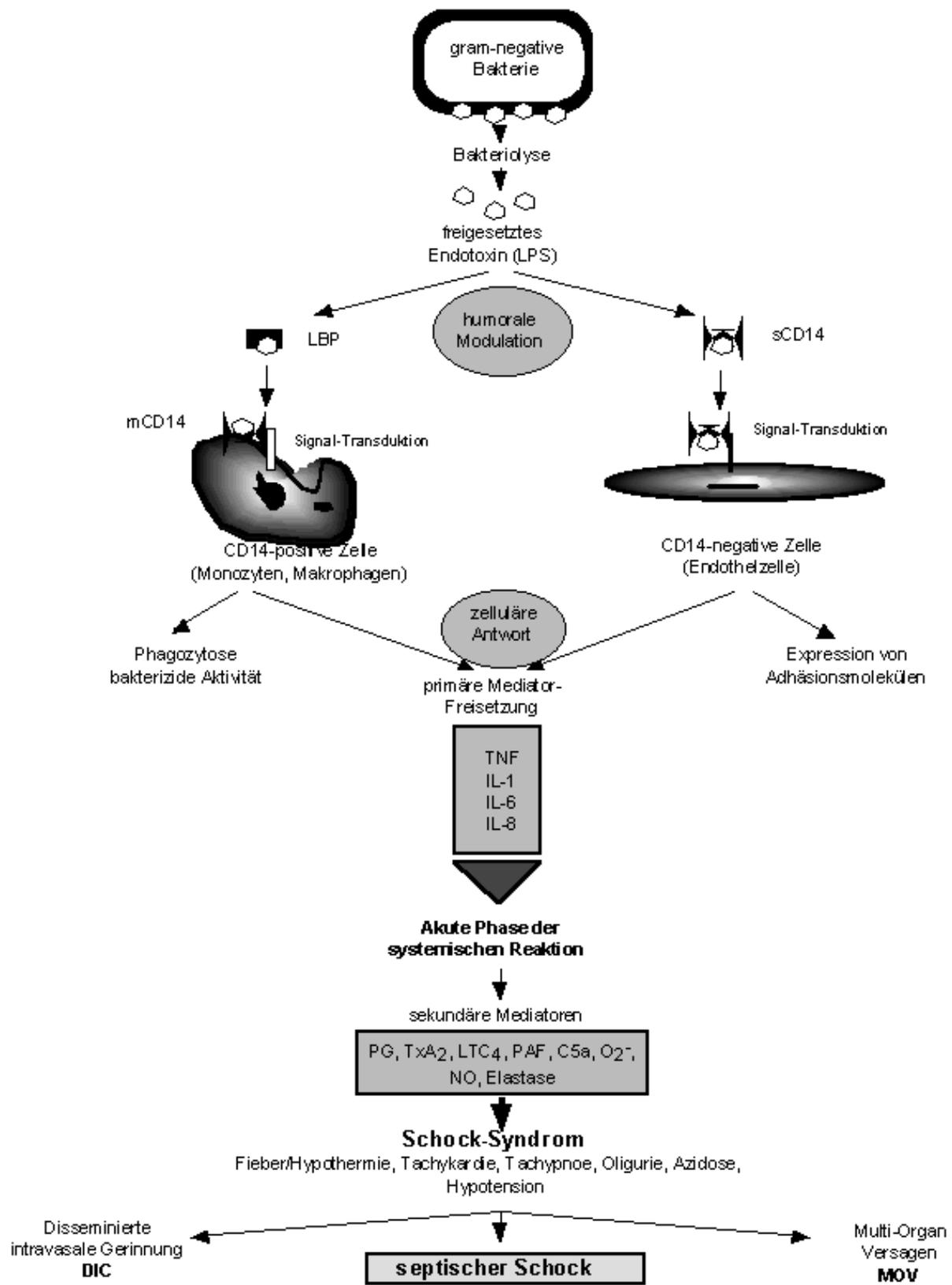


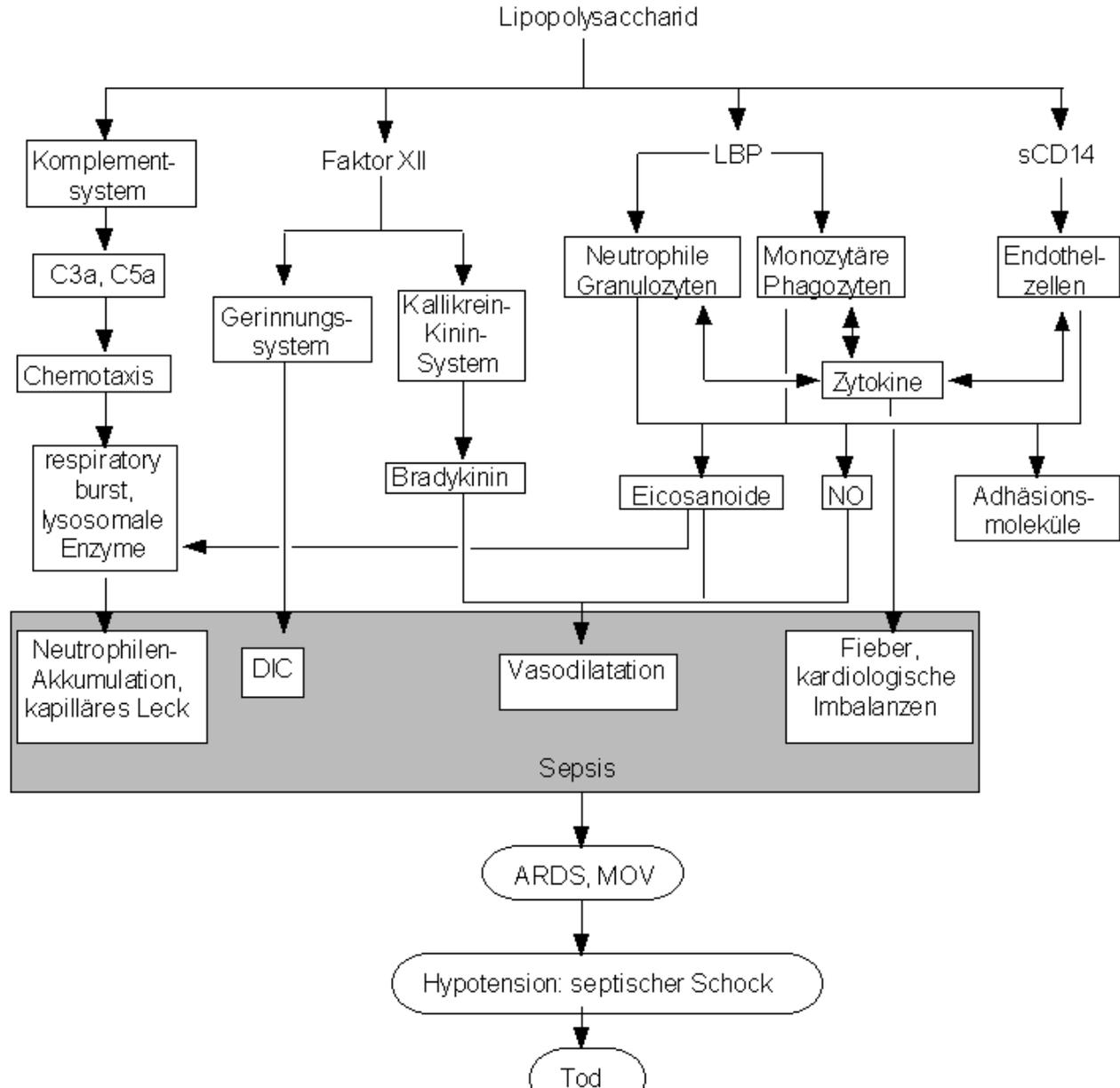
Abbildung 1, verändert nach *Rietschel et al. 1996*: vom LPS zum septischen Schock

Der Anteil an Endotoxin, welcher nicht durch humorale oder zelluläre Komponenten des Organismus detoxifiziert wird, reagiert mit LBP (Lipopolysaccharid-bindendes Protein) oder sCD14 und aktiviert über diesen Zwischenschritt Zielzellen, endogene Mediatoren oder Adhäsionsmoleküle zu produzieren und freizusetzen, beziehungsweise zu exprimieren [Ulevitch 1995]. Primäre Zielzellen sind Monozyten / Makrophagen, Endothelzellen, Granulozyten und Lymphozyten. Wichtige Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8 werden produziert, welche fähig sind, empfängliche

(Zytokinrezeptor-positive) Zellen zu aktivieren, Lipidmediatoren (Plättchen-aktivierender Faktor PAF, Leukotriene, Prostaglandine), Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid (NO) und Proteasen (Elastase, Kollagenase und andere, [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 sind außer der direkt bakteriziden und zytotoxischen Komponenten (Proteinasen, freie Radikale, Stickstoffmonoxid NO) auch wichtige Quelle einiger Zytokine (IL-1 und IL-1ra, IL-6, TNF- $\alpha$ , Interferone, Wachstumsfaktoren) und modulieren so die lokale Entzündungsreaktion durch die Aktivierung weiterer Abwehrzellen: Makrophagen (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , GM-CSF), T Lymphozyten (IL-1, IL-6), neutrophile Granulozyten (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , G- und GM-CSF). Der freigesetzte Lipidmediator Leukotrien B<sub>4</sub> wirkt als starker chemotaktischer Faktor auf Leukozyten und induziert die Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen.





## Abbildung 2, nach *Neugebauer et al. 1995*: die Plasmaproteinsysteme

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 B<sub>4</sub>; Opsonine und Immunglobuline (Fc-Region); Kinine; Zytokine IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$  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- $\alpha$ ), Wachstumsfaktoren (G- und M-CSF) und anderer Mediatoren (Leukotrien B<sub>4</sub>).

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 Reizung (z. B. flotierendes Endotoxin), gewinnen die proinflammatorischen Zytokine die Überhand. Der klinische Schweregrad einer Sepsis korreliert dabei mit der Höhe der zirkulierenden Zytokinkonzentration [*Kragsbjerg 1996*].

Die in der Pathogenese der Sepsis beteiligten Zytokine sind im wesentlichen in den vorangehenden Abschnitten schon aufgeführt. Im folgenden sollen die wichtigsten Vertreter noch einmal kurz beschrieben werden.

IL-1 und TNF- $\alpha$  sind die bedeutendsten endogenen proinflammatorischen Zytokine. Sie sind im Bereich von picomolaren Konzentrationen biologisch wirksam. TNF- $\alpha$  wird vorwiegend von Zellen der Monozyten / Makrophagen-Zelllinie gebildet. Der Stimulus für die Biosynthese ist die Reaktion des Oberflächenmoleküls CD14 mit dem LPS-LBP-Komplex, auch TNF- $\alpha$  selbst, IL-1, IL-2, GM-CSF bewirken die DNA-Transkription. Nach einer LPS-Exposition steigt die TNF- $\alpha$ -Liberation innerhalb von 1,5 bis 2 Stunden auf ein Maximum, fällt danach ebenso rasch wieder ab und ist nach 4 Stunden fast nicht mehr nachzuweisen [*Hesse 1988, Michie 1988*]. Die biologische Halbwertszeit von TNF- $\alpha$  liegt bei etwa 15 Minuten. TNF- $\alpha$  Rezeptoren befinden sich auf nahezu allen Zellen außer den roten Blutkörperchen. Die Verbindung von extrazellulärem TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  vermitteln. Diese biologischen Effekte von TNF- $\alpha$  sind bei jeder Infektion klinisch zu beobachten und konnten durch die isolierte Applikation von TNF- $\alpha$  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- $\alpha$ . Neben den direkten Wirkungen von TNF- $\alpha$  über die second messenger wird eine Vielzahl der Effekte aber auch über sekundär freigesetzte Zytokine IL-1, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$ , GM-CSF vermittelt. 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 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 in Kofunktion 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 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 TNF- $\alpha$ , es gehört aber dennoch zu den proinflammatorischen Zytokinen, da es eine pyrogene Aktivität entfaltet, die Bildung von Akut-Phase-Protein induziert und zusammen mit IL-1 die spezifische Immunantwort (B- und T-Zellen) modifiziert. 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 Reizung des Systems beispielsweise durch Endotoxin eine Zytokinkaskade entwickelt. 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- $\alpha$ , welche auf eine übermäßige Stimulierung der Zielzellen abgestoßen 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- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 als endogene Pyrogene auf den Hypothalamus und induzieren Fieber über das Prostaglandin E<sub>2</sub>, die Hypophyse setzt ACTH frei (was wiederum zum Anstieg der Kortisolkonzentration führt) und die Hepatozyten produzieren und liberieren 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, 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 systemischen 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 systemische Kreislaufreaktionen (Bronchokonstriktion, Vasodilatation, Permeabilitätssteigerung).

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 (Katecholamine, 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 abwertender Faktor zu betrachten [Aasen 1983].

Die Aktivierung der membranständigen Phospholipase A<sub>2</sub> durch Mediatoren führt zum intrazellulären Angebot von Arachidonsäure. Über die plasmatischen Enzyme Cyclooxygenase und Lipoxygenase werden Prostaglandine, Thromboxan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) und Leukotriene (zusammengefaßt Eicosanoide) gebildet. Die in der Sepsis interessierenden Prostaglandine und das TxA<sub>2</sub> bewirken eine Vasokonstriktion und Thrombozytenaktivierung sowie eine Bronchokonstriktion. Dies führt zu verstärkter intravasaler Mikrothrombenbildung und zu Mikrozirkulationsstörungen. Leukotriene (vor allem LTB<sub>4</sub>) und Prostaglandin E gelten als hochpotente Chemotaxine und bewirken die lokale

Aktivierung der akkumulierten Leukozyten. PGF $2\alpha$  sowie LTB $4$  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].

## 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 Auswurfraction 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 Mediatorkaskade 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 Kapillarbett. 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, 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 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  $\beta$ -Adrenozeptoren an der Zelloberfläche sowie einer Zunahme der inhibitorischen Gi-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 Liberalisierung von Zytokinen vorwiegend aus Monozyten / Makrophagen. Die kardiodepressive Wirkung von TNF- $\alpha$  wurde im Tierexperiment nachgewiesen [Natanson 1989, Schirmer 1989]. Die Wirkung wird durch TNF- $\alpha$  direkt hervorgerufen [Reithmann 1994] und resultiert aus einer Abnahme der  $\beta$ -Adrenozeptoren, der Zunahme der Gi-Proteine aber auch in einer Zunahme der Adenylatcyclase-Aktivität. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sind mit einer früher als "myocardial depressant factor" bezeichneten Substanz identisch [Kumar 1996].

## 2.4 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 der 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 führt eine Hyperventilation, wie sie infolge einer septischen Lungenbeeinflussung zu beobachten ist, zu einer respiratorischen Alkalose.

## 2.5 Therapie der Sepsis

### Chirurgische Herdsanierung

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

### 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.

### 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.

### 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 verlassen.

### 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 zur Zeit das überwiegend  $\alpha$

-adrenerg wirkende Noradrenalin angesehen. Es kommt nach adäquater Volumensubstitution durch die Noradrenalin-induzierte Anhebung des Blutdrucks zu einer Verbesserung der Diurese.

### Adjuvante Therapiemaßnahmen

Die Applikation von humanen monoklonalen IgM-Antikörper gegen die Lipid A-Struktur von Endotoxin kann 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. Die 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- $\alpha$  als zentraler Mediator gilt. Die Neutralisierung von endogen freigesetztem TNF- $\alpha$  durch monoklonale Antikörper konnte im Tierexperiment die Letalität reduzieren [Hinshaw 1992, Sawyer 1993]. Nachfolgend durchgeführte Multizenterstudien verliefen jedoch enttäuschend, dies muß unter dem Aspekt gesehen werden, daß TNF- $\alpha$  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- $\alpha$  -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, auch klinische Einsätze 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.

## 2.6 Hämatopoetische Wachstumsfaktoren

Hämatopoetische Wachstumsfaktoren sind Glykoprotein-Hormone, welche die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen 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. Inzwischen haben die Wachstumsfaktoren den Weg von der Kulturplatte in die Klinik gefunden und versprechen vielseitige Einsatzmöglichkeiten bei einer Vielzahl an hämatologischen Dysfunktionen.

Es konnten verschiedene Wachstumsfaktoren isoliert, geklont und in größerem Umfang mittels rekombinanter DNA-Technik hergestellt werden: Erythropoetin, Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF), Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) und Interleukin-3 (IL-3).

Daneben konnte noch die Hämatopoese-stimulierende Potenz einiger Zytokine nachgewiesen werden.

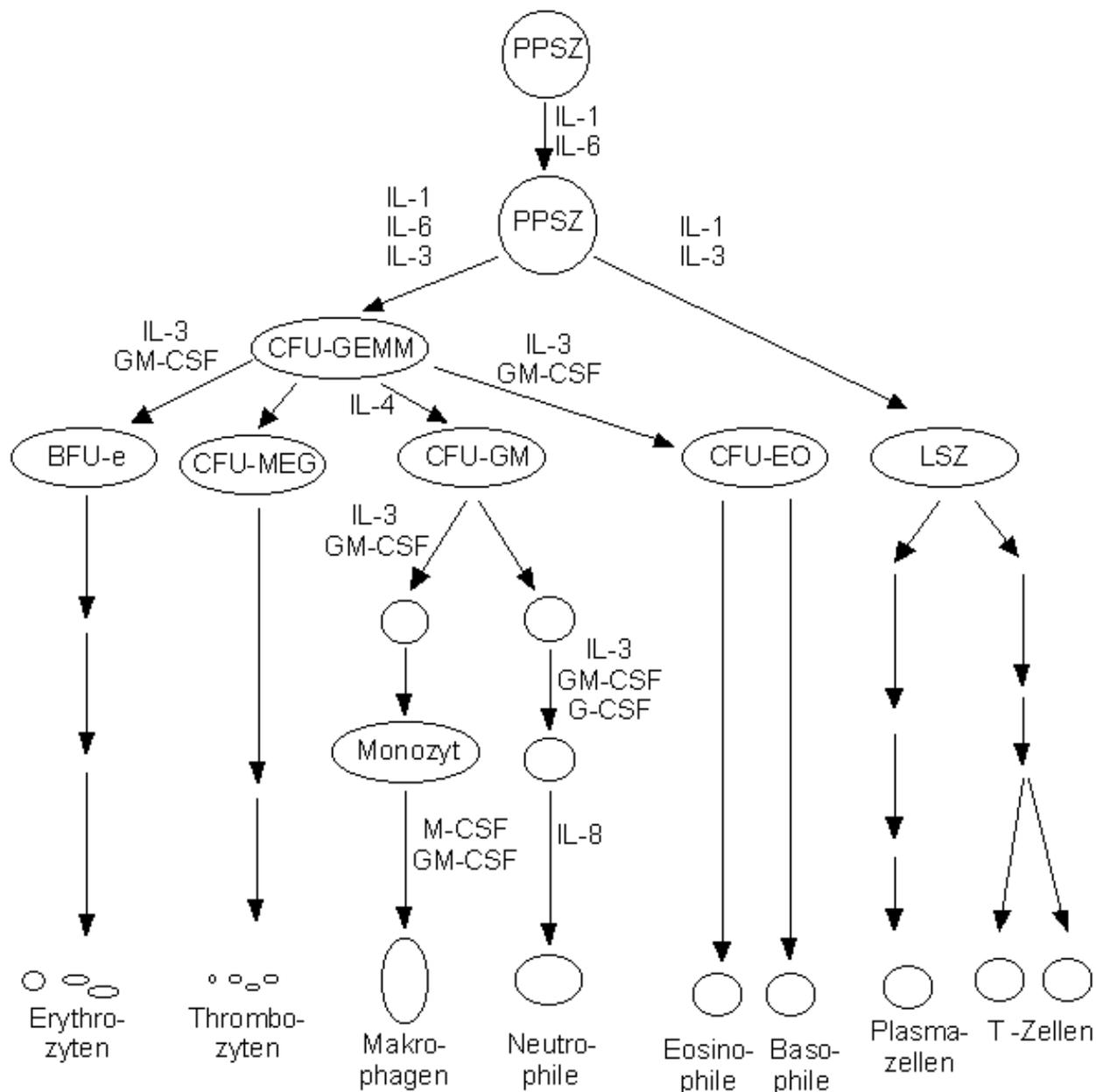


Abbildung 3, nach Oster *et al.* 1990: Hämatopoese unter besonderer Berücksichtigung der neutrophilen Granulozyten

**Abkürzungen:** PPSZ: Pluripotente Stammzelle, CFU: Colony Forming Unit, GEMM: Granulozyten Erythrozyten Monozyten Megakaryozyten, BFU: Burst Forming Unit, e: erythroid, MEG: Megakaryozyt, EO: Eosinophile, LSZ: Lymphozyten Stammzelle

Humanes G-CSF wurde zunächst aus humanen Zelllinien und Plazenta isoliert [Nicola 1985, Welte 1985, Nomura 1986] und 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 % normaler Seren gefunden werden kann, wird von Monozyten [Vellenga 1988], Fibroblasten und Endothelzellen [Bagby 1986, Koeffler 1987, Kaushansky 1988, Sieff 1988] produziert.

Wachstumsfaktoren werden in großen Mengen als Antwort auf inflammatorische Prozesse nach Aktivierung der Produktionszelle synthetisiert. Antigene, Lektine oder Interleukin-1 induzieren T-Lymphozyten, GM-CSF und IL-3 zu produzieren [Wong 1985, Hermann 1988, Otsuka 1988]. Monozyten setzen G-CSF und GM-CSF nach einer Stimulierung durch Endotoxin frei. Die Liberalisierung von M-CSF aus den Monozyten kommt erst nach einer Stimulierung mit Faktoren aus aktivierten T-Zellen, wie das IFN- $\gamma$ , IL-3 und GM-CSF oder nach einer Exposition mit TNF- $\alpha$  [Horiguchi 1987,

*Vellenga 1988*] zustande. TNF- $\alpha$  und IL-1, beide aus aktivierten monozytären Zellen stimulieren außerdem Fibroblasten und Endothelzellen GM-CSF und G-CSF zu produzieren [*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 hämatopoetischen Homeostase und andererseits eine bedeutsame Rolle in der Wirtsreaktion auf eine Infektion oder Antigen-Präsentation spielen.

Die biologischen Wirkungen der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren werden durch spezifische Bindung an in einer geringen Menge präsentierte, hochaffine Rezeptoren an der Oberfläche von Zielzellen vermittelt [*Sherr 1985, Gasson 1986, Park 1986, DiPersio 1988*]. Neben dem Vorkommen auf wenigen nicht-hämatopoetischen Zellen, deren physiologische Bedeutung noch nicht ganz aufgeklärt ist, treten diese Rezeptoren an hämatopoetischen Zellen auf und vermitteln dort die wichtigsten Aufgaben der Wachstumsfaktoren: Proliferation und Differenzierung der Stammzellen sowie Steigerung der Funktionsfähigkeit der ausgereiften Blutzellen.

G-CSF (wie M-CSF) ist im Gegensatz zu den restlichen Wachstumsfaktoren relativ zellinienspezifisch. So wird durch G-CSF vorwiegend die Proliferation und Differenzierung der Progenitorzellen unterstützt, welche in die Zelllinie der neutrophilen Granulozyten mündet [*Platzer 1985, Souza 1986*].

Zu der Einflußnahme der hämatopoetischen Wachstumsfaktoren auf die Kinetik von Progenitorzellen-Wachstum 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*].

Die Isolierung der cDNA, welche die hämatopoetischen Faktoren verschlüsselt, führte zur Biosynthese von ausreichenden Mengen an rekombinantem Protein in Zellkulturen sowie in *Escherichia coli*-Kulturen zur Erprobung dieser Stoffe im therapeutischen Einsatz. Die ersten Studien dieser Faktoren an Tieren ermutigten hinsichtlich ihrer Sicherheit und Effizienz, die Hämatopoese zu stimulieren. Einige dieser Wachstumsfaktoren sind am Menschen getestet und bereits im klinischen Einsatz.

Derzeit liegt die Indikation für eine klinische Applikation von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren in drei Bereichen: 1. die Wiederherstellung der Hämatopoese durch entweder Vermeidung einer iatrogenen oder krankheitsbedingten Knochenmarksuppression oder Beschleunigung der Erholung davon. 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.

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 (ebenfalls zum Ausgleich einer myelotoxischen Therapie, sowie in vereinzelter Ausprägung 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).

### **Toxizität der myeloiden Wachstumsfaktoren**

Die rekombinanten Wachstumsfaktoren, welche in klinischen Studien getestet wurden, zeigten in der Regel bei den Patienten eine gute Toleranz. Bei GM-CSF wie bei G-CSF wurden Knochenschmerzen und eine initiale transiente Leukopenie in den ersten 30 Minuten nach einer intravenösen Bolusgabe gefunden [*Devereux 1987, Morstyn 1988*]. Diese kurzfristige Leukopenie war nicht mit ungünstigen klinischen Effekten verbunden. Eine G-CSF-Gabe wurde im Allgemeinen mit minimalen subjektivem Unwohlsein, im wesentlichen mit den Knochenschmerzen verbunden, empfunden. Eine maximale tolerierte Dosis wurde bei G-CSF noch nicht definiert.

Bislang wurde keine Antikörper-Bildung oder Tachyphylaxie während einer Therapie mit einem rekombinanten Wachstumsfaktor bei humanen Patienten beobachtet. Es gibt keinen Anhaltspunkt dafür, daß es durch den Einsatz dieser Wirkstoffe zu einer Knochenmarkerschöpfung kommt, vielmehr wird über eine erhöhte Anzahl zirkulierender

## 3 Eigene Untersuchungen

### 3.1 Zielsetzung

Diese Tierstudie diente der Untersuchung der Auswirkungen von rhG-CSF (Filgrastim) auf die Klinik, Hämodynamik und Mediatorfreisetzung am wachen Schwein bei initialer Sepsis.

### 3.2 Methode

Diese vom Oktober 1995 bis Oktober 1996 in ihrem tierexperimentellen Teil durchgeführte Studie wurde gemäß § 8 und § 15 des Deutschen Tierschutzgesetzes von der zuständigen Kommission des Regierungspräsidiums Freiburg unter dem Aktenzeichen 37 / 9185.811 / 854 genehmigt.

#### 3.2.1 Versuchstiere

In verschiedenen Studien hat sich das Schwein als geeignete Tierart für vorklinische Sepsisstudien gezeigt. Dies äußert sich in einer dem Menschen annähernden Lipopolysaccharid-Sensitivität, vergleichbaren hämodynamischen Reaktionsschemata sowie in den entsprechenden immunologischen Mechanismen [Goldfarb 1986, Redl 1993, Töns 1993]. Von Vorteil für das intensivmedizinische Monitoring und die dazu nötigen operativen Eingriffe ist die Größe im Vergleich zu anderen Versuchstierarten.

Unsere Studie wurde an insgesamt 17 juvenilen Deutschen Landschweinen durchgeführt. Die Schweine waren circa drei Monaten alt und besaßen ein durchschnittliches Körpergewicht von  $22 \pm 3,0$  kg in der G-CSF-Gruppe (zwei weibliche und fünf männliche Tiere) und  $25 \pm 3,4$  kg in der Kontrollgruppe (fünf weibliche und fünf männliche Tiere) zum Zeitpunkt der Operation (Stunde -72). Die Tiere stammten einheitlich von einem der Universität zuliefernden Schweinezüchter aus der Umgebung Freiburgs.

#### 3.2.2 Versuchsumgebung

Die Stallung befand sich in der Chirurgischen Forschung der Chirurgischen Universitätsklinik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg. Der Raum (1,80 m x 3,10 m) war mit einem Spaltenboden ausgestattet und klimatisiert (Raumtemperatur etwa 20°C, relative Luftfeuchtigkeit um 65 %). Über eine Zeitschaltuhr wurde eine künstliche Beleuchtung im Zwölf-Stundenrhythmus eingehalten. Für die Dauer der Versuchsphase wurde eine zusätzliche Wärmequelle (Infrarotlampe) installiert.

#### 3.2.3 Versuchsprotokoll

Die Randomisierung der einzelnen Tiere zu einer der beiden Gruppen (Kontrollgruppe oder rhG-CSF-Therapiegruppe) wurde vor Versuchsbeginn durchgeführt. Die Tiere gingen nacheinander in den Versuch.

Alle Tiere wurden, wie unten näher beschrieben, zur Stunde -72 invasiv instrumentiert. Ausgangswerte für alle Parameter wurden 1 Stunde vor Versuchsbeginn erhoben, um einen Einfluß der *P. aeruginosa*-Infusion auf die Basalwerte auszuschließen.

Zu folgenden Zeitpunkten im Versuchsablauf wurden die Parameter erhoben: Stunde 1, 1,5, 2, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 78, 84, 90, 96, 102, 108, 114, 120.

Zu allen diesen Meßzeitpunkten (außer Stunde 1,5) wurden die klinischen, hämodynamischen und blutgasanalytischen

Parameter erhoben. Hämatologische Bestimmungen wurden zu den Stunden 1, 2, 6, 12 und danach alle 24 Stunden durchgeführt; die Bestimmungen des klinisch-chemischen Labors alle 24 Stunden. Proben zur Bestimmung von Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  wurden zu jeder Messung, Proben zur Erfassung von Interleukin-1 Rezeptorantagonist, Prokollagen-III-Peptid, Leukocyte Neutral Proteinase Inhibitor sowie Endotoxin zu jeder Messung mit Ausnahme der Stunde 1,5 abgenommen. Zur Kontrolle der Sepsis wurden alle 24 Stunden Blutkulturen angelegt.

Die Versuchsdauer wurde mit 120 Stunden angesetzt. Nach der letzten Messung wurden die Tiere mit Thiopental-Natrium (Trapanal® 2,5g, Byk Gulden, Konstanz) intravenös anästhesiert und anschließend durch eine intravenöse Injektion von 20 ml einer 7,45 % Kaliumchloridlösung (Kaliumchlorid 7,45 %, B. Braun, Melsungen) euthanasiert.

\_\_ Stunde -72: operative Katheterimplantation

\_\_ Std. -1: Erhebung der Basalwerte

\_\_ Std. 0: Beginn der Keiminfusion

\_\_ Std. 1 Untersuchungszeitpunkte

\_\_ Std. 1,5

\_\_ Std. 2

\_\_ Std. 3

\_\_ Std. 6

\_\_ Std. 12

\_\_ Std. 24

\_\_ Std. 36

\_\_ Std. 48

\_\_ Std. 60

\_\_ Std. 72

\_\_ Std. 78

\_\_ Std. 84

\_\_ Std. 90

\_\_ Std. 96

\_\_ Std. 102

\_\_ Std. 108

\_\_ Std. 114

\_\_ Std. 120

### 3.2.4 Vorbereitungsphase

Acht Tage vor der Operation wurden die Tiere direkt vom Züchter in den Klinikbereich eingestallt. Sie standen ab dann unter ständiger Aufsicht und wurden einer Untersuchung auf den Gesundheitszustand unterzogen. In dieser präoperativen Phase wurden die Tiere an den direkten Kontakt zum Menschen und an die Hängematte gewöhnt. Die Tiere erhielten ein spezielles, rohfaserreiches Futter für Versuchstiere (Rohfaserreiche Diät für Miniaturschweine, Altromin, Lage). 24 Stunden vor der Operation wurde das Futter abgesetzt und die Tiere erhielten nur noch Wasser ad libitum.

### 3.2.5 Versuchsvorbereitung: Operative Instrumentierung

#### 3.2.5.1 Anästhesie

Die Schweine erhielten zur Sedation im Stall 0,2 mg/kg Körpergewicht Flunitrazepam (Rohypnol® , Roche, Grenzach-Wyhlen) und 7 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketanest® , Parke-Davis, Berlin) intramuskulär (Glutäalmuskulatur). Nach Eintritt der vollständigen Sedation (Seitenlage) wurde eine Ohrvene mit einer Verweilkanüle (18 G Vasofix® Braunüle, B. Braun, Melsungen) punktiert. Die Narkose wurde mit Propofol (Disoprivan® 1 %, Zeneca, Plankstadt) eingeleitet, währenddessen eine Präoxygenierung mit 100 % Sauerstoff pernasal stattfand. Mit Erreichen des Toleranzstadiums wurden die Tiere unter laryngoskopischer Kontrolle orotracheal intubiert (Endotrachealtubus mit Niederdruckcuff, Hi-Contour™ , Mallinckrodt Medical, Irland, Innendurchmesser 5,5 bis 7 mm, tiergrößenabhängig) und der Cuff geblockt. Nach auskultatorischer Lagekontrolle (beidseitige Ventilation der Lunge) wurde der Tubus am Oberkiefer mit Klebestreifen fixiert. Die Muskelrelaxation wurde mit 0,2 mg/kg Körpergewicht Vecuroniumbromid (Norcuron® , Organon-Teknika, Eppelheim) eingeleitet. Eine Magensonde mit aufgesetztem Sekretauffangbeutel wurde oro-oesophageal gelegt. Der Operationsbereich am ventralen Hals wurde rasiert.

Nach Abschluß dieser Vorbereitungen wurde das Tier in den Operationssaal gefahren und an das Beatmungsgerät angeschlossen. Über diesen Ventilator (Sulla 800V, Drägerwerke AG, Lübeck) wurde das Tier kontrolliert mit einem konstanten Atemminutenvolumen von 200 ml/kg Körpergewicht/min und einer Atemfrequenz von 12/min als intermittierende positive Druckventilation (IPPV) beatmet. Der inspiratorische Frischgasflow bestand aus 40 % Sauerstoff und 60 % Lachgas N<sub>2</sub>O. Die in- und expiratorische O<sub>2</sub>-Konzentration, sowie die expiratorische CO<sub>2</sub>-Konzentration wurden mit einem Kapnometer (Capnomac, DATEX Instrumentarium Corp., Helsinki, FIN) kontrolliert und die Beatmung eventuellen Abweichungen des expiratorischen pCO<sub>2</sub> von 36-40 mmHg individuell angepaßt.

Die Tiere erhielten eine kombinierte Inhalations-Injektionsanästhesie mit 60 % N<sub>2</sub>O im Inspirationsflow und 1,12 mg/kg/h Flunitrazepam, 7 mg/kg/h Propofol, 0,015 mg/kg/h Fentanyl (Fentanyl® , Janssen, Neuss), 0,4 mg/kg/h Vecuroniumbromid intravenös mit Hilfe von Perfusorpumpen (Perfusomat® F, B. Braun, Melsungen) über eine Hahnbank (Discofix® -Hahnbank, B. Braun). Die Dosierung von Fentanyl wurde im Verlauf der Operation an den Analgesiezustand adaptiert.

Zur Flüssigkeitssubstitution wurde an die Hahnbank eine Elektrolyt-Glucose-Lösung (Tutofusin® OPG, Kabi Pharmacia, Erlangen) über eine Infusionspumpe (Infusomat® segura, B. Braun, Melsungen) angeschlossen (Flußgeschwindigkeit 10 ml/kg Körpergewicht/h).

Das operationsbegleitende Monitoring bestand aus einem Kapnometer (Capnomac, DATEX Instrumentarium Corp., Helsinki, FIN) zur Bestimmung der in- und expiratorischen Gaskonzentrationen (O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O). Der Gasprobenschlauch wurde am Tubuskonnekter angeschlossen. Ein Pulsoxymeter diente der Kontrolle der Blutoxygenierung (SaO<sub>2</sub>) und der Pulsfrequenz, der Sensor wurde am Schwanzansatz angebracht. Die Elektroden eines Elektrokardiographen (gemeinsamer Monitor mit Pulsoxymeter: Satelite Plus, DATEX Instrumentarium Corp.) wurden in der Ableitung II nach Einthoven an den Tieren angebracht.

Gegen Ende der Operation wurden die Anästhetika abgestellt und zunächst mit 100 % O<sub>2</sub> im Frischgasflow weiter beatmet. Nach circa 5 Minuten wurde der Frischgasflow auf O<sub>2</sub>/Raumluft (60:40) umgestellt und die Tiere langsam von der kontrollierten Beatmung entwöhnt. Bei Einsetzen der Spontanatmung und Sicherstellung der Schutzreflexe wurde die Magensonde und anschließend der Endotrachealtubus entfernt.

#### 3.2.5.2 Katheterimplantation

Die Tiere wurden auf dem Operationstisch in Rückenlage mit leicht überstrecktem Hals fixiert. Der Operationsbereich am geschorenen ventralen Hals wurde aseptisch vorbereitet (Betaisodona® -Lösung, Mundipharma, Limburg) und die Tiere mit sterilen Operationstüchern abgedeckt.

Der Zugang erfolgte auf der linken Halsseite mit einem circa 10 cm langen paramedianen Hautschnitt auf halber Höhe zwischen Manubrium sterni und der Mandibula. Blutstillung erfolgte mit einem Hochfrequenz-Elektro-Chirurgie-Gerät (System 200, Martin, Tuttlingen). Das weitere Präparieren geschah atraumatisch durch Beiseitelegen beziehungsweise stumpfes Längsspalten der oberflächlichen Haut- und Halsmuskulatur. Die Vena jugularis externa, die Vena jugularis interna sowie die Arteria carotis communis wurden auf eine Länge von 3 cm stumpf freipräpariert und mit jeweils einem Gefäßzügel (Ligaloops® , Braun-Dexon, Spangenberg) proximal und distal fixiert.

Vor der jeweiligen Katheterimplantation wurden um das entsprechende Gefäß Ligaturen (Novafil® 2/0, Braun-Dexon) vorgelegt. Die Implantation der Polyurethankatheter (Cavafix®, B. Braun, Melsungen) in die Vena jugularis interna und in die Arteria carotis communis geschah nach Punktion der Gefäße mit einer 16 G Punktionskanüle (Abbocath®, Abboth, Wiesbaden) per Seldinger-Technik. Die Katheter wurden 12 cm weit in die Gefäße eingebracht und mit den vorgelegten Ligaturen fixiert. In die Vena jugularis externa wurde ebenfalls per Seldinger-Technik ein Schleusensystem (Einführungsbesteck-Set 8,5 Fr, Arrow, Reading, USA) implantiert und am Gefäß eingebunden. Die Gefäße wurden distal zur Vermeidung von postoperativen Blutungen vollständig ligiert (Novafil® 2/0).

Nach Implantation des arteriellen Katheters und Bestimmung des Basalwertes der aktivierten Gerinnungszeit (ACT) mittels eines ACTester™ (Trimed, Huntington Beach, USA) wurden 5000 IE Heparin (Liquemin®, Roche, Grenzach-Wyhlen) intravenös verabreicht.

Zum Wundverschluß wurden in der Tiefe Einzelhefte und oberflächlich eine fortlaufende Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial (Dexon® II 2/0, Braun-Dexon, Spangenberg) angebracht. Die Hautadaption geschah mit Einzelheften, wahlweise Reverdin-Naht, mit nichtresorbierbarem Material (Dermalon® 2/0, Braun-Dexon).

Nach Abschluß des chirurgischen Vorgehens wurde unter sterilen Kautelen ein 7 Fr Thermodilutionskatheter (Swan-Ganz® Thermodilution Catheter, Baxter, Unterschleißheim) über die Gefäßschleuse und unter Druckmonitor-Kontrolle in die Arteria pulmonalis eingeschwenkt.

Intraoperativ sowie bis 48 Stunden postoperativ im Abstand von 8 Stunden wurde den Tieren zum Schutz vor Infektionen 1 Million IE Benzylpenicillin (Penicillin "Grünenthal" 1 Mega, Grünenthal, Stolberg) intravenös appliziert.

### **3.2.5.3 Postoperative Versorgung**

Die Cavafix® -Katheter und die Ausgänge des Thermodilutionskatheters wurden je mit einem Dreibegehahn (Discifix® -3, B. Braun, Melsungen) konnektiert, an welche im Stall Perfusorleitungen (B. Braun) angeschlossen wurden. Der Infusionszugang des Schleusensystems erhielt ebenfalls einen Dreibegehahn, über welchen in der nachfolgenden Phase die Infusionen liefen.

Der Bereich der Operationswunde wurde mit antiseptischer Salbe (Braunovidon®, B. Braun) versorgt und mit sterilen Kompressen (ES Kompressen, Hartmann, Heidenheim) abgedeckt. Die Kompressen und die Katheter wurden mit selbstklebendem Verband (Fixomull® stretch, Beiersdorf AG, Hamburg) derart am Hals fixiert, daß die Dreibegehähne erst im Nackenbereich frei lagen.

Im Stall wurden die Dreibegehähne mit vorgespülten Perfusorleitungen beziehungsweise mit Heidelberger Verlängerungen konnektiert, welche an Perfusorpumpen beziehungsweise Infusionssysteme angeschlossen wurden. Der Katheterzugang der Vena jugularis interna, sowie die beiden Zuleitungen des Thermodilutionskatheters wurden mit Heparin-Lösungen (100 IE Heparin/ml Ringerlösung) mit einer dem aktuellen Gerinnungsstatus angepaßten Geschwindigkeit durchgespült. Der Gerinnungsstatus wurde als ACT (Activated Clotting Time) alle 6 Stunden bestimmt. Der arterielle Katheter wurde mit 3 ml/h heparinfreier Ringerlösung gespült, da hier die Proben zur ACT-Bestimmung gezogen wurden.

Um den Tieren eine weitgehende Bewegungsfreiheit zu erlauben, aber das Katheter- und Zuleitungssystem vor dem Zugriff durch das Schwein zu schützen, wurde den Tieren ein Brustgeschirr aus elastischen Binden (BMP-Idealbinden S, 10 cm, Beiersdorf AG, Hamburg) angelegt und dieses über einen langen Gummischlauch an die Decke gespannt. Die Perfusorleitungen und die Heidelberger Verlängerungen wurde bis in 1 m Höhe an den Gummischlauch fixiert und von dort in den Vorraum geleitet, wo sich der Infusionsturm befand.

### **3.2.6 Ernährung**

Postoperativ wurde den Tieren wieder Wasser und Futter angeboten.

12 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Schweinen das Futter wieder entzogen. Wasser stand aber weiterhin wie über die gesamte Versuchsdauer frei zur Verfügung.

Mit Versuchsbeginn wurde eine parenterale Ernährung gestartet, bestehend aus Glucose, Aminosäuren und Elektrolyten (Glucose 50, Clintec Salvia, Homburg / Saar; Aminomel 8E salvia, Clintec Salvia; Ringerlösung, Delta-Pharma, Pfullingen). Der tägliche Bedarf wurde auf das Körpergewicht bezogen und aus folgenden Formeln berechnet:

Kohlenhydratbedarf =  $2 \times 97 \times [\text{kg Körpergewicht}]^{0,655}$  kcal/Tag

Proteinbedarf = 4 g/kg Körpergewicht/Tag

Volumenbedarf = 90 ml/kg Körpergewicht/Tag

Das Volumen der Spüllösungen wurde mit einberechnet.

Zur Kontrolle einer ausreichenden Versorgung wurde regelmäßig alle 12 Stunden der Blutzuckergehalt sowie alle 24 Stunden der Gesamteiweißgehalt des Serums bestimmt.

### 3.2.7 Versuchsphase

#### 3.2.7.1 Aufbereitung des *Pseudomonas aeruginosa*-Stammes

Zur Studienvorbereitung wurde *P. aeruginosa* Serotyp 1 angezüchtet. Aus dieser Stammkultur wurden in der log-Phase Glycerolstöcke à 1 ml angelegt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren.

60 Stunden vor Versuchsbeginn wurde jeweils ein Glycerolstock aufgetaut und eine Blutagarplatte mit der Suspension beimpft. 12 Stunden später wurde eine Kolonie in eine Nährbouillon (Tryptone-Soya-Broth TSB, Oxoid, Basingstoke, GB) übertragen und diese in einem Schüttelautomat (Certomat U und Certomat H, B. Braun, Melsungen) bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Diese erste Stammlösung ließ man etwa 24 Stunden anwachsen. Daraus wurden dann 1 ml in 400 ml frischer Nährbouillon übertragen, in welcher sich 1 Stunde vor Versuchsbeginn die Bakterien in der log-Phase befanden.

Die folgenden Prozeduren wiederholten sich circa alle 6 Stunden über die gesamte Versuchsphase: Zu diesem Zeitpunkt wurden aus der Bakterienlösung erstens 10 ml in weitere 150 ml frische Nährbouillon übertragen sowie zweitens je 40 ml der Lösung in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen (Falcon® 50 ml, Greiner, Frickenhausen) pipettiert. Diese Röhrchen wurden für 10 Minuten mit 3500 U/min zentrifugiert (Rotixa/RP, Hettich, Tuttlingen), der Überstand dekantiert, das Sediment in physiologische NaCl-Lösung wieder aufgenommen, erneut bei 3500 U/min 10 Minuten zentrifugiert, nochmal dekantiert, gelöst, ein drittes Mal zentrifugiert und dekantiert. Danach wurde das Sediment in soviel physiologische NaCl-Lösung aufgenommen, daß eine Suspension mit einer optischen Dichte von 0,6 bei 546 nm (bestimmt in einem Beckman DU® -6 Spectrometer, Beckman Instruments Inc., Irving, USA) entstand. In Vorversuchen wurde bei dieser Dichte ein Keimgehalt von  $3-5 \times 10^8$  koloniebildenden Einheiten /ml festgestellt. Entsprechend dem jeweiligen Tiergewicht in kg wurde aus der Bakteriensuspension die zahlenmäßig gleiche ml-Menge in eine 50 ml Perfusorspritze aufgezogen und diese bis zur 50 ml-Marke mit NaCl-Lösung aufgefüllt.

Es fand eine regelmäßige Kontrolle der über die optische Dichte eingestellten Bakteriensuspension auf den Keimgehalt statt. Dazu wurden Verdünnungsreihen angelegt, auf Colombia-Blutagarplatten (Heipha Diagnostika, Heidelberg) ausgestrichen und die Anzahl der koloniebildenden Einheiten nach einer Wachstumsphase von 12 Stunden bestimmt.

#### 3.2.7.2 Sepsisinduktion

Die Spritze wurde in eine Perfusorpumpe eingespannt, welche sich in einem Kühlschrank ( $4^{\circ}\text{C}$ ) im Stallvorraum befand. Über Perfusorleitungen wurde dieses System mit dem zentralvenösen Zugang des Thermodilutionskatheters verbunden.

Zur Stunde 0 (Versuchsbeginn) wurde der Perfusor mit einer Geschwindigkeit von 8 ml/h gestartet. Die Keimapplikation bestand somit aus einer Dosierung von  $5-8 \times 10^7$  KBE/kg Körpergewicht/h. Die Keimperfusion wurde kontinuierlich bis zum Versuchsende fortgesetzt. Nur bei extrem schlechtem klinischem Zustand in den ersten 12 Stunden wurde die Perfusorpumpe für maximal 1/2 Stunde abgestellt. Eine Zwangspause ergab sich bei allen Tieren zur Stunde 3 und danach alle 24 Stunden für circa 30 Minuten, da die Filgrastim-/Placebo-Kurzinfusion über denselben Zugang appliziert wurde.

#### 3.2.7.3 Therapie mit rhG-CSF

RhG-CSF (Filgrastim) ist als Neupogen® 30 der Firma Hofmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen / Amgen, München im Handel. Es ist ein gentechnisch hergestellter Wirkstoff aus *Escherichia coli*-Kolonien (E. coli K12). Der rekombinante humane Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor zeigte sich in Vorstudien an der Chirurgischen Forschung der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg als wirksam im Schwein [Breuer 1994].

Wir verwendeten Neupogen® entsprechend der beiliegenden Gebrauchsinformation. Um das Medikament definiert applizieren zu können, wählten wir die intravenöse Gabe. Die gebrauchsfertige Filgrastim-Lösung mit 30 Millionen Einheiten (300 µg) wurde mit 19 ml 5 %iger Glucose-Lösung (Glucose 5, B. Braun, Melsungen) verdünnt, so daß eine Endkonzentration von 1,5 Mio. Einheiten (15 µg)/ml entstand. Um Filgrastim nicht überzudosieren, wählten wir die niedrigste angegebene Menge: 0,5 Mio. Einheiten (5 µg) pro kg Körpergewicht. Aus der applikationsfertigen Lösung wurde die dem Körpergewicht entsprechende Menge in eine Perfusorspritze aufgezogen (zusätzlich weitere 2 ml, um den Verlust in der Perfusorleitung auszugleichen).

Diese Tagesdosis wurde 3 Stunden nach Versuchsbeginn und danach alle 24 Stunden als Kurzzeitinfusion über einen Zeitraum von 30 Minuten intravenös appliziert. Als Zugang wurde dabei der zentralvenöse Zugang des Thermodilutionskatheters gewählt. Die über denselben Zugang laufende Keiminfusion wurde über den Zeitraum abgestellt. Die Kontrolltieren erhielten entsprechend 5 %ige Glucoselösung.

### 3.2.7.4 Untersuchung und Probengewinnung

Zur Bestimmung der hämodynamischen Parameter wurde das Schwein in ein eigens dafür gefertigte Hängevorrichtung gehoben. Diese bestand aus einer Stahlschienenkonstruktion, in welcher eine gepolsterte Matte austauschbar befestigt wurde. Das Schwein hing dabei aufrecht mit dem Thorax in der Matte und konnte die Beine frei durch dafür vorgesehene Löcher bewegen. Diese Konstruktion diente dazu, innerhalb eines Tieres und zwischen den verschiedenen Tieren vergleichbare Voraussetzungen für die hämodynamischen Messungen zu schaffen.

Bei allen Proben- und Parameterabnahmen wurde unter aseptischen Kautelen gearbeitet.

Zu jedem Meßzeitpunkt, ausgenommen die Probengewinnung zur Stunde 1,5 fanden Bestimmungen der klinischen sowie der hämodynamischen Parameter statt. Nach der Bestimmung der Atemfrequenz und der Herzfrequenz wurden alle im folgenden benutzten Dreivegeähne mit Neo-Kodan-Spray (Schülke&Mayr, Norderstedt) desinfiziert. Die Druckdom-Druckumwandler-Einheit (physikalische in elektrische Signale) wurden auf die Herzebene justiert und ein Nullabgleich des Druckmeßsystemes durchgeführt. Dazu wurde auf Herzebene gegen den atmosphärischen Druck gemessen und dieser als Nullwert gesetzt. Zur Druckmessung wurde ein Druckturm der Firma Hellige mit eingebautem Monitor verwendet. Über dieses System wurden nacheinander folgende Parameter bestimmt: mittlerer arterieller Druck (MAP), mittlerer pulmonalarterieller Druck (MPAP), zentralvenöser Mitteldruck (ZVD) sowie der pulmonalarterielle Verschlussdruck (PCWP, Wedge). Zeigte sich ein Parameter nicht wertekonstant über den Meßzeitraum, wurden mehrere Werte notiert und das endgültige Ergebnis als Mittelwert zur weiteren Auswertung verwendet. Die Bestimmung des Herzzeitvolumens (HZV) wurde mit dem Thermodilutionsverfahren, wie von Fegler 1954 beschrieben und 1972 von Ganz und Swan modifiziert, bestimmt [Fegler 1954, Swan 1972]. Dazu wurden 5 ml eisgekühlte (2 bis 4°C) isotonische Natriumchloridlösung (schiwa® Perfluflac, Schiwa, Glandorf) über den Swan-Ganz-Katheter in den rechten Vorhof rasch injiziert. Da wir am nicht beatmeten Tier arbeiteten, geschah dies nicht atemsynchron. Zur Korrektur eventueller Abweichungen wurden mindestens drei bis fünf Werte gemessen, aus welchen der Mittelwert errechnet und im weiteren verwendet wurde. Die Integralberechnung zur Ausgabe des konkreten Herzzeitvolumens fand mit einem Cardiac Output Computer (Sirecust® 404-1, Siemens, München) statt. Über den Thermodilutionskatheter wurde auch die innere Körpertemperatur bestimmt.

Nach der Bestimmung der hämodynamischen Parameter wurden die Verbindungen zum Druckmeßturm diskonnektiert. Vor der Abnahme der Proben wurden 2 ml aus dem Katheter vorgezogen und verworfen, um eine Verunreinigung mit Infusionslösung zu vermeiden. Die Proben für die arterielle Blutgasbestimmung sowie die ACT-Bestimmung wurden aus dem Arteria carotis-Katheter abgenommen. Diese Proben wurden sofort verarbeitet. Zur Bestimmung von pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub> sowie von SaO<sub>2</sub>, Hkt und Hb wurde eine Gerätekombination aus ABL500 und OSM3 Hemoxymeter (beide Radiometer Medical, Kopenhagen, DK) verwendet, für die Bestimmung des Gerinnungsstatus das erwähnte ACT-Bestimmungsgerät. Der Katheter wurde nach der Abnahme mit Ringerlösung gespült.

Die folgende Abnahme der venösen Blutproben geschah aus dem Vena jugularis interna-Katheter. Auch hier, wie zuvor an dem arteriellen Katheter, wurden 2 ml aus dem Katheter abgezogen. Je nach Zeitpunkt handelte es sich hier um die Proben zur Bestimmung des kleinen Blutbildes, der Parameter der klinischen Chemie, der Mediatoren und des Endotoxins sowie die Probe für die Blutkultur. Die Proben wurden in Monovetten-Systeme (Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis zwischengelagert. Die aerobe und anaerobe Blutkulturen wurden sofort angelegt (FAN™ BacTAlert, Organon Teknika, Eppelheim). Die Spülung der Katheter fand auch hier gleich nach der Abnahme mit Ringerlösung statt.

Nach Aufnahme aller zu bestimmenden Parameter wurde das Tier wieder in den Stall gehoben.

Die Probenaufbereitung fand direkt anschließend an die Versorgung des Tieres statt. Dazu wurden die Proben zur

Bestimmung der Mediatoren und des Endotoxins in einer Zentrifuge (Rotixa/RP, Hettich, Tuttlingen) bei 4°C und einer Geschwindigkeit von 4000 U/min in Plasma und zelluläre Bestandteile getrennt. Der plasmatische Überstand wurde in Reagiergefäße (Greiner) bzw. die Endotoxinproben in sterile und pyrogenfreie Cryo-Röhrchen (Nalge Nunc International, Wiesbaden-Biebrich) pipettiert. Bis zur Laborauswertung wurden diese Proben bei -72°C gelagert.

Die Monovetten zur Bestimmung des kleinen Blutbildes und der klinischen Chemie wurden direkt in die Laboratorien gebracht.

Die Blutkulturen wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg ausgewertet.

### 3.2.7.5 Kalkulierte hämodynamische Parameter

Der systemisch-vaskuläre Widerstand sowie der pulmonalkapilläre Widerstand werden aus den gemessenen hämodynamischen Parametern errechnet und wie das Herzzeitvolumen auf das Körpergewicht bezogen. Dies dient der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse, da diese Parameter stark von der Tiergröße und damit dem Körpergewicht abhängen.

Indexberechnungen:

Herzindex (CI) =  $\text{HZV} \times 1000 / \text{Körpergewicht [kg]}$

Schlagvolumenindex (SVI) =  $\text{CI} / \text{HF}$

Systemischer Gefäßwiderstandsindex (SVRI) =  $(\text{MAP} - \text{ZVD}) \times 80 / \text{CI}$

Pulmonaler Gefäßwiderstandsindex (PVRI) =  $(\text{MPAP} - \text{PCWP}) \times 80 / \text{CI}$

### 3.2.7.6 Modifizierung des APACHE II Klassifizierungssystems

Um den Schweregrad der Sepsis bei unseren Tieren objektiv zu beurteilen, haben wir den APACHE II Score, wie er von Knaus *et al.* 1985 in die intensivmedizinische Diagnostik eingeführt wurde, angewendet [Knaus 1985]. Nach einer ersten Berechnung der Punkteverteilung unter direkter Übernahme des humanen Systems erschien aber die Punktzahl etwas verzerrt, da einige herangezogene Parameter beim Schwein auch unter physiologischen Verhältnissen deutlich von den humanmedizinischen Referenzwerten abweichen. Für die Anwendung in unserer Studie wurde der APACHE II Score aus diesem Grunde leicht modifiziert.

#### 3.2.7.6.1 Anpassung der physiologischen Parameter:

durch Anwendung des ursprünglichen APACHE II Klassifizierungssystems auf unsere Tiere sind folgende Parameter zur Stunde 0 mit sehr hohen Werten aufgefallen:

- Körpertemperatur
- Hämatokrit

Um diese Abweichungen zu umgehen und einen weitgehend anwendbaren und vergleichbaren Score zu erhalten, wurden diese beiden Parameter an physiologische Gegebenheiten des Schweines angepaßt. Als Normalwerte haben wir dazu Werte aus unserer Klinik verwendet und die Spannweiten aus dem von Knaus *et al.* vorgeschlagenem Klassifikationssystem übernommen.

Damit ergibt sich folgende Punkterangverteilung:

Punkte	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Temperatur	<30,8	30,8-32,7	32,8-34,7	34,8-36,7	36,8-39,2	39,3-39,7		39,8-40,7	≥ 40,8

Hämatokrit	<14,0	14,0-23,9	24,0-39,9	40,0-44,9	45,0-54,9	≥ 55,0
------------	-------	-----------	-----------	-----------	-----------	--------

Die restlichen 10 Variablen des "acute physiologic score" wurden ohne Änderungen der von Knaus vorgeschlagenen Klassifizierungen übernommen.

Der Glasgow Coma Score wurde aufgrund der Schwierigkeiten bei der Erhebung der dazu nötigen Parameter am Schwein nicht angewendet.

### 3.2.7.6.2 Altersverteilung

In unserer Studie wurden nur Tiere der Altersklasse 3 Monate verwendet. Dies entspricht durchaus einer Altersverteilung von  $\leq 44$  Jahren. Es wurden hier also auch durchgehend 0 Punkte vergeben.

### 3.2.7.6.3 Chronische Vorerkrankungen

Zur Bestimmung der Ausgangswerte (Stunde 0) wurde hier eine Punktzahl von 0 verwendet (entspricht gesunder Proband).

Da unsere Tiere ohne Vorschädigung in die Studie gingen und keine chronische oder akute Beeinträchtigung des Immunsystems zu erwarten ist, wurden bei Erhebungen nach dem Infektionszeitpunkt 2 Punkte entsprechend einem Patienten nach geplantem operativen Eingriff vergeben.

## 3.2.7.7 Labormethoden

Die Bestimmung von IL-1ra, LNPI sowie Prokollagen-III-Peptid wurden freundlicherweise von Frau Prof. Jochum, Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München übernommen.

### 3.2.7.7.1 Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra)

Die Bestimmung des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten im Serum erfolgte mit Hilfe eines quantitativen Enzyme Immunoassay der Firma R&D Systems, Inc., Wiesbaden-Nordenstadt.

### 3.2.7.7.2 Leukocyte Neutral Proteinase Inhibitor (LNPI)

Der Proteinaseinhibitor LNPI wurde in einem von Herrn Dr. Teschauer entwickelten Sandwich-ELISA auf seinen Gehalt im Serum getestet.

### 3.2.7.7.3 Prokollagen-III-Peptid

Zur Bestimmung von Prokollagen-III-Peptid im Serum diente ein Radioimmun-Test der Firma CIS bio international, Gif-sur Yvette, Frankreich.

### 3.2.7.7.4 Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

Die Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  Konzentration wurde in einem Sandwich-ELISA der Firma Endogen, Inc., Cambridge, USA bestimmt. Der Test wurde auf einem vollautomatischen ELISA-Reader (Plato, Fa. Rosys Analysensysteme, Essen) durchgeführt

Die Durchführung dieses Testes fand im Labor von Herrn Dr. Nauck, klinisch-chemisches Zentrallabor der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, durch Frau Haas statt.

### 3.2.7.7.5 Endotoxin

Für die Endotoxinbestimmung wurde ein Limulus Amoebozyten Lysat-Test (LAL-Test) der Firma Endosafe Inc. (Charleston, USA) verwendet. Dieser ermöglicht einen quantitativen Nachweis von Endotoxin in Proben.

Diese Bestimmung wurde in unseren eigenen Labors durchgeführt.

### 3.2.7.7.6 Kleines Blutbild

Die Konzentration an Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, sowie der Gehalt an Hämoglobin und der Hämatokrit wurden in EDTA-Vollblut gemessen.

### 3.2.7.7.7 Klinische Chemie

Im Serum wurden der Gehalt an Natrium, Kalium, Calcium, Kreatinin, Harnstoff, Gesamtbilirubin, Glucose, Gesamteiweiß, Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT (ALT)) sowie die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT (AST)) bestimmt. Diese, wie auch die Blutbildbestimmung wurden im Zentrallabor der Medizinischen Klinik der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg durchgeführt.

### 3.2.8 Auswertung der Meßergebnisse

Die Power des Tests wurde auf 0,8 festgelegt ( $\beta$ -Fehler  $\leq 0,2$ ), daraus ergab sich, unter Berücksichtigung der Überlebenszeit als den aussagefähigsten Parameter eine Gruppengröße von 7 Tieren als ausreichend. Um sicher in dieser Gruppengröße zu bleiben und um die Statistik zu festigen, wurden je 10 Tiere einer Gruppe zugeordnet. Leider verstarben in der G-CSF-Gruppe 3 Tiere vor der Einleitung der Therapie (vor der 3. Stunde), bzw. konnten aufgrund anfänglicher Durchführungsprobleme nicht in die Auswertung aufgenommen werden.

Um die unübersichtliche Vielzahl an Daten und Werten auf ein überschaubares Maß zu reduzieren und um die statistische Auswertung aussagekräftiger zu bewerten, wurden die über die Versuchsperiode erfaßten Parameter aus allen Meß- und Abnahmezeitpunkten drei Phasen zugeordnet und nach der Methode der "summary measurements" durch Berechnung der Flächen unter der Verlaufskurve jeder Untersuchungsphasen aufbereitet [Matthews 1990]. Die Phasen wurden folgendermaßen zusammengefaßt: Phase 1 als Initialphase von Sepsisinduktion ausgehend bis Stunde 12, Phase 2 als Erholungsphase von Stunde 12 bis zur Stunde 60 und die Phase 3 als finale Phase von Stunde 60 bis Versuchsende. Diese Phaseneinteilung entspricht einer der Klinik angepaßten Unterteilung in akute Schockphase, scheinbare Erholung und systemische Verschlechterung. Die Werte dieser Phasen wurden für jedes einzelne Tier als Fläche unter der Kurve kalkuliert. Als Einzelwerte wurden die Ergebnisse der Ausgangssituation (Basalwert) und gegebenenfalls Maximalwerte zugelassen, um Vergleiche zu physiologischen Anfangswerten durchführen zu können.

Die Datenverarbeitung wurde auf dem Programm Microsoft Excel® 5.0 durchgeführt. In der statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS® für Windows™ verwendet. Hier wurden Mittelwerte und Standardabweichungen der Parameter zu Basalwert, Stunde 2, ggf. Maximalwert, Phase 1, 2 sowie 3 errechnet. Die Unterschiede im Sepsisverlauf bezogen auf den Ausgangswert wurden innerhalb beider Gruppen mit dem Student-T-Test für verbundene Stichproben geprüft. Die Gruppen wurden auf die Nullhypothese der Populationsgleichheit mit dem Student-T-Test zu jedem Zeitpunkt beziehungsweise jeder Phase geprüft.

Um den statistischen Fehler zu verringern, wurde grundsätzlich eine zweiseitige Hypothese aufgestellt und die Irrtumswahrscheinlichkeit bei 5 % festgelegt. Es erfolgte eine  $\alpha$ -Adjustierung (Bonferoni-Korrektur) für multiple Tests.

In den aufgeführten Grafiken sind die Ergebnisse als Mittelwert mit Darstellung der Standardabweichung aufgezeichnet.

Die Überlebenszeit wurde in einem Kaplan-Meier-Verfahren geschätzt und die Überlebenszeitverteilung mit dem Logranktest verglichen. Die Ergebnisse sind als Survivalfunktion dargestellt.

Zwischen den Plasmawerten des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten und dem Todeszeitpunkt jeden Tieres wurde eine lineare Regressionsanalyse angewandt. Es wurde der Spearmansche Rang-Korrelationskoeffizient berechnet.

## 4 Ergebnisse

Im folgenden sind ein Teil unserer Ergebnisse dargestellt. Die hier nicht beschriebenen Parameter werden im Anhang tabellarisch aufgeführt.

Sind einzelne Werte im Bezug zum Basalwert der jeweiligen Gruppe nach Bonferoni-Korrektur signifikant ( $p < 0,05$ ), ist dies mit einem \* gekennzeichnet. Bei hoher Signifikanz ( $p < 0,01$ ) mit \*\*. Unterschiede zwischen den Gruppen sind bei entsprechenden p-Werten mit # bzw. ## gekennzeichnet.

### 4.1 Ergebnisse der klinischen Untersuchungen

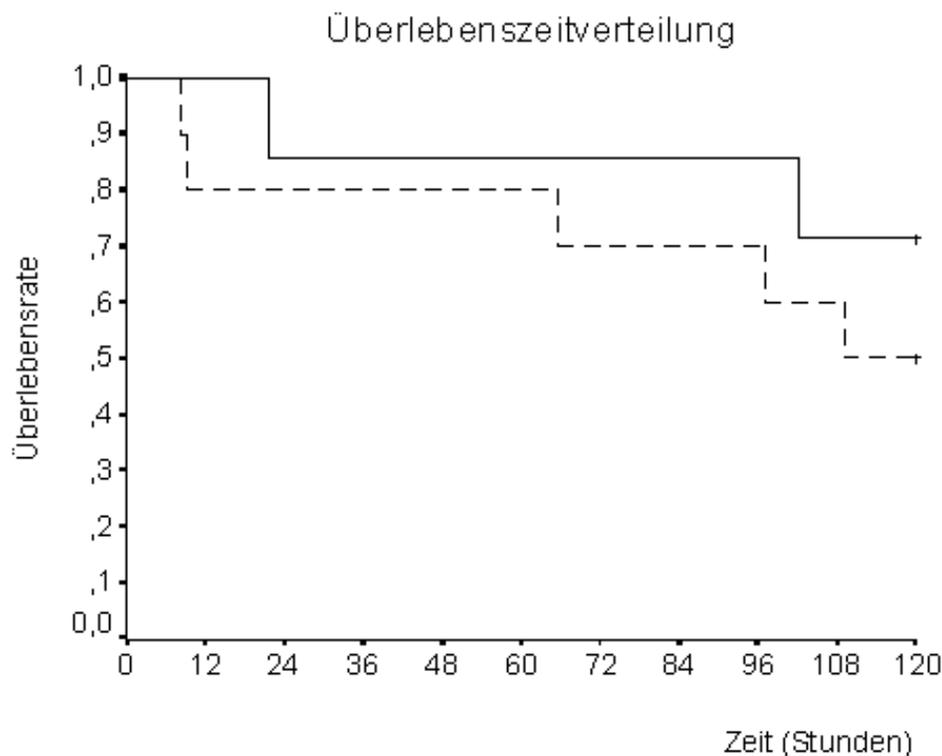
Folgende klinischen Parameter wurden erhoben:

Allgemeinbefinden, Körperinnentemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz.

In der Regel ein bis drei Stunden nach der Infektion zeigen die Tiere Vomitus. Erst in der späteren Phase ist auch der untere Verdauungstrakt betroffen und die Tiere haben zum Teil sehr trockenen Kot mit pseudomembranösen Auflagerungen, zum Teil sehr dünnen, schleimigen Durchfall. In der Anfangsphase zeigen alle Tiere Dermographie, vereinzelt später Akrenverfärbungen. Alle Tiere haben eine Tachypnoe infolge der Infektion (siehe unten), die meisten mit deutlicher in- und expiratorischer Dyspnoe bis hin zur Maul- und Schnappatmung. Die Tiere zeigen sich in den ersten Stunden durchgehend apathisch bis somnolent, bei extrem schlechten Zustand auch mit tonisch-klonischen Krämpfen und Ruderbewegungen.

Zwei Kontrolltiere versterben in der initialen Sepsisphase (0 - 12 Stunden) an einem massiven Lungenödem mit schaumig-blutigem Nasenausfluß und inspiratorischer Dyspnoe nach 8, 9 Stunden. Ein Tier der G-CSF-Gruppe stirbt nach 22 Stunden zu einem frühen Zeitpunkt der Phase 2. In der letzten Phase kommt es zur allgemeinen Verschlechterung des Zustandes, infolgedessen ein Kontrolltier nach 66 Stunden an Lungenödem und tonisch-klonischen Krämpfen ver stirbt. An neurologischen Ausfällen und einem progressiven Lungenversagen ver stirbt ein weiteres Tier nach 97 Stunden und ein drittes Schwein nach 109 Stunden (Euthanasie). Unter G-CSF-Therapie muß in der dritten Phase nur ein Tier nach einer deutlichen Verschlechterung der Sauerstoffsättigung des arteriellen Blutes euthanasiert werden (Stunde 102).

Grafik 4.1: Survival-Grafik, die kumulative Überlebensverteilung (Kaplan-Meier) in einer linearen Skalierung. Dargestellt sind in durchgezogener Linie die G-CSF-Therapie-Gruppe, gestrichelt die Kontrollgruppe.



Die Schätzung der Survivalfunktion nach

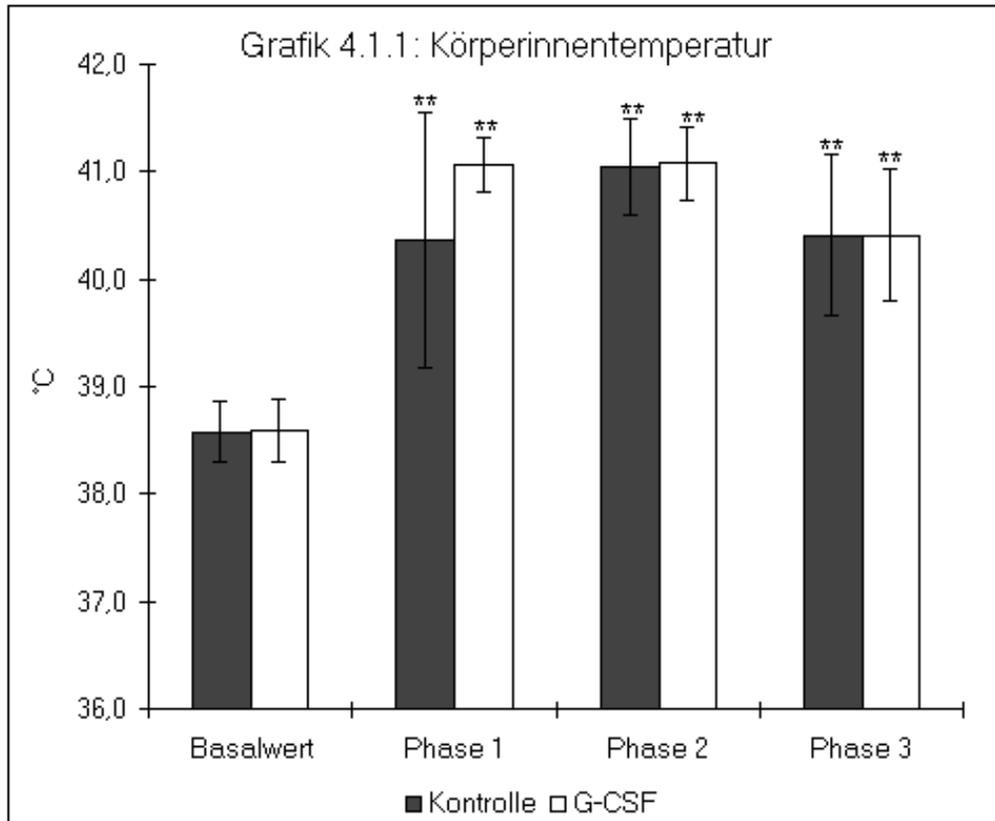
Kaplan-Meier ergab eine mittlere Überlebenszeit von 89 Stunden in der Kontrollgruppe und 103 Stunden in der G-CSF-Gruppe. Ein Vergleich der Überlebenszeitverteilung im Logrank-Verfahren zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ( $p = 0,38$ ). Die Mortalität in der Kontrollgruppe betrug 50 % im Vergleich zu 29 % in der G-CSF-Gruppe.

#### 4.1.1 Körperinnentemperatur

Die Körpertemperatur steigt innerhalb von 2 Stunden auf Werte bis über 40,5°C. Die höchste Temperatur wird in der Regel zur 6. Stunde *post infectionem* mit Werten zwischen 41,1 und 42,2°C erreicht. Zwei Kontrolltiere zeigen keinen

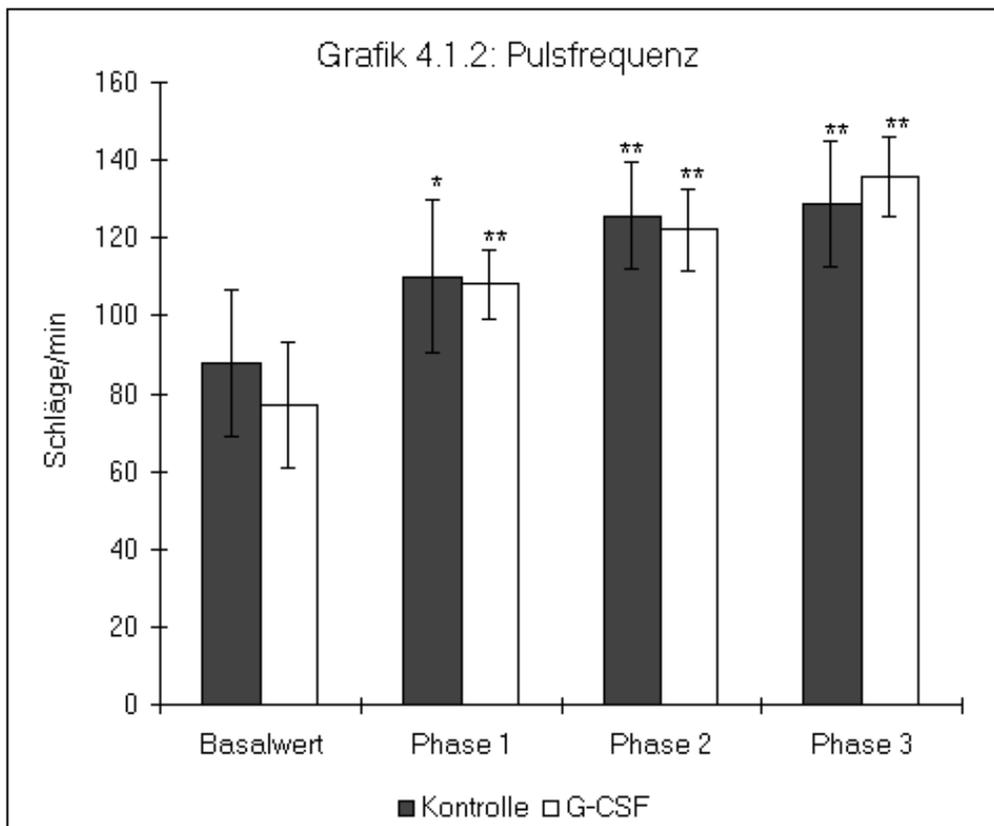
Anstieg der Körpertemperatur, diese versterben noch in der Initialphase nach 8 bzw. 9 Stunden. Bei zwei weiteren Kontrolltieren steigt die Temperatur nur moderat auf Werte von 39,6 bzw. 40,0°C zur Stunde 6 an.

Über die Zeitabschnitte gesehen hält sich die Körpertemperatur nahezu konstant bei Mittelwerten von 40,3 bis 41,1°C. Diese Werte sind hochsignifikant erhöht gegenüber den Ausgangswerten (in beiden Gruppen  $38,6 \pm 0,3^\circ\text{C}$ ).



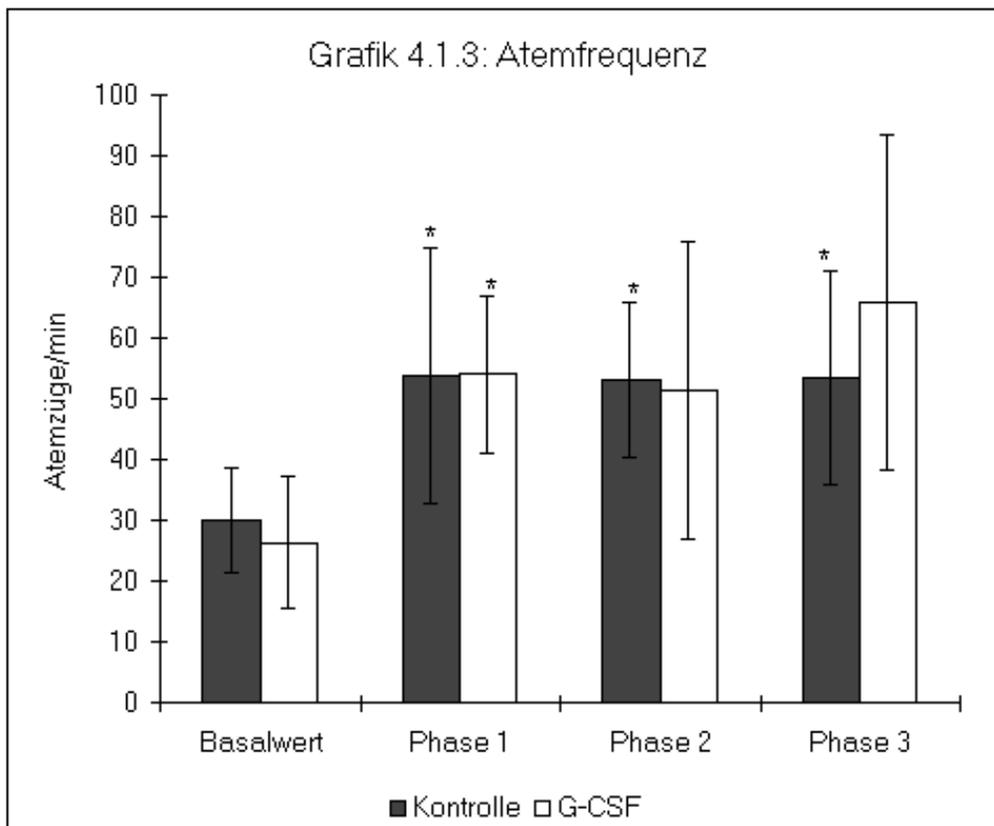
#### 4.1.2. Herzfrequenz

Ausgehend von einem Basalwert von  $88 \pm 19$  (Kontrolltiere) bzw.  $77 \pm 16$  (G-CSF) Schlägen pro Minute steigt die Herzfrequenz nach Infektion kontinuierlich bis zum Ende des Versuches an. Die Änderungen verlaufen in beiden Gruppen gleichsinnig und in der dritten Phase werden Mittelwerte von  $129 \pm 16$  (Kontrolle) und  $136 \pm 10$  (G-CSF) erreicht.



#### 4.1.3 Atemfrequenz

Der Ausgangswert der Atemfrequenz liegt bei  $30 \pm 9$  in der Kontrollgruppe und bei  $26 \pm 11$  Atemzüge pro Minute in der G-CSF-Gruppe. Die Atmung steigt initial schnell an und erreicht schon nach 2 Stunden ein Plateau. Dieses liegt über die gesamte Versuchsdauer etwa bei 53 /min mit erheblichen individuellen Schwankungen. Die G-CSF-Gruppe zeigt in der letzten Phase noch einen Anstieg der Atemfrequenz auf  $66 \pm 28$  /min. Tendenziell liegen die Respirationsfrequenzen in beiden Gruppen nach Sepsisinduktion im selben Plateaubereich. Unterschiede in den p-Werten und damit den Signifikanzen beruhen auf den individuellen Abweichungen und den Gruppengrößen.



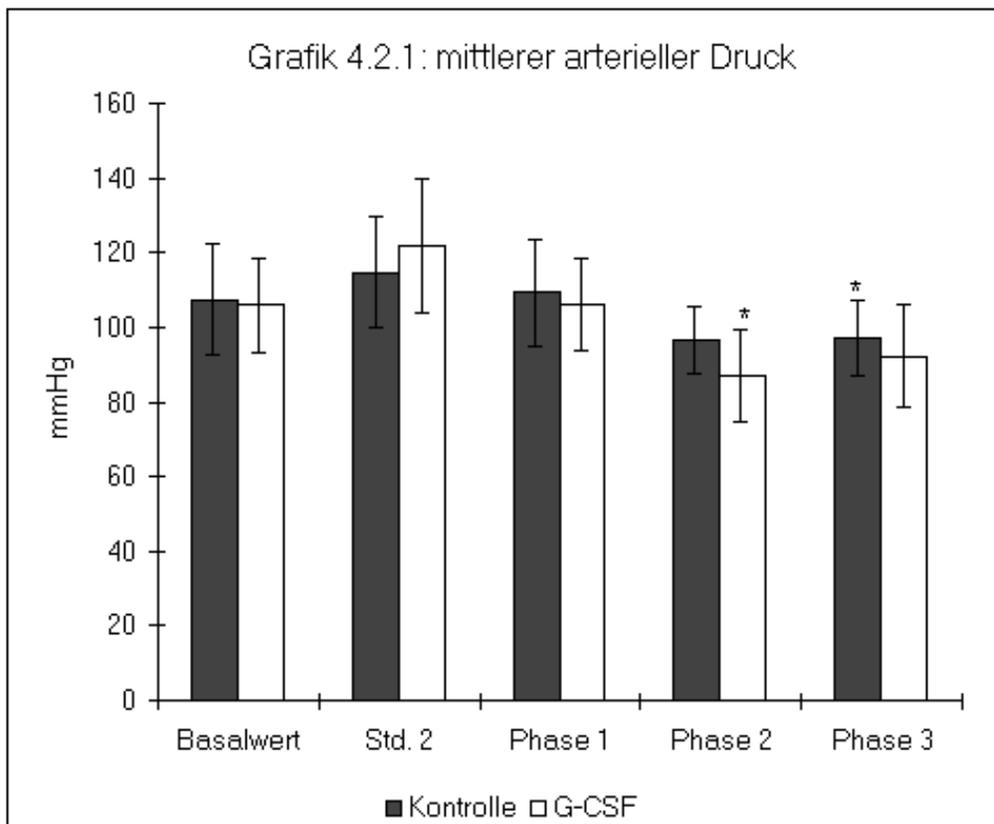
## 4.2 Ergebnisse der Druckmessungen

Bei den Ergebnissen der Druck- und der Hämodynamikmessungen ist zusätzlich zu den Basalwerten und den Werten der Phasen 1 bis 3 noch der Wert der stärksten Kreislaufbeeinträchtigung einheitlich zur Stunde 2 dargestellt.

### 4.2.1 Arterieller Druck

Der arterielle Druck, dargestellt als der arterielle Mitteldruck, hat einen Basalwert von  $108 \pm 15$  mmHg (Kontrolle) und  $106 \pm 13$  mmHg (G-CSF). Der Maximalwert des MAP wird zur Stunde 2 mit Werten von  $115 \pm 15$  mmHg in der Kontrollgruppe und  $122 \pm 18$  mmHg in der G-CSF-Gruppe erreicht. Im Verlauf des Krankheitsgeschehens sinkt der MAP unter den Ausgangswert ab. Die Werte der Phasen 2 und 3 unterscheiden sich dabei nicht wesentlich. Die G-CSF-Gruppe zeigt zur Phase 2 einen niedrigeren Wert als in der Phase 3 ( $87 \pm 12$  zu  $92 \pm 14$  mmHg). Die Kontrollgruppe bleibt bei 97 mmHg mit tendenziellem Abfall zum Ende der Versuchsperiode.

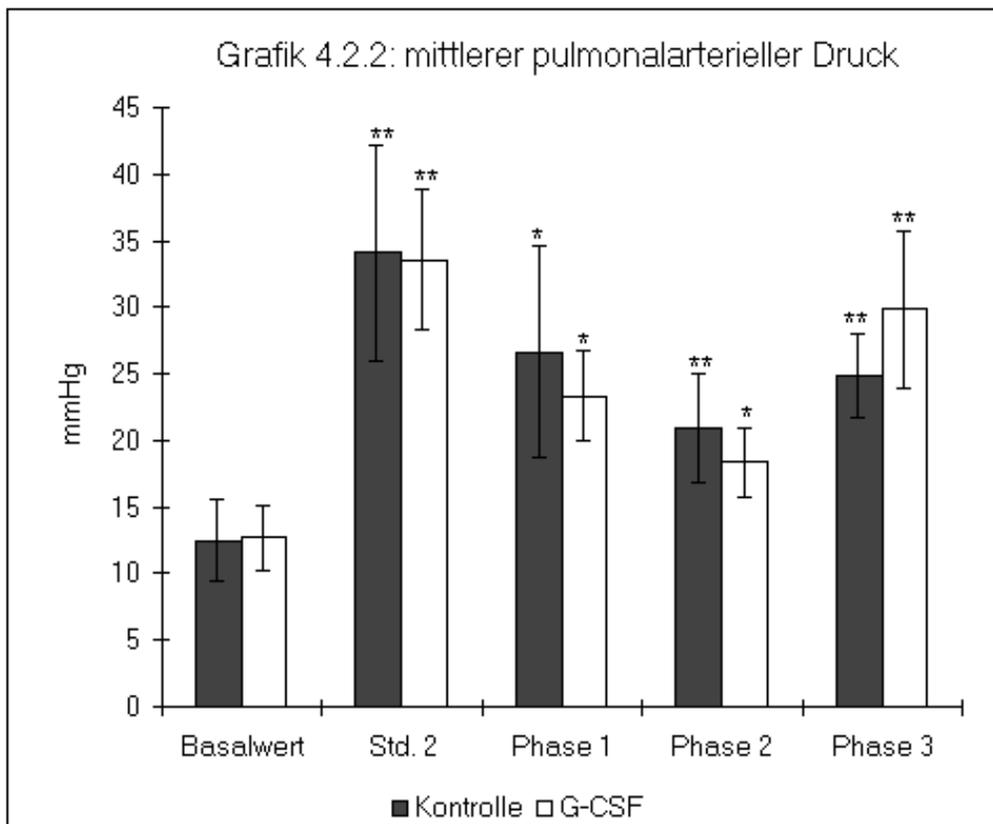
Grafik 4.2.1: mittlerer arterieller Druck



#### 4.2.2 Pulmonalarterieller Druck

Die Ausgangswerte liegen einheitlich bei 13 mmHg (Standardabweichung Kontrolle 3 mmHg, G-CSF-Gruppe 2 mmHg). Der mittlere pulmonalarteriellen Druck (MPAP) steigt initial sehr rasch auf den Peak zur Stunde 2 an. Die gemessenen Werte liegen hier bei  $34 \pm 8$  mmHg in der Kontrollgruppe und  $34 \pm 5$  mmHg in der G-CSF-Gruppe, das 2,5fache des Ausgangswertes. Der Mittelwert über die gesamte Phase 1 (bis zu 12. Stunde) liegt durch die niedrigen Werte zu Anfang und durch den Abfall nach Erreichen des Höchstwertes bei  $27 \pm 8$  mmHg (Kontrolle) und  $23 \pm 3$  mmHg (G-CSF). Die Erholung vom initialen Druckanstieg in der Lunge schreitet über die nächsten Tage (bis zur Stunde 60) fort, so daß der Mittelwert der Phase 2 sich bei  $21 \pm 4$  mmHg (Kontrolle) und  $18 \pm 3$  mmHg (G-CSF) einpendelt. Zum Ende des Versuchsablaufes steigt der arterielle Druck in der Lunge wieder deutlich an und erreicht einen Wert von  $25 \pm 3$  mmHg in der Kontrollgruppe und in der G-CSF-Gruppe  $30 \pm 6$  mmHg.

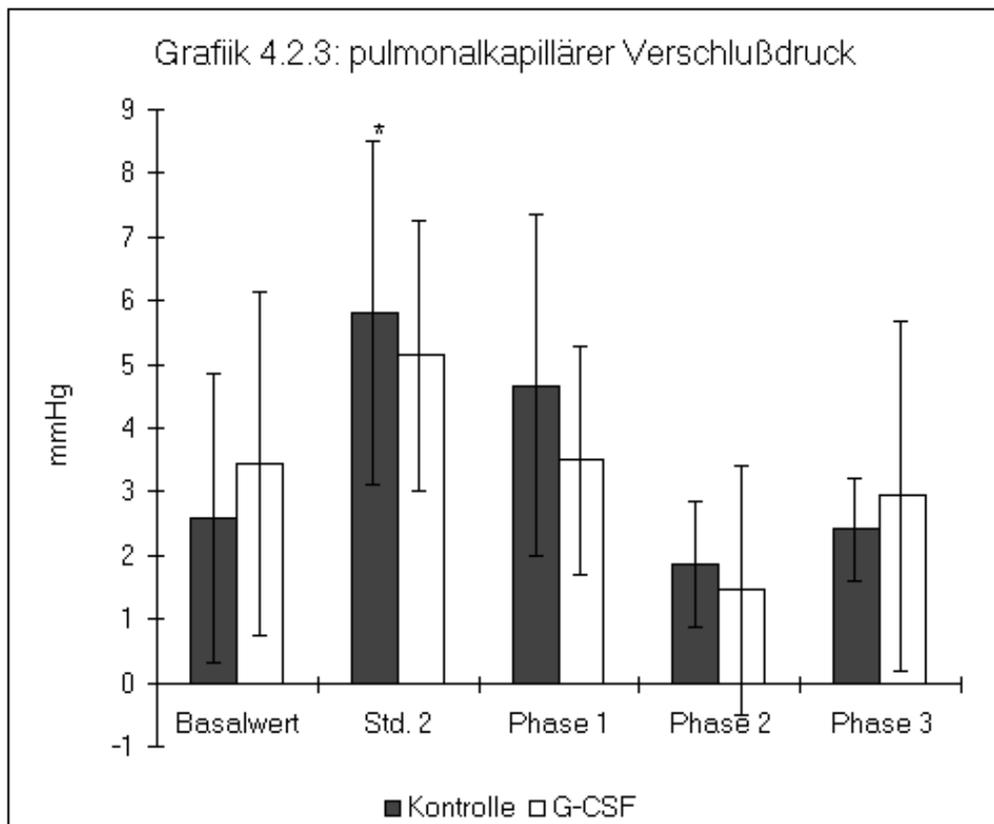
Grafik 4.2.2: mittlerer pulmonalarterieller Druck



#### 4.2.3 Pulmonalkapillärer Verschußdruck

Der Pulmonalarterienverschußdruck, auch als Wedge-Druck bezeichnet (PCWP) gilt als Maß für den Druck in den Lungenkapillaren und unter physiologischen Bedingungen reflektiert er den linksventrikulären und -atrialen (diastolisch) Druck. Sein Ausgangswert liegt in unserer Serie bei 3 mmHg mit Standardabweichungen von 2,3 bzw. 2,7 mmHg in der Kontroll- und G-CSF-Gruppe. Der Maximalwert liegt auch hier mit  $6 \pm 2,7$  mmHg (Kontrolle) und  $5 \pm 2,1$  mmHg (G-CSF) bei 2 Stunden nach Infektionsbeginn. Der Rückgang von diesem Peak hält über die Phase 1 und 2 an, wobei hier in der zweiten Phase der Ausgangswert in beiden Gruppen unterschritten wird. In der letzten Phase liegen die gemessenen Verschußdrücke wieder im Bereich der Basalwerte.

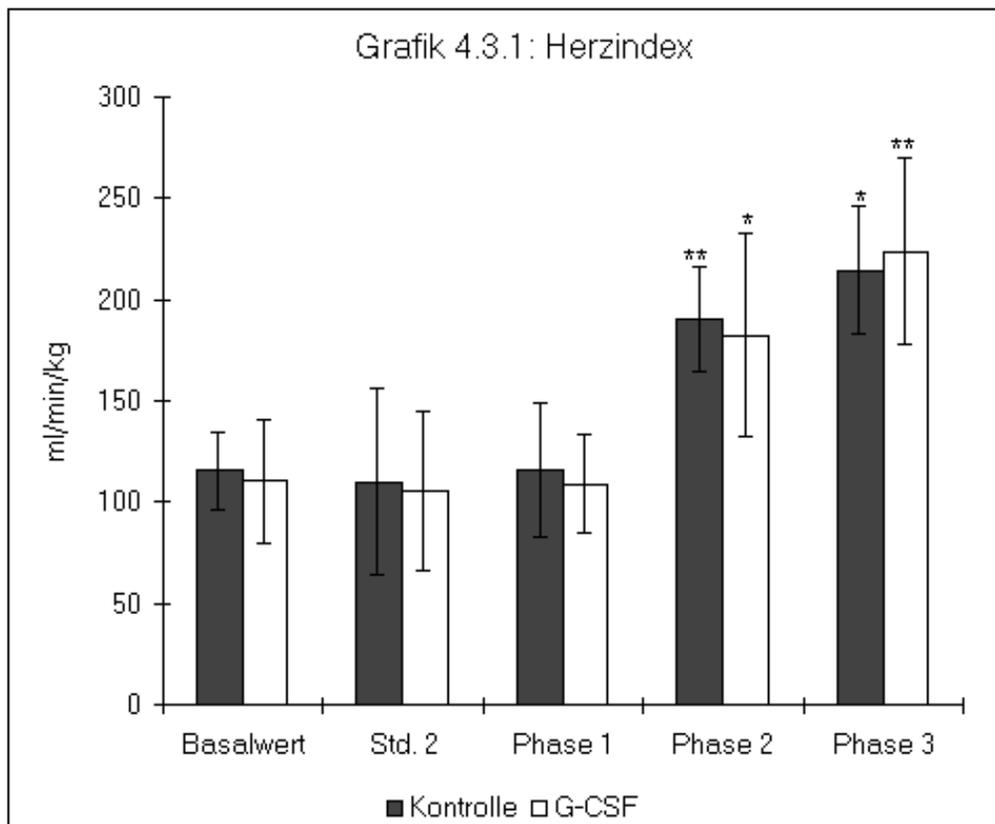
Grafik 4.2.3: pulmonalkapillärer Verschußdruck



### 4.3 Ergebnisse der hämodynamischen Kalkulationen

#### 4.3.1 Herzindex

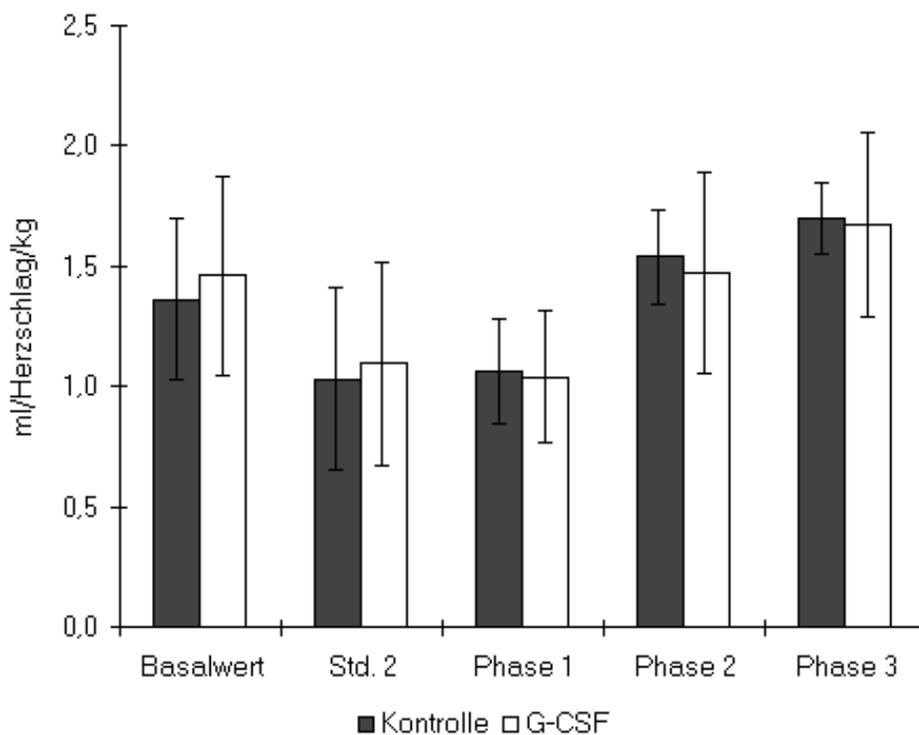
Um herzgrößenabhängige Schwankungen zu bereinigen, wurde das Herzzeitvolumen auf das Körpergewicht korrigiert. Die Ausgangswerte für den Herzindex (CI) liegen bei  $115 \pm 19$  l/min/kg in der Kontrollgruppe und bei  $110 \pm 30$  l/min/kg in der G-CSF-Gruppe. Entsprechend dem Herzzeitvolumen steigen die Werte erst in der zweiten Phase an und erreichen in der letzten Phase Werte von  $215 \pm 31$  l/min/kg bei den Kontrolltieren und  $224 \pm 46$  l/min/kg bei den G-CSF-Tieren.



#### 4.3.2 Schlagvolumenindex

Um auch hier tiergrößenbedingte Fehler zu vermeiden, wurde das Schlagvolumen nur als körperrgewichtbezogener Index berechnet. Der Schlagvolumenindex (SVI) fällt initial rasch von seinen Ausgangswerten ( $1,4 \pm 0,3$  ml/Herzschlag/kg in der Kontrollgruppe bzw.  $1,5 \pm 0,4$  ml/Herzschlag/kg (G-CSF-Gruppe)) auf ca. 73 % des Ausgangswertes ab. Dieser Mittelwert von  $1,1$  ml/Herzschlag/kg hält über die gesamte erste Phase an. In der zweiten Phase übersteigt der Schlagvolumenindex mit  $1,5 \pm 0,2$  ml/Herzschlag/kg in der Kontrollgruppe und  $1,5 \pm 0,4$  ml/Herzschlag/kg in der G-CSF-Gruppe den Basalwert und erreicht in der Phase 3 einen Höchstwert von  $1,7 \pm 0,1$  ml/Herzschlag/kg bei den Kontrolltieren und  $1,7 \pm 0,4$  ml/Herzschlag/kg bei den G-CSF-Tieren.

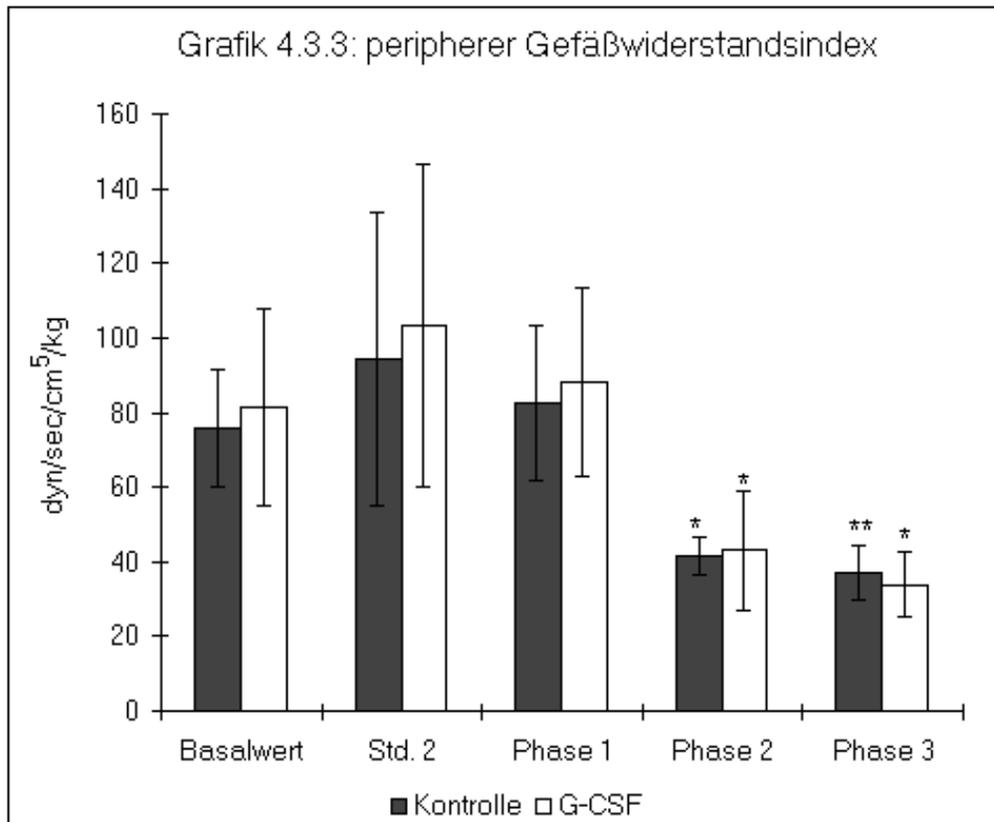
Grafik 4.3.2: Schlagvolumenindex



### 4.3.3 Peripherer Gefäßwiderstandsindex

Der systemische Widerstandsindex (SVRI) steigt initial deutlich an und erreicht ausgehend von  $76 \pm 16$  dyn/sec/cm<sup>5</sup>/kg (Kontrolle) bzw.  $81 \pm 26$  dyn/sec/cm<sup>5</sup>/kg (G-CSF-Gruppe) einen Höchstwert zur Stunde 2 von  $94 \pm 39$  dyn/sec/cm<sup>5</sup>/kg in der Kontrollgruppe und  $103 \pm 43$  dyn/sec/cm<sup>5</sup>/kg in der G-CSF-Gruppe. Danach sinkt der Gefäßwiderstand rasch wieder ab, so daß er in der Phase 1 im Bereich des Ausgangswertes bleibt und in den Phasen 2 und 3 bis unter die Hälfte dieses Wertes abfällt. Die Unterschiede zum Ausgangswert sind in den letzten Phasen so deutlich, daß die Werte eine Signifikanz (G-CSF in der Phase 3) bzw. eine hohe Signifikanz der Kontrollgruppe in der zweiten und dritten Phase erreichen.

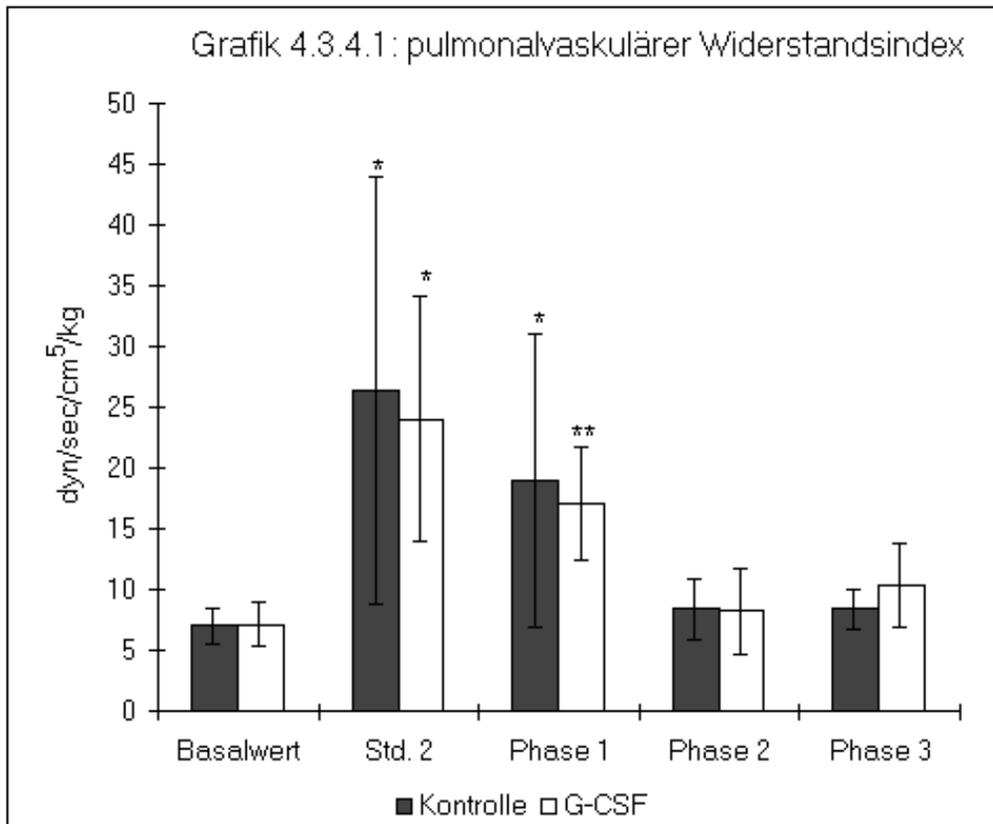
Grafik 4.3.3: peripherer Gefäßwiderstandsindex



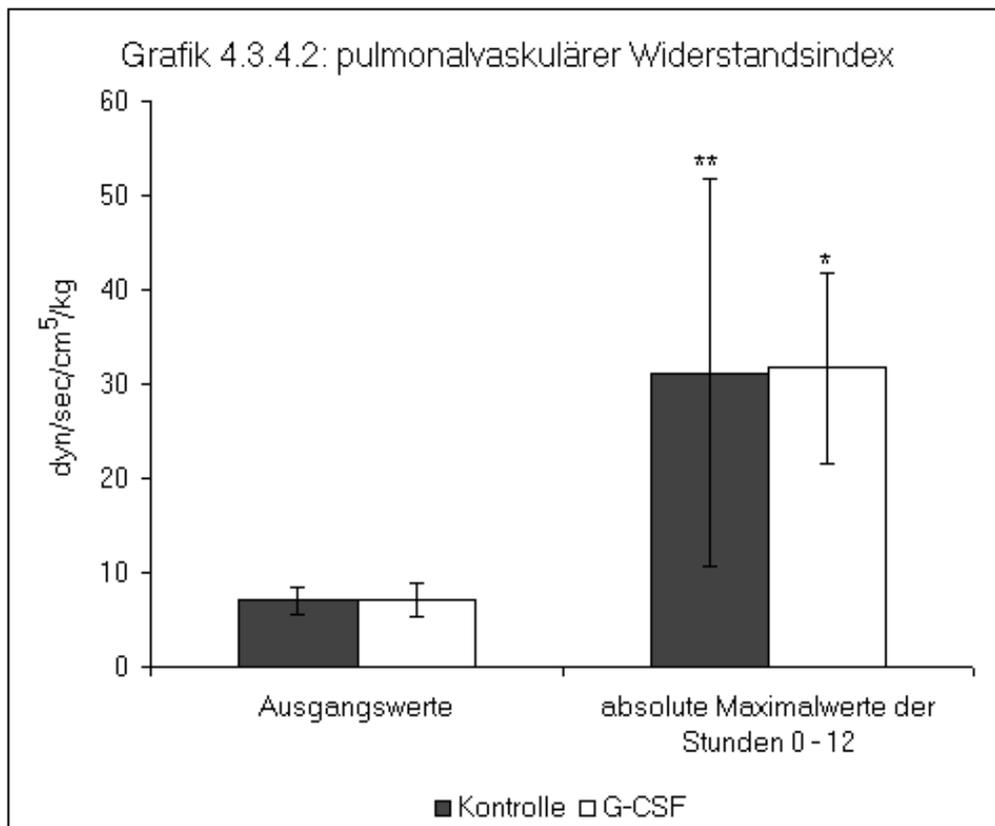
#### 4.3.4 Pulmonalvaskulärer Widerstandsindex

Die Bezugswerte des Lungenwiderstandsindex (PVRI) liegen einheitlich bei 7 dyn/sec/cm<sup>5</sup>/kg (Standardabweichungen 1,4 dyn/sec/cm<sup>5</sup>/kg in der Kontrollgruppe und 1,8 dyn/sec/cm<sup>5</sup>/kg in der G-CSF-Gruppe). Auch hier liegt der Maximalwert bei der zweiten Stunde *post infectionem* ( $26 \pm 17,5$  dyn/sec/cm<sup>5</sup>/kg in der Kontrollgruppe und  $24 \pm 10,1$  dyn/sec/cm<sup>5</sup>/kg bei den G-CSF-Tieren). Der Abfall nach diesem initialen Peak ist ebenso rasch wie beim systemischen Widerstand, und erreicht das Niveau der Ausgangswerte in den letzten beiden Phasen.

Grafik 4.3.4.1: pulmonalvaskulärer Widerstandsindex



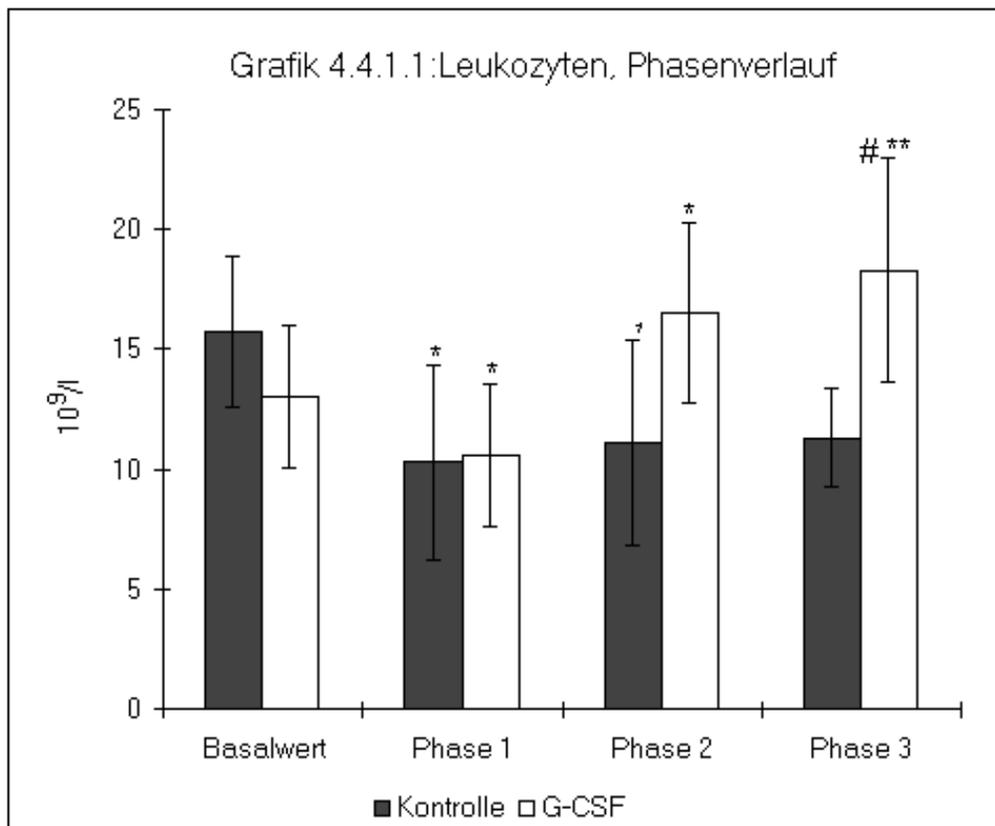
Um die maximale Lungenbeeinträchtigung in der initialen Phase zu verdeutlichen, wurden im folgenden Diagramm die absoluten Maximalwerte des pulmonalen Widerstandes der einzelnen Tiere aus den ersten 12 Stunden aufaddiert und neben den Ausgangswerten dargestellt. Die Maximalwerte liegen meist zum Zeitpunkt der 3-Stunden-Messung. In beiden Gruppen ist der Unterschied zum Ausgangswert hochsignifikant. Trotz deutlich höherem Maximalwert bleibt der pulmonale Widerstandsindex der G-CSF-Gruppe über der Signifikanzgrenze ( $p > 0,05$ ) gegenüber dem Maximalwert der Kontrollgruppe.



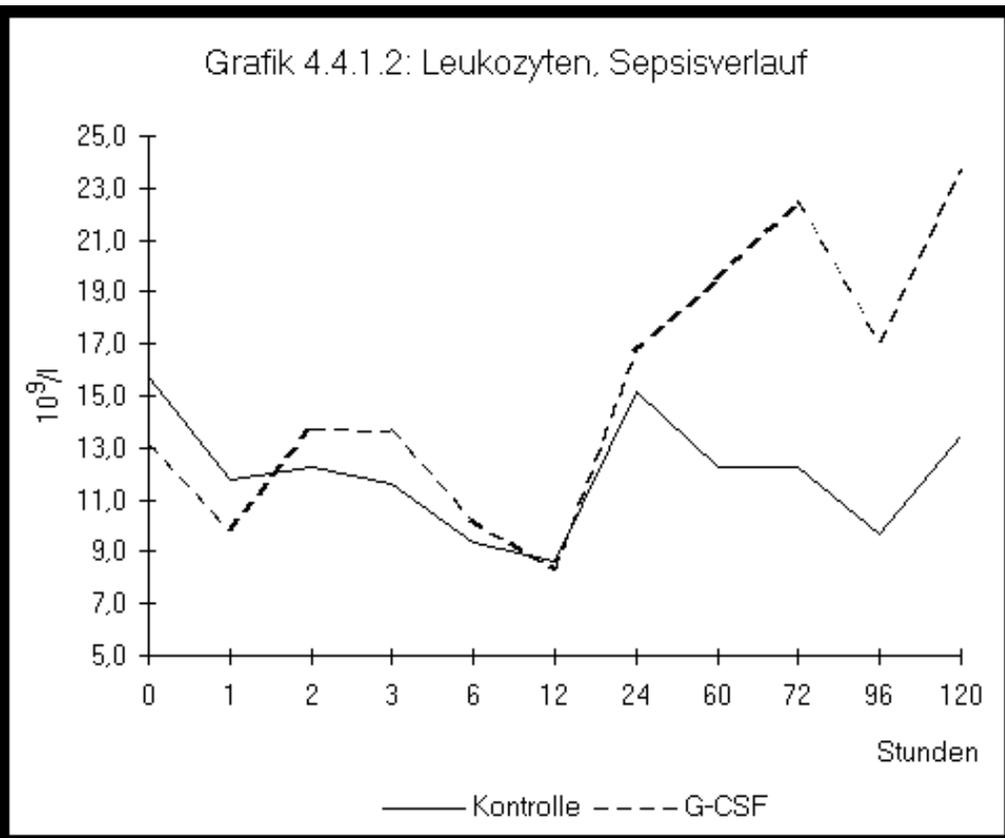
## 4.4 Ergebnisse der Blutbildbestimmungen

### 4.4.1 Leukozyten

Von nicht signifikant unterschiedlichen Basalwerten ausgehend ( $15,7 \pm 3,2 \times 10^9/l$  bei den Kontrolltieren und  $13,0 \pm 3,0 \times 10^9/l$  in der G-CSF-Gruppe) zeigt sich in der Kontrollgruppe eine deutliche Leukopenie in der ersten initialen Phase. Der Leukozytensturz in der G-CSF-Gruppe ist aufgrund des niedrigeren Ausgangswertes nicht signifikant. Die Kontrollgruppe bleibt auf diesem niedrigen Niveau von 10 bis  $11 \times 10^9$  Leukozyten/l. Die G-CSF-Gruppe erholt sich unter der Therapie von dem Leukozytensturz in der zweiten Phase und übersteigt in der dritten Phase deutlich den Ausgangswert ( $18,3 \pm 4,6 \times 10^9/l$ ,  $p = 0,001$ ). Die Unterschiede zwischen den Gruppen ist in dieser letzten Phase signifikant ( $p = 0,007$ ).

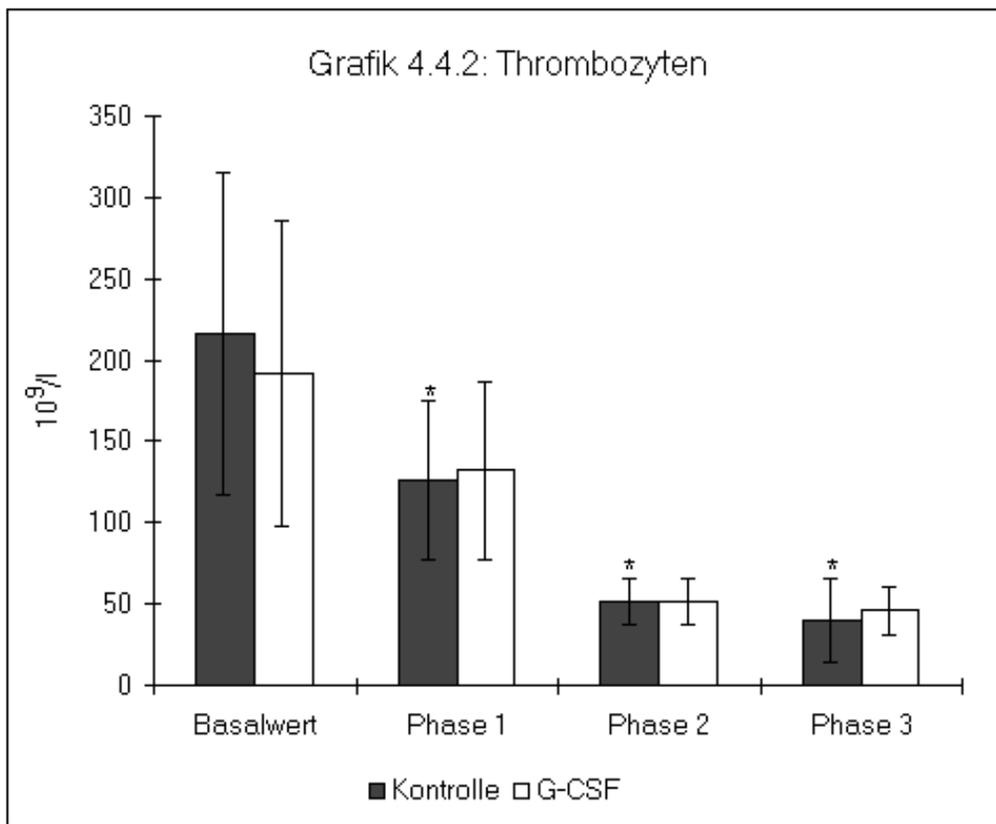


In der folgenden Darstellung sind zur Verdeutlichung des Verlaufes die Kurven der Leukozyten der beiden Gruppen in der Sepsis aufgezeichnet. Wie zu erkennen, zeigen beide Gruppen den initialen Leukozytensturz, welcher von der 6. zur 12. Stunde besonders stark ausgeprägt ist. Die Minimalwerte (12 Stunden-Wert) liegen bei  $8,6 \pm 6,0 \times 10^9/l$  in der Kontrollgruppe und bei  $8,3 \pm 4,0 \times 10^9/l$  in der G-CSF-Gruppe. Zur 120. Stunde *post infectionem* haben die Kontrolltiere eine Leukozytenzahl von  $13,5 \pm 5,0 \times 10^9/l$  und die G-CSF-Tiere von  $23,6 \pm 11,7 \times 10^9/l$ .



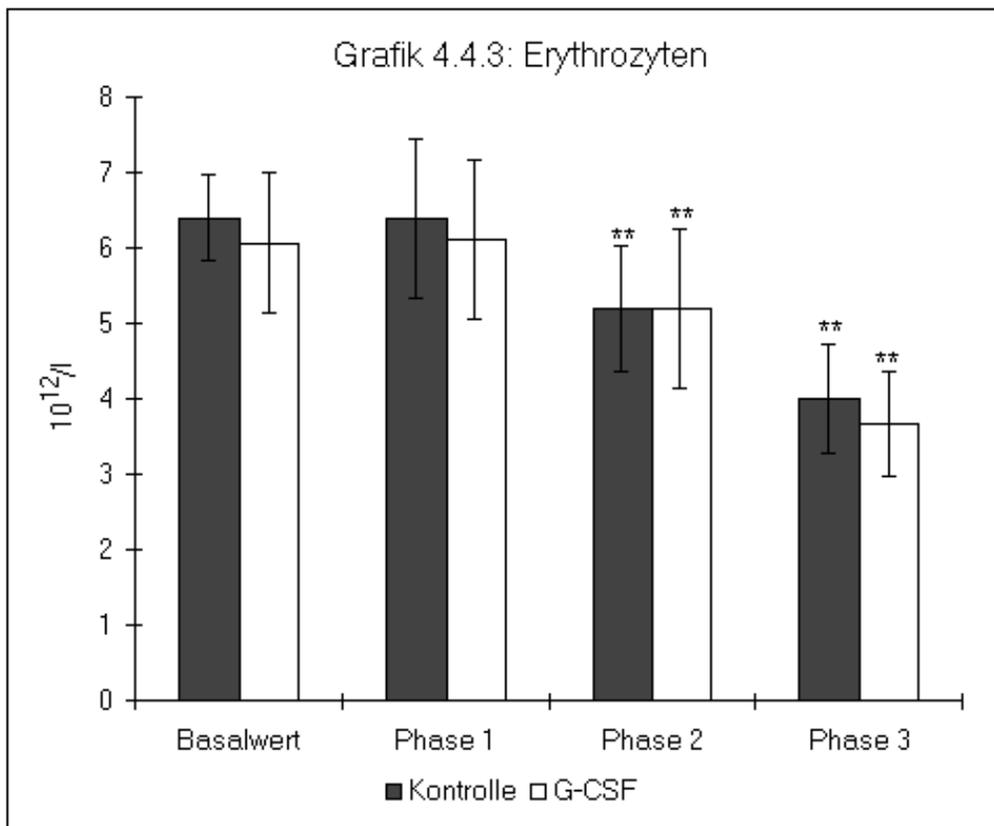
#### 4.4.2 Thrombozyten

Die zirkulierenden Thrombozyten fallen von ihrem Ausgangswerten von  $216 \pm 100 \times 10^9/l$  der Kontrollgruppe und  $192 \pm 94 \times 10^9/l$  der G-CSF-Gruppe schon in der initialen Phase ab und erreichen in den beiden folgenden Phasen Werte um  $50 \times 10^9/l$ .



#### 4.4.3 Erythrozyten

Die roten Blutkörperchen fallen erst in der zweiten Phase von ihren Ausgangswerten ab. In der dritten Phase liegen die Zahlen bei  $4,0 \pm 0,7 \times 10^{12}/l$  in der Kontrollgruppe und  $3,7 \pm 0,7 \times 10^{12}/l$  in der G-CSF-Gruppe und damit hochsignifikant unter den Anfangswerten.



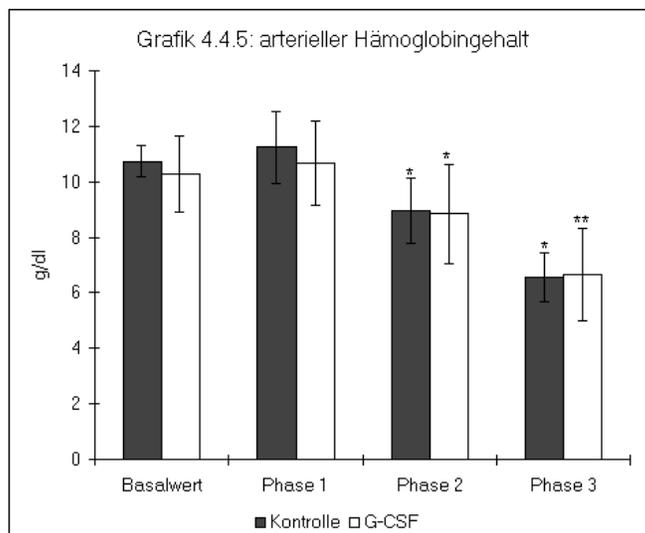
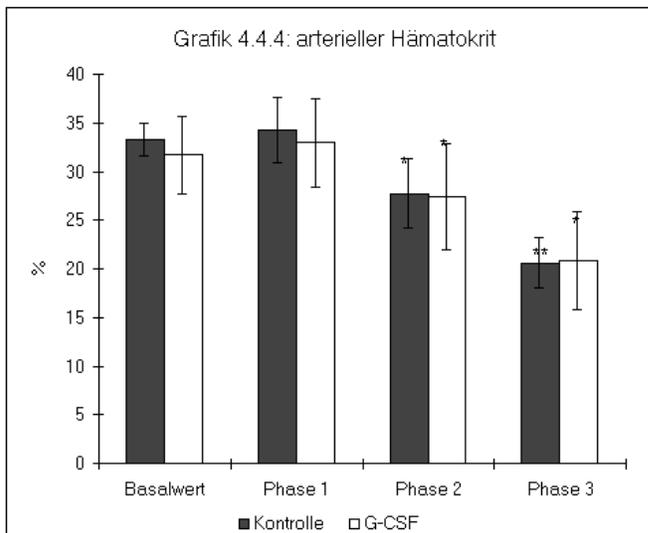
#### 4.4.4 Hämatokrit

Der Hämatokrit fällt kontinuierlich nach einem kurzen Anstieg innerhalb der ersten Stunden ab. Die Ausgangswerte liegen in einem Bereich von etwa 30 bis 35 %, während die finalen Werte auf etwa 20 % absinken.

#### 4.4.5 Hämoglobingehalt

Identisch mit den Erythrozyten und dem Hämatokrit verläuft auch der Hämoglobinspiegel im arteriellen Blut. Er fällt innerhalb der Versuchsphase von  $10,7 \pm 0,6$  g/dl (Kontrolle) bzw.  $10,3 \pm 1,4$  g/dl (G-CSF-Gruppe) auf Werte von  $6,5 \pm 0,9$  g/dl bzw.

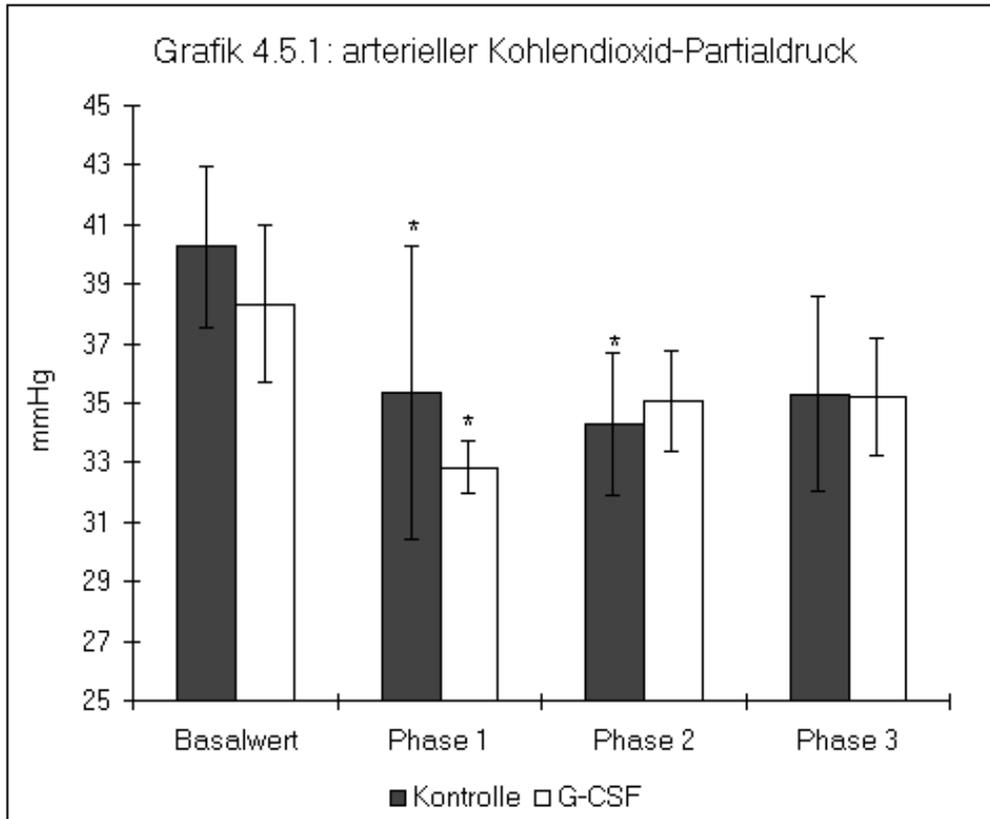
$6,6 \pm 1,7$  g/dl ab. Wie auch in den beiden anderen Parametern des roten Blutbildes liegen die Werte der dritten Phase hochsignifikant unter den Basalwerten.



## 4.5 Ausgewählte Ergebnisse der arteriellen Blutgasbestimmungen

### 4.5.1 Kohlendioxid-Partialdruck

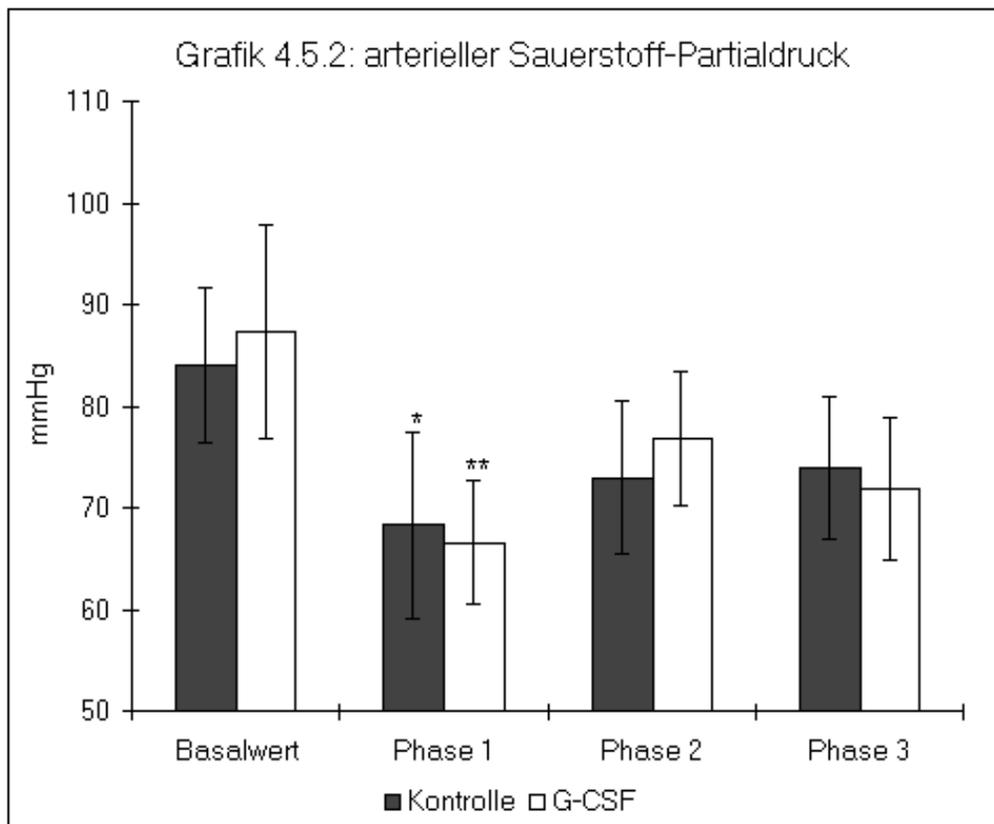
Der Kohlendioxid-Partialdruck ( $p\text{CO}_2$ ) liegt vor Versuchsbeginn in der Kontrollgruppe bei  $40,3 \pm 2,7$  mmHg und in der G-CSF-Gruppe bei  $38,3 \pm 2,7$  mmHg. Die Werte stabilisieren sich nach einem initialen Abfall auf  $35,4 \pm 4,9$  mmHg (Kontrolle) und  $32,9 \pm 0,9$  mmHg (G-CSF) bei Partialdruck-Werten um 35 mmHg.



### 4.5.2 Sauerstoff-Partialdruck

Der basale Wert des Sauerstoff-Partialdrucks ( $p\text{O}_2$ ) liegt bei  $84,0 \pm 7,5$  mmHg in der Kontrollgruppe und bei  $87,3 \pm 10,5$  mmHg in der G-CSF-Therapiegruppe. Der stärkste Abfall im Bezug zu den Ausgangswerten besteht über die Phase 1. Hier liegen die gemessenen Werte bei  $68,3 \pm 9,2$  mmHg (Kontrolle) bzw.  $66,6 \pm 6,1$  mmHg (G-CSF-Gruppe). Der  $p\text{O}_2$  erholt sich von dieser initialen Insuffizienz geringfügig über die folgenden Phasen in beiden Gruppen.

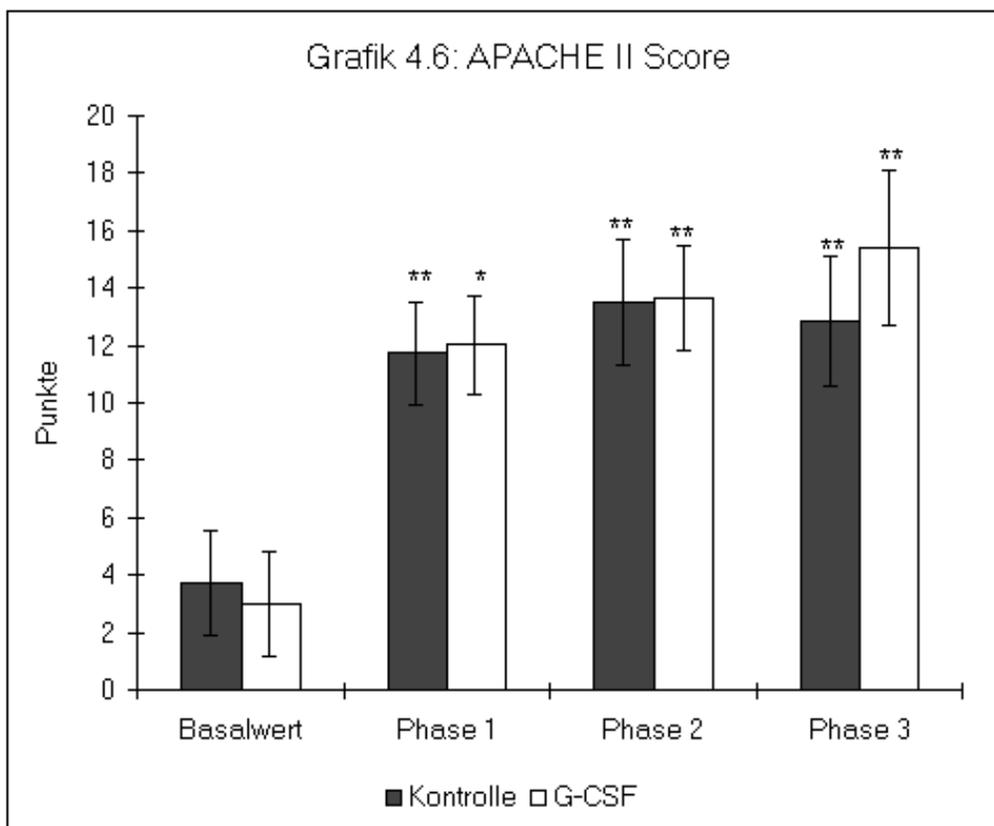
Grafik 4.5.2: arterieller Sauerstoff-Partialdruck



#### 4.6 Ermittelter modifizierter APACHE II Score

Der APACHE II Score weist zu Zeitpunkt ohne Infektion keinen Nullwert auf, sondern liegt in der Kontrollgruppe bei  $4 \pm 2$  Punkten und in der G-CSF-Therapiegruppe bei  $3 \pm 2$  Punkten. Nach Versuchsbeginn steigt der Score-Wert deutlich an. Er hält sich über alle drei Phasen im Bereich von etwa 12 bis 15 Punkten. Maximal werden bei einzelnen Tieren bis 27 Punkten in der finalen Phase vergeben.

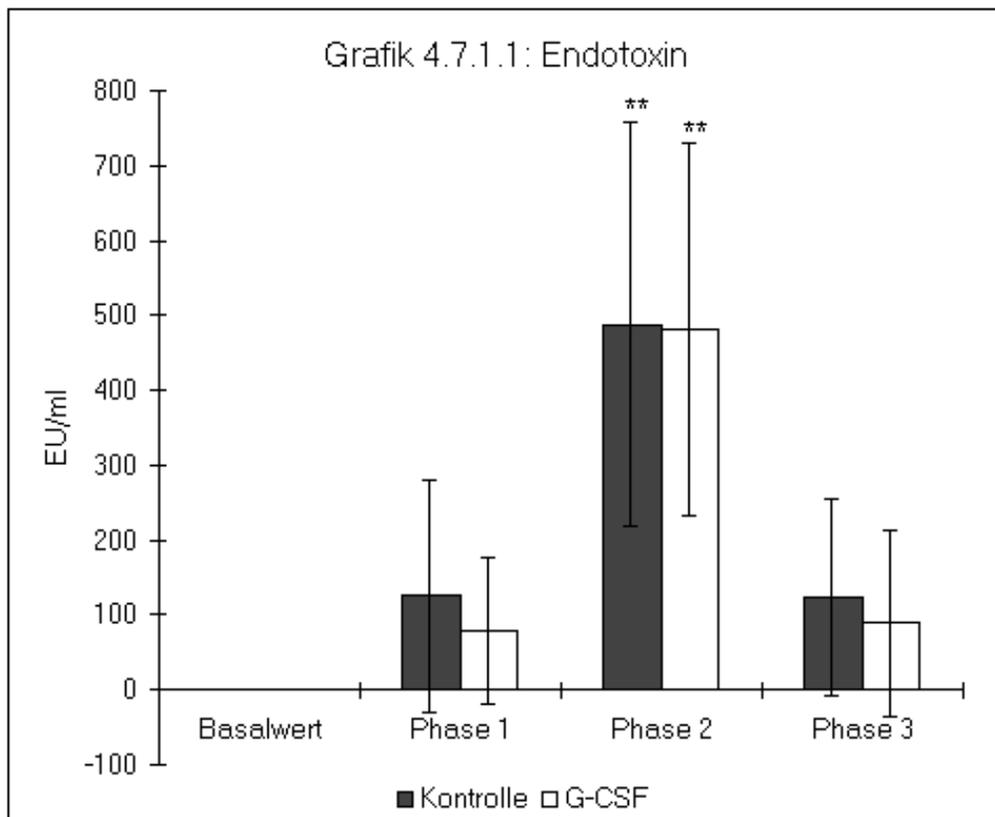
Grafik 4.6: APACHE II Score



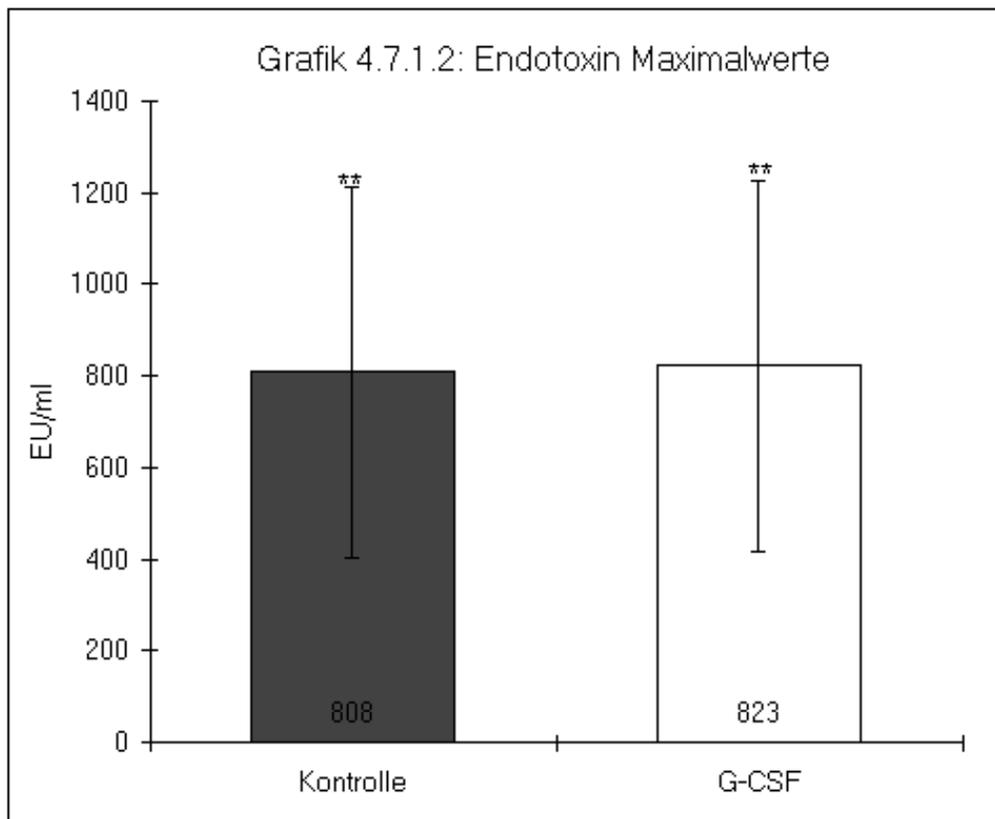
## 4.7 Laborbestimmungen

### 4.7.1 Endotoxin

In beiden Gruppen ist zu Beginn des Versuches kein Endotoxin im Serum nachweisbar. In der ersten Phase steigt die Konzentration an ( $126 \pm 155,0$  EU/ml in der Kontrolle,  $79 \pm 98,6$  EU/ml in der G-CSF-Gruppe), erreicht innerhalb der zweiten Phase den Maximalwert (gemessen zur Stunde 24 oder 48, s. S. \*) und fällt danach rasch wieder ab. Die Endotoxin-Plasmagehalte der Phase 2 sind in beiden Gruppen hochsignifikant erhöht gegenüber den Ausgangswerten. In der letzten Phase liegen die Werte im Bereich der Initialphasenwerte.



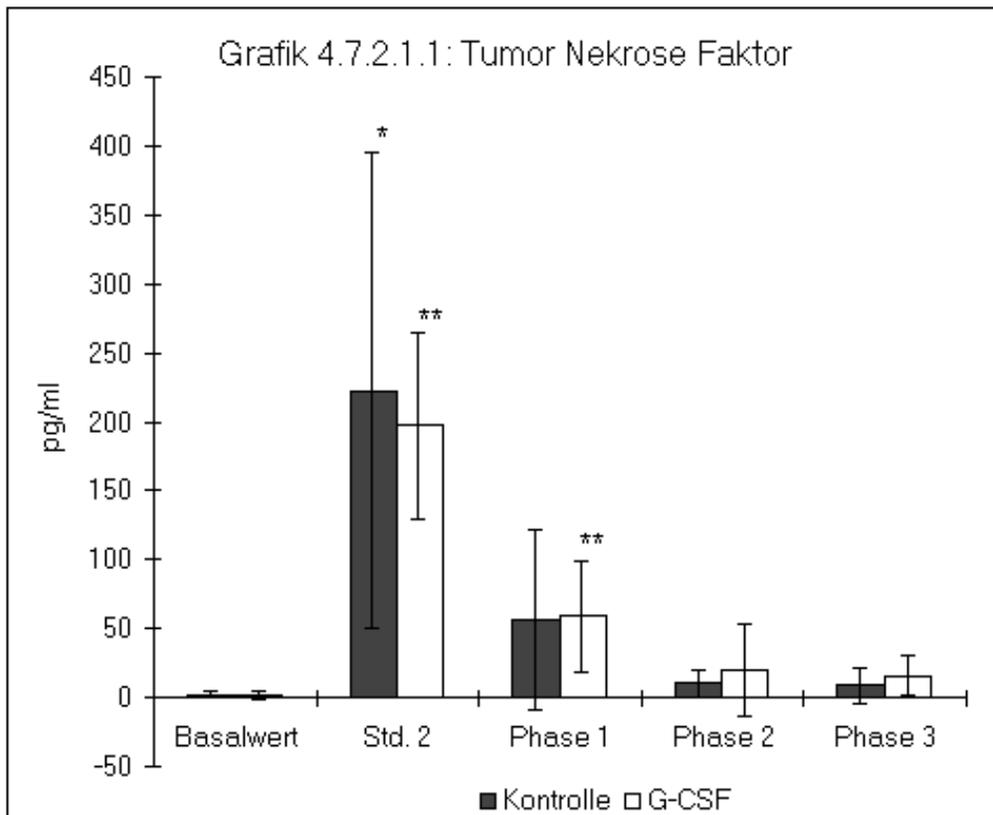
Im folgenden Schaubild sind die Endotoxin-Maximalwerte der beiden Gruppen aufgetragen. Ermittelt wurden sie aus den Stunden 0 bis 120. Die absoluten Maximalwerte der einzelnen Tiere liegen in unserem Meß- und Bestimmungsregime zu den Stunden 24 oder 48 und sind gegenüber den Ausgangswerten der jeweiligen Gruppen hochsignifikant. Zwischen den Gruppen ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.



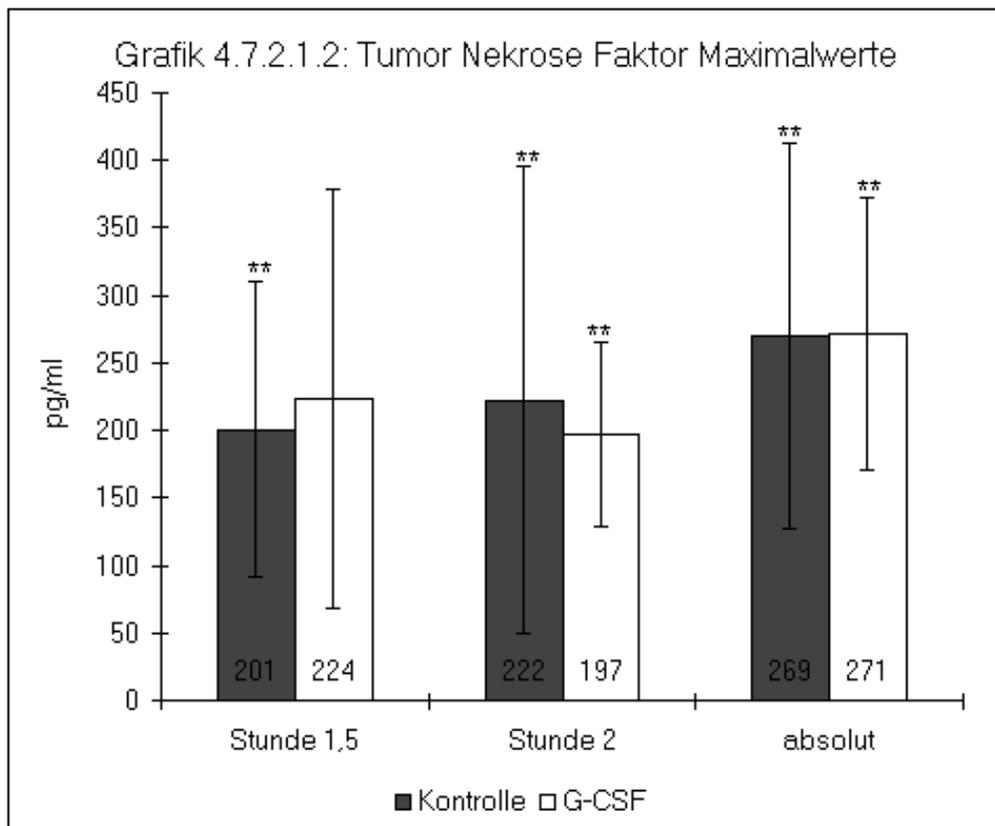
## 4.7.2 Ergebnisse der Mediatorenbestimmungen

### 4.7.2.1 Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$

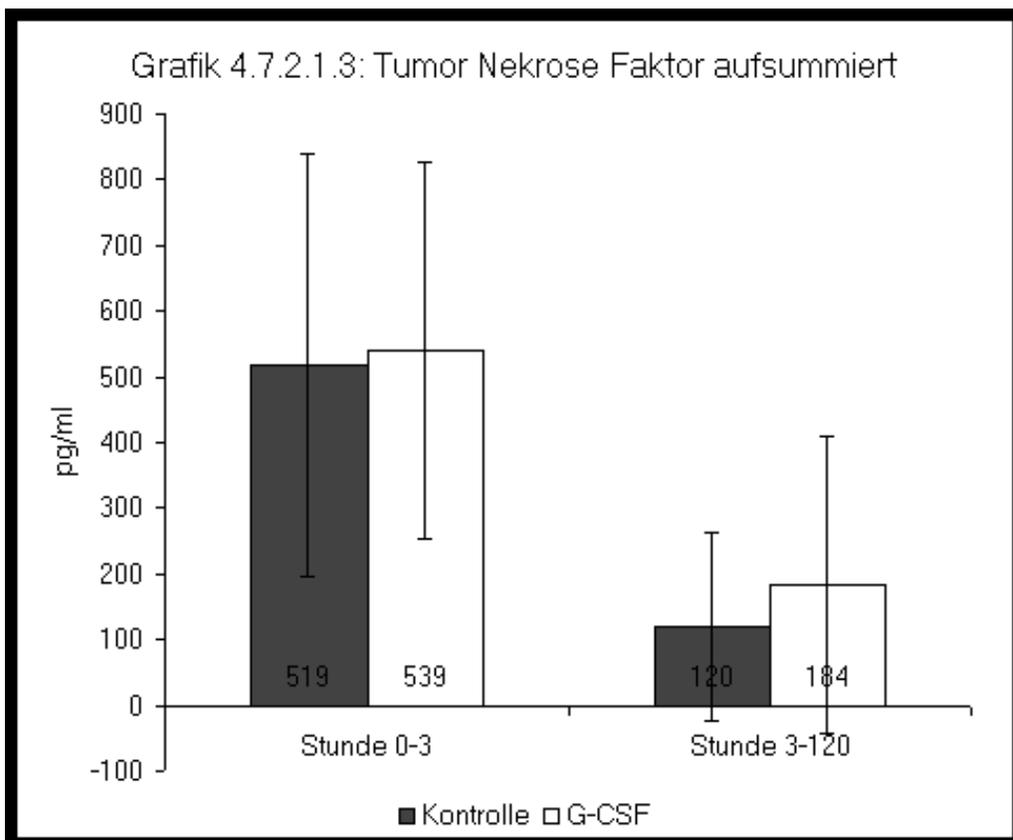
Im gesunden Tier (Basalwert) waren nur sehr geringe TNF- $\alpha$  -Konzentrationen von  $2,0 \pm 2,47$  pg/ml in der Kontrollgruppe und  $1,6 \pm 2,81$  pg/ml in der G-CSF-Gruppe nachzuweisen. Hier sind, zum Vergleich mit den 2 Stunden-Werten der Druck- und Hämodynamikbestimmungen die Werte zur Stunde 2 dargestellt. In der Kontrollgruppe liegen sie bei  $222,4 \pm 172,61$  pg/ml und in der G-CSF-Gruppe bei  $197,2 \pm 67,74$  pg/ml. Nach diesem initialen TNF-Peak fällt der Plasma-Gehalt rasch wieder ab, so daß er im Schnitt über die ersten 2 Stunden  $56,3 \pm 64,86$  pg/ml in der Kontrollgruppe und  $58,7 \pm 40,53$  pg/ml in der G-CSF-Gruppe erreicht. Über die folgenden Stunden und Tage fällt der Level weiter ab.



Im folgenden Schaubild sind die TNF- $\alpha$  -Maximalwerte der Stunden 1,5 und 2 noch einmal dargestellt. In der dritten Kategorie sind die absoluten Maximalwerte unabhängig vom Zeitpunkt aufgetragen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind auch hier nicht signifikant. Gegenüber dem Ausgangswert zur Stunde 0 sind alle Werte mit Ausnahme der Stunde 1,5 der G-CSF-Gruppe hochsignifikant angestiegen.

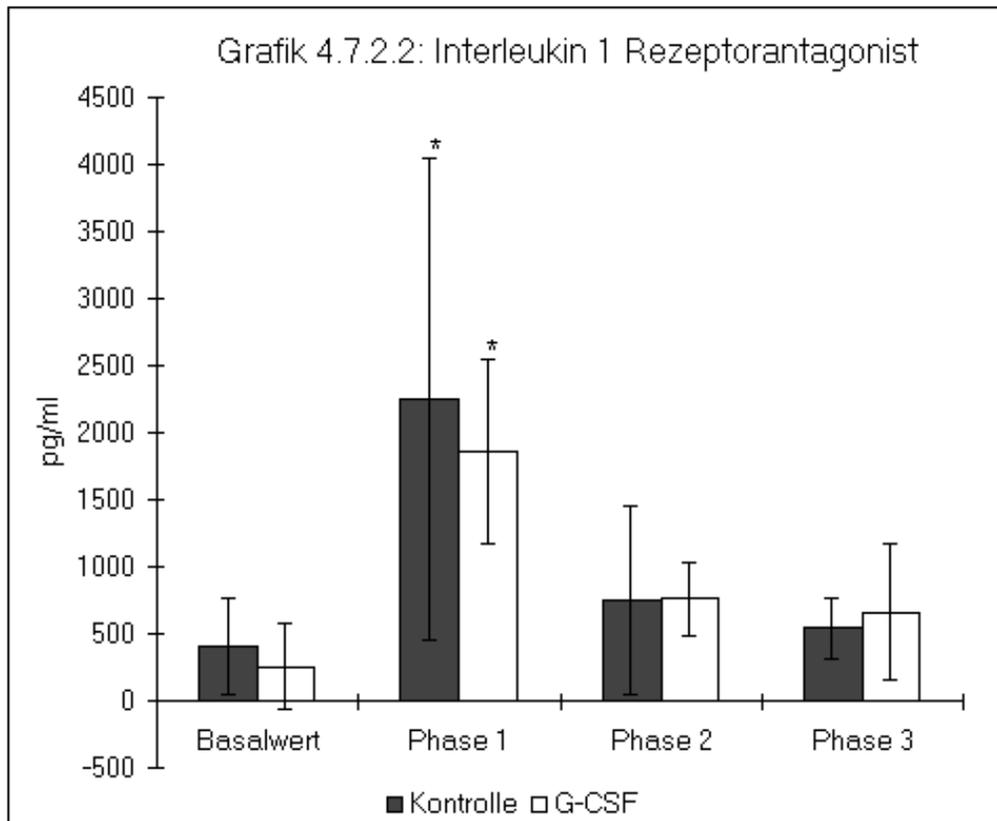


Die folgende Darstellung zeigt die freigesetzte TNF- $\alpha$  -Gesamtmenge über die ersten drei Stunden sowie über die folgende Beobachtungszeit (120 Stunden). Die p-Werte für die Unterschiede zwischen den Gruppen liegen im T-Test bei 0,89 (Summe Stunde 0-3) bzw. 0,49 (Summe Stunde 3-120), somit besteht kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und G-CSF-Gruppe.

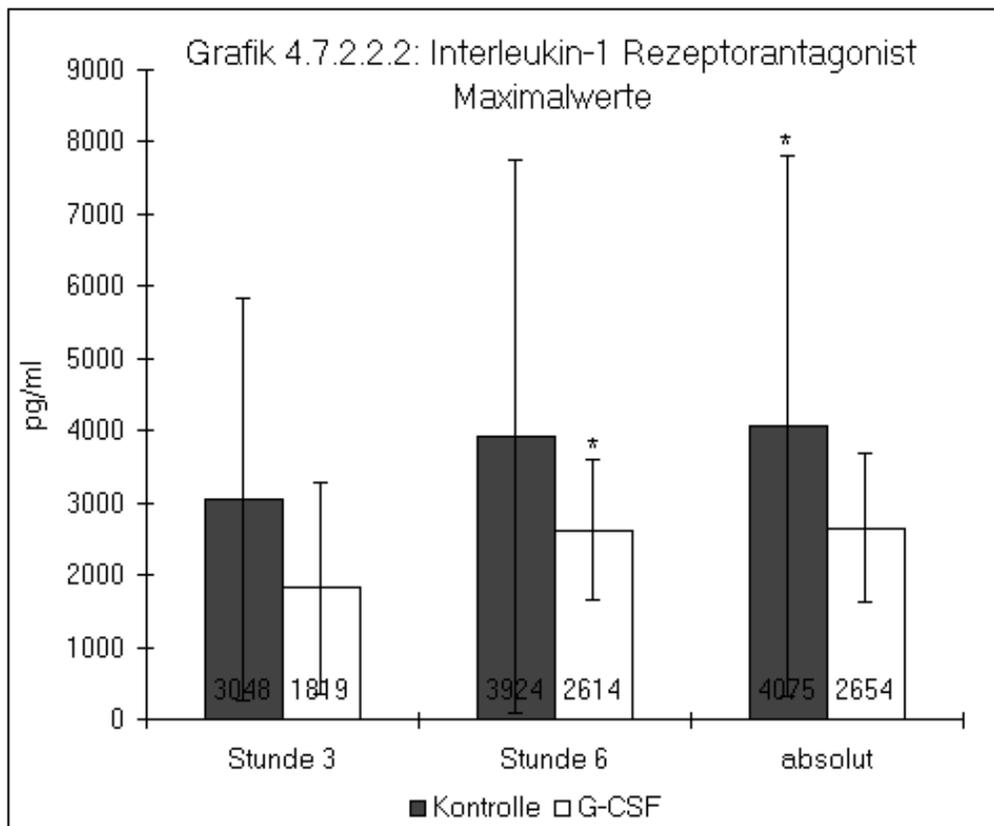


#### 4.7.2.2 Interleukin-1 Rezeptorantagonist

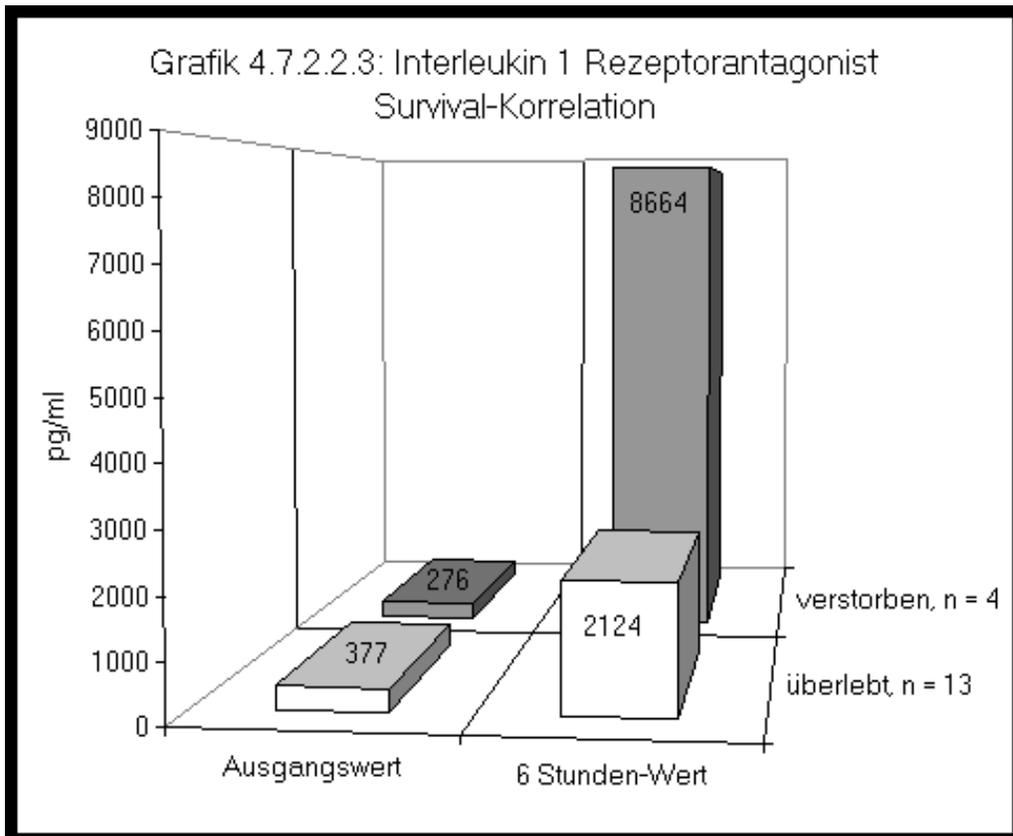
Der Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) hat Basalwerte in den Tieren von  $402 \pm 359$  pg/ml (Kontrolle) bzw.  $257 \pm 319$  pg/ml Plasma in der G-CSF-Gruppe. Nach sechs Stunden erreicht er Höchstwerte im Plasma von  $3924 \pm 3827$  pg/ml in der Kontrollgruppe und  $2614 \pm 973$  pg/ml in der G-CSF-Gruppe. Über die 12. Stunde hinaus fällt der IL-1ra-Gehalt wieder deutlich ab, liegt aber dennoch weiter bei etwa dem 1,5 bis 2fachen des Ausgangswertes.



Auch hier folgt eine Darstellung der absoluten Maximalwerte. Aufgrund erheblicher Streuungen insbesondere in der Kontrollgruppe zeigen sich hier keine statistischen Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Vergleich zum Ausgangswert ( $402 \pm 359$  pg/ml (Kontrolle) bzw.  $257 \pm 319$  pg/ml in der G-CSF-Gruppe) sind nur die Werte zur Stunde 6 in der G-CSF-Gruppe signifikant erhöht, während in der Kontrollgruppe nur die zusammengefaßten Werte signifikant vom Basalwert abweichen.

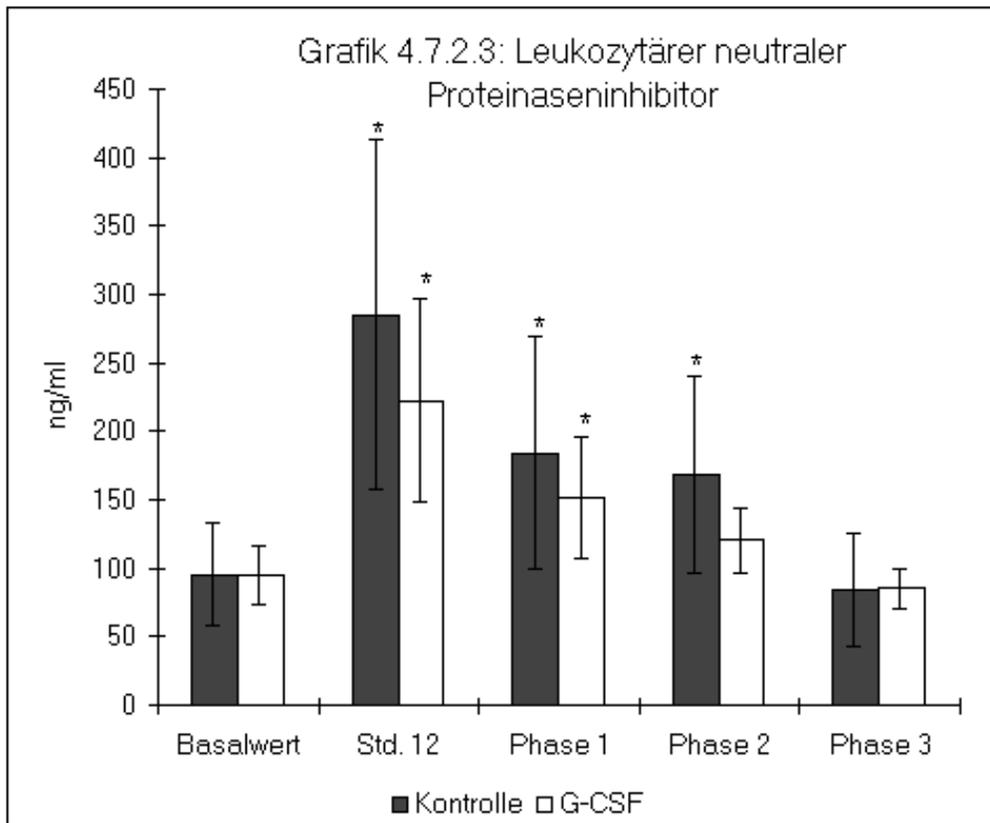


Unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit zeigt sich, daß Tiere, welche früh versterben (innerhalb der ersten 66 Stunden: 4 Tiere) eine IL-1ra-Konzentration zur Stunde 6 von  $8664 \pm 2403$  pg/ml aufweisen. Wohingegen Tiere, welche bis in die letzten Stunden überleben (13 Tiere), einen 6 Stunden-Durchschnittswert von  $2124 \pm 878$  pg/ml haben. Der Gehalt des IL-1ra zur Stunde 6 korreliert mit der Überlebenszeit ( $r = -0,62$ ;  $p < 0,05$ ).



### 4.7.2.3 Leukocyte Neutral Proteinase Inhibitor

Der Leukocyte Neutral Proteinase Inhibitor (LNPI) hat in beiden Gruppen einen Basalwert von 95 ng/ml. Er steigt in der Kontrollgruppe stärker an als in der G-CSF-Therapiegruppe (Kontrolle: Stunde 12 (Maximum)  $285 \pm 127$  ng/ml, Phase 1  $184 \pm 72$  ng/ml; G-CSF: Stunde 12  $222 \pm 74$  ng/ml, Phase 1  $152 \pm 44$  ng/ml). In der Phase 2 halten sich die Werte noch im Bereich der Phase 1, fallen dann gegen Ende (Phase 3) wieder in den Bereich der Ausgangswerte.



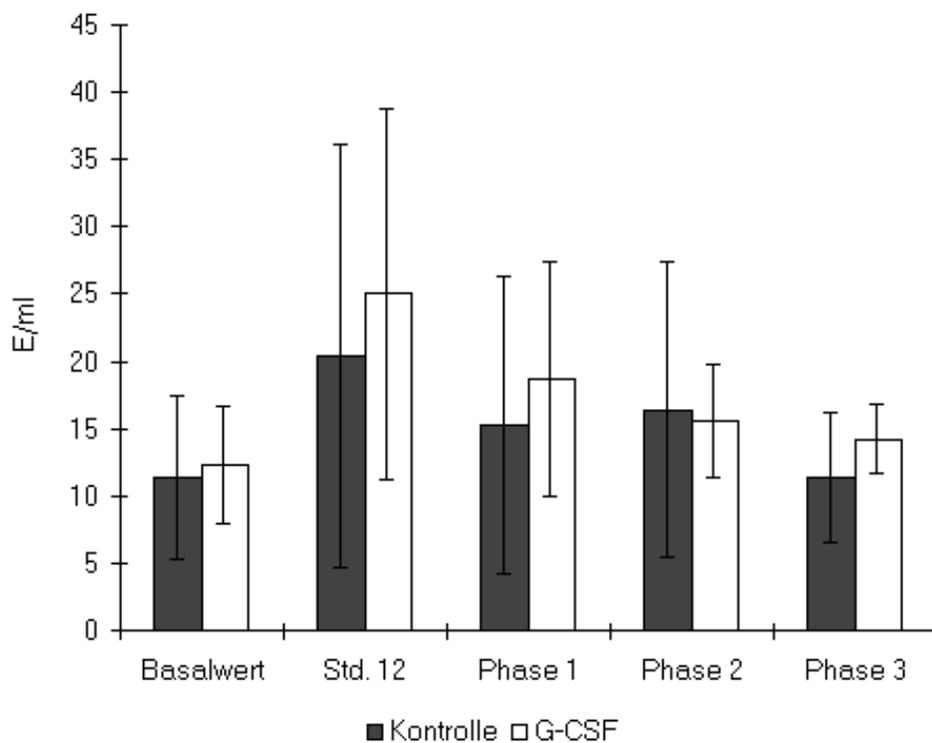
### 4.7.3 Organmanifestationen

#### Leber

#### 4.7.3.1 Prokollagen-III-Peptid

Der Prokollagen-III-Peptid-Gehalt (p-3-p) im Plasma zeigt einen initialen Anstieg bis zu einem Maximum zur Stunde 12 ( $20 \pm 16$  E/ml (Kontrolle) bzw.  $25 \pm 14$  E/ml (G-CSF)). In den folgenden Phasen fällt der Gehalt wieder ab, so daß er in der Phase 2 bei 16 E/ml in beiden Gruppen und in der Phase 3 bei 11 E/ml in der Kontrollgruppe und bei 14 E/ml in der G-CSF-Gruppe liegt.

Grafik 4.7.3.1: Prokollagen-III-Peptid



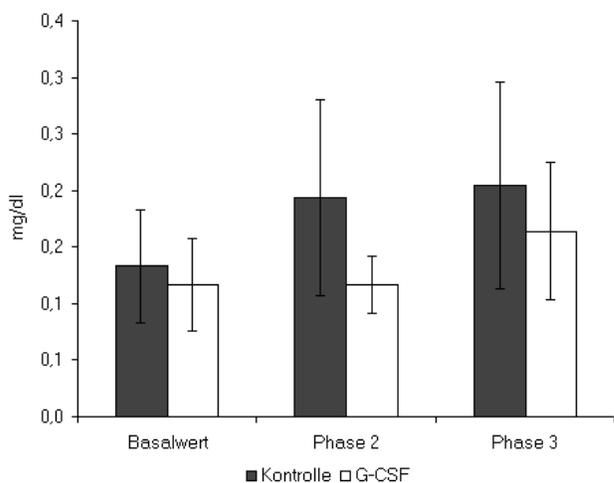
#### 4.7.3.2 Glutamat-Oxalacetat-Transaminase

Der Gehalt an freier Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT) im Serum ist in beiden Gruppen vor Infektion im Bereich der physiologischen Werte. In beiden Gruppen steigt er nach der Infektion an und ist in der Kontrollgruppe in der Phase 2 bei  $49 \pm 27,2$  E/l und in der Phase 3 wieder auf  $25 \pm 19,9$  E/l abgefallen. In der G-CSF-Gruppe steigt er auf  $35 \pm 18$  E/l in der zweiten Phase an und fällt danach ebenfalls wieder ab ( $13 \pm 8$  E/l).

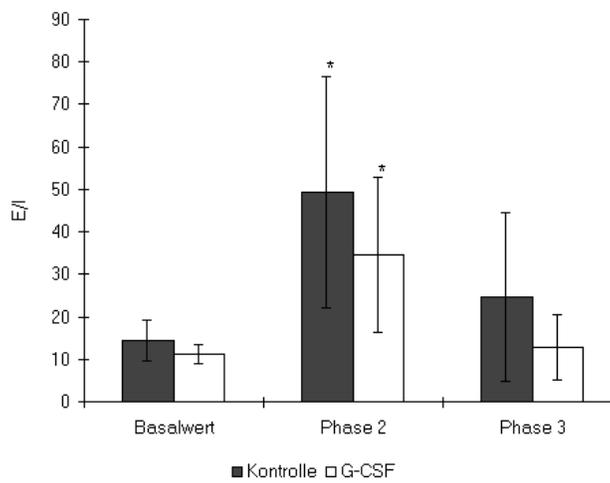
#### 4.7.3.3 Gesamtbilirubin

Ausgehend von dem Anfangsgehalt von 0,1 mg/dl im peripheren Blut steigt die Konzentration des Hämoglobinabbauproduktes auf 0,2 mg/dl in beiden Gruppen an (in der Kontrollgruppe in der Phase zwei, in der G-CSF-Gruppe in der Phase drei).

Grafik 4.7.3.3: Gesamtbilirubin



Grafik 4.7.3.2: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase



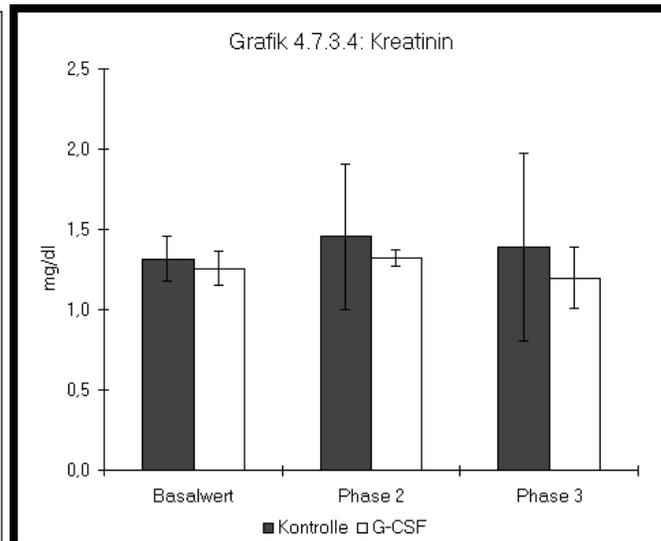
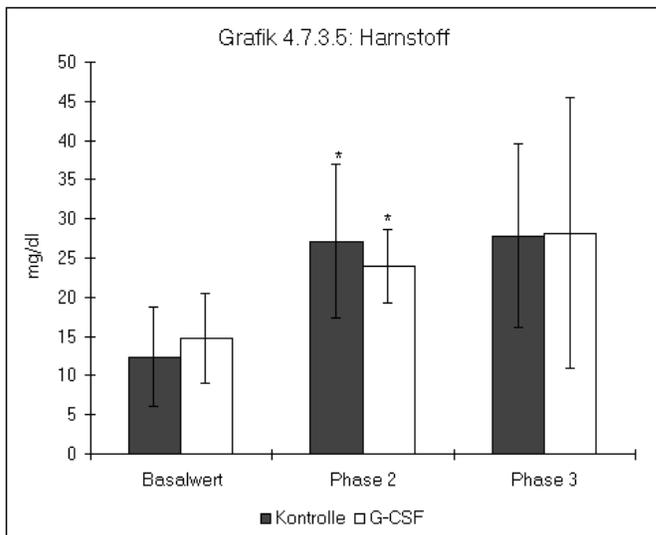
## Niere

### 4.7.3.4 Kreatinin

Der Kreatiningehalt bewegt sich über die gesamte Versuchsphase im Bereich des Ausgangswertes von 1,3 mg/dl. In der Kontrollgruppe ist er geringfügig über diesem Niveau ( $1,5 \pm 0,45$  mg/dl in der Phase 2 und  $1,4 \pm 0,58$  mg/dl in der Phase 3).

### 4.7.3.5 Harnstoff

Der Gehalt an freiem Harnstoff steigt von den Basalwerten ( $12 \pm 6,3$  mg/dl in der Kontrollgruppe und  $15 \pm 5,8$  mg/dl in der G-CSF-Gruppe) auf  $27 \pm 9,8$  mg/dl (Kontrolle) bzw.  $24 \pm 4,6$  mg/dl (G-CSF) in der zweiten Phase an. Zur dritten Phase steigert sich der Gehalt nur noch leicht.



## 5 Diskussion

In dieser Studie untersuchten wir die Wirkungen des rhG-CSF auf die klinischen und hämodynamischen Veränderungen infolge einer *P. aeruginosa* Sepsis. Dabei erfolgte die erste Applikation des Wachstumsfaktors drei Stunden nach Beginn der Keiminfusion. Die Sepsis wurde in unserem Modell durch die kontinuierliche intravenöse Gabe von vitalen *P. aeruginosa* induziert und aufrechterhalten. Dies äußerte sich im Verlaufe der ersten Stunden mit den sepsistypischen klinischen Symptomen wie z. B. einem deutlich verschlechtertem Allgemeinbefinden mit Erbrechen innerhalb der ersten zwei bis drei Stunden, einem Anstieg der Körpertemperatur innerhalb einer Stunde mit einem Maximum bei 6 Stunden, Tachykardie und Tachypnoe mit Abfall des Kohlendioxid-Partialdrucks und deutlicher Reduktion der Sauerstoffsättigung, Leukozytensturz, sowie den sepsistypischen Veränderungen der Kreislaufparameter in der Regel ebenfalls innerhalb der ersten ein bis zwei Stunden. Das frühe Auftreten der Infektionssymptome läßt es gerechtfertigt erscheinen, in dieser Studie eine Therapie 3 Stunden nach Infektionsbeginn einzuleiten.

### 5.1 Tiermodell

Daß sich das Schwein für Studien zur Erforschung der septischen Erkrankungen mit am besten eignet, konnte schon von mehreren Autoren dargelegt werden [Kreimeier 1993, Redl 1993, Töns 1993]. Seine Reaktion auf freigesetztes Endotoxin entspricht nahezu der des Menschen [Redl 1993]. Auch die Veränderung der Hämodynamik entspricht der des septischen Patienten. Durch eine Adaptation der Tiere an die Untersucher und an die Umgebungsbedingungen können die Stressfaktoren weitgehend ausgeschlossen werden, womit eine stressfreie Erhebung der Parameter am wachen Tier ermöglicht wird. Die erhobenen Ausgangswerte liegen dabei alle in der physiologischen Norm. Somit kann die Studie am nicht anästhesierten oder sedierten Schwein durchgeführt werden. Die Einflüsse einer Narkose auf die Hämodynamik können vermieden werden, insbesondere kann auch die Untersuchungsdauer auf mehrere Tage ausgedehnt werden.

## 5.2 Pathologische Veränderungen

Die hämodynamischen Parameter, wie sie in der humanmedizinischen Klinik beschrieben sind [Gates 1994, Pilz 1994, Asensio 1996], können reproduziert werden:

- Durch eine periphere Vasodilatation kommt es zu einem Abfall des systemischen Gefäßwiderstandes (SVRI) nach Überwinden des initialen, vermutlich katecholaminbedingten Anstieges. Dies begründet auch den Abfall des arteriellen Blutdruckes im Verlauf der Sepsis, da die kompensatorische Erhöhung des Herzzeitvolumens nicht ausreicht.
- Der Einfluß von lokal vasokonstriktorisch wirksamen Substraten in den Lungengefäßen zusammen mit den Gefäßwandschädigungen führt zu einem massiven initialen Anstieg des Blutflußwiderstandes in den Lungengefäßen (PVRI). Dieser erholt sich auch über die weiteren Phasen nicht ganz bis auf die Ausgangswerte. Im weiteren bedeutet dies einen Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks sowie des pulmonalkapillären Verschlussdrucks. Diese Verläufe konnten auch schon in einem Sepsismodell durch Endotoxingabe produziert werden, in diesem Falle allerdings nur in einem begrenzten Zeitraum nach der Kurzzeit-Endotoxinapplikation [Töns 1993].
- Der Rückstau des Blutvolumens in das rechte Herz und von dort in den venösen Schenkel des großen Kreislaufs bedingt gleichzeitig ein vermindertes Angebot an Volumen für das linke Herz. Damit ist auch die Verlaufskurve des Schlagvolumenindex zu erklären. Zumindest der Abfall in der ersten Phase kann auf das verminderte Blutvolumen zurückgeführt werden. Die Steigerung des Schlagvolumens in den folgenden Stunden ist als Antwort auf den Abfall des systemischen Blutdruckes zu sehen. Daß dies, zusammen mit der kompensativen Steigerung der Herzfrequenz nicht ausreicht, den Druck aufrecht zu erhalten, ist an dem weiter sinkenden arteriellen Druck zu erkennen.

Pulmonalarterieller Druck und Hämodynamik wurden von uns als frühzeitige klinisch erfaßbare Indikatoren einer Lungengewebsschädigung sowie einer Beeinträchtigung von Organperfusionen bestimmt. In der Intensivmedizin ist dieses Druckmonitoring verbreitet, um rechtzeitig eine Entwicklung zum Schock diagnostizieren zu können [Asensio 1994]. Die Verbindung von Infektion und Sepsis zur Hämodynamik ist über die Beeinträchtigung der Mikrozirkulation in der Lunge und anderen Organen gegeben.

Die Bestimmungen der Blutgaswerte lassen ebenfalls auf eine Schädigung der Lungenfunktion schließen, was auf die Entwicklung einer Schocklunge (ARDS) hindeutet. Hier dominieren:

- Der Anstieg der Atemfrequenz innerhalb von zwei Stunden auf den doppelten Ausgangswert als Antwort auf die schlechte Sauerstoffversorgung der zentralen Sauerstoffrezeptoren.
- Der Sauerstoff-Partialdruck ( $paO_2$ ), welcher ebenfalls in den ersten zwei Stunden signifikant abfällt. Daß sich die Tiere nicht mehr von dieser Hypoxie erholen, ist mit der anhaltenden Lungenfunktionsstörung mit einem interstitiellen Ödem (Verbreiterung der Alveolarwände), einhergehend mit einer Sauerstoff-Perfusionsbeeinträchtigung zu erklären [Töns 1993]. Zwar spricht man erst ab  $paO_2$ -Werten von unter 65 mmHg von einem ARDS, aber auch ein schon geringerer Abfall des peripheren Sauerstoffangebotes kann erhebliche Auswirkungen auf die Funktion der Zellen und damit der Organe haben. Bei anhaltender Hypoxie und einer diese potenzierenden Mikrozirkulationsstörung (durch Beeinträchtigung des Kreislaufes oder auch durch lokale Blutflußbehinderungen) bedeutet dies insbesondere bei sehr sauerstoffabhängigen Organen, wie dem zentralen Nervensystem eine rapide und anhaltende Funktionsstörung. Wir hatten nur bei einzelnen Tieren  $paO_2$ -Werte von unter 70 mmHg gemessen, diese Tiere waren in der Regel auch sonst in einem sehr schlechten Allgemeinzustand (Seitenlage, apathisch bis somnolenter Zustand, hochgradige Tachypnoe und Zyanose, zum Teil blutig-schaumiger Nasenausfluß) und mußten vereinzelt aus diesem Aspekt euthanasiert werden. Interessanterweise hatten wir aber auch Tiere, welche sich von Werten unter 60 mmHg bei einem sonst recht stabilen Zustand wieder erholen konnten.
- Mit den Ergebnissen der  $paO_2$ -Messung ist auch der Verlauf der Sauerstoffsättigung des arteriellen Blutes ( $SaO_2$ ) korreliert.
- Der Abfall des Kohlendioxid-Partialdrucks ( $paCO_2$ ) ist bedingt durch die Hyperventilation mit einer verstärkten Abatmung der  $CO_2$ -Korrelate. Dies beeinflußt den Säure-Basen-Haushalt durch den Verlust von Pufferäquivalenten. Der rapide und massive Anstieg der Atemfrequenz, bedingt durch den raschen Abfall des  $paO_2$  führt schon innerhalb von zwei Stunden zu einer Beeinträchtigung der Wasserstoffionenkonzentration mit einem Anstieg des pH-Wertes. Der Verlauf der pH-Kurve unter Berücksichtigung der  $paCO_2$ -Kurve und des Bikarbonatgehaltes ( $HCO_3^-$ ) entspricht einer nicht kompensierten respiratorischen Alkalose durch Hyperventilation. Diese Form der Alkalose wird verstärkt durch eine metabolische Komponente. Das initiales Erbrechen führt zum direkten Verlust von sauren Valenzen über die Magensäure. Von Bedeutung für die anhaltende Erhöhung des pH ist aber die durch die Lungenfunktionsbeeinträchtigung

ausgelöste Hyperventilation zu sehen.

Das Auftreten der Lungenschädigungen bei allen Tieren steht in Übereinstimmung mit klinischen Untersuchungen, in denen 100% der Sepsispatienten im Verlaufe des Multiorganversagens auch ein Lungenversagen (ARDS) entwickeln, bzw. als erste Manifestation nachweisbar ist [Goris 1985].

Neben den Veränderungen am Herz- und Gefäßsystem, sowie der Lunge manifestiert sich eine Sepsis in schwereren Verläufen auch an weiteren Organen und Geweben. Betroffen ist einerseits der Magen-Darm-Trakt. Hier ist durch die Perfusionsbeeinträchtigung die Darm-Blut-Schranke gestört. Meßbare Parameter für diese Manifestation sind im allgemeinen der Übertritt von Toxinen und Bakterien (Translokation) aus dem Lumen in das Blut. Toxine (Enterotoxine) neben dem Endotoxin haben wir nicht bestimmt, bei einem Tier konnten wir im Verlauf der Sepsis vereinzelt Keime in der Blutkultur nachweisen, welche der typischen Darmflora angehören (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*).

Die Leber und die Niere sind weitere Organe, in welchen sich eine Sepsis über die Störungen der Blutzirkulation und / oder der Endothelintegration manifestieren kann. Die leberspezifischen Parameter weisen auch auf eine Funktionsstörung des Organes hin. Wie an dem Verlauf des freigesetzten Prokollagen-III-Peptids zu erkennen ist, handelt es sich aber vorwiegend um eine akute Belastung der Leber in der initialen Phase. Auch die Erhöhung der GOT-Werte in der Phase 2 pendelt sich nach drei Tagen wieder bei etwa Normalwerten ein (Referenzwerte siehe Kraft 1995). Das Gesamtbilirubin steigt zwar im weiteren Verlauf noch an, jedoch sind hier die Werte durchgehend im Referenzbereich. Der beim Schwein unspezifische Verlauf des GPT-Gehaltes ist hier nicht dargestellt. Wir konnten zwar bei einzelnen Tieren in der Anfangsphase eine Oligurie notieren, über die Versuchsdauer zeigte kein Tier eine Anurie, die im Serum meßbaren Parameter Kreatinin und Harnstoff liegen im Bereich der Referenzwerte.

Auch die Veränderungen des kleinen Blutbildes zeigen einheitlich die Auswirkungen einer massiven systemischen Infektion. Der Leukozytensturz als initiales Ereignis, induziert durch eine verstärkte Adhäsion der Zellen an das Gefäßendothel, ist in beiden Gruppen deutlich. In der Kontrollgruppe bleibt danach die Zahl der Leukozyten auf einem relativ niedrigen Niveau über die gesamte Versuchsdauer. Die G-CSF-Therapiegruppe spricht nach 12 Stunden auf den Granulozyten-Wachstumsfaktor an und erreicht in der letzten Phase mit  $18 \times 10^9$  Leukozyten/l 140 % des Ausgangswertes.

Die Thrombozyten fallen ebenfalls in ihrer verfügbaren Gesamtzahl aufgrund des Verbrauchs durch die Gerinnungsinduktion an den geschädigten Gefäßendothelien, sowie einer Bindung an intaktes Endothel nach einer Aktivierung durch Endotoxin, TNF- $\alpha$  oder durch IL-1. Es entwickelt sich bei allen Tieren eine mehr oder weniger ausgeprägte disseminierte intravasale Gerinnung trotz Heparin-Prophylaxe, welche wir auch durch die regelmäßige Messung der Activated Clotting Time (ACT) bestätigen konnten. Infolge des Anstieges des ACT mußten wir unsere Heparin-Spülungen bei den Tieren reduzieren, um die Blutungsneigung nicht extrem zu steigern.

Das rote Blutbild wird durch die Sepsis nicht beeinträchtigt. Der Abfall der Erythrozyten-Gesamtzahl, des Hämatokrit und des Hämoglobingehalts ist durch die wiederholte Blutentnahme bedingt. Obwohl wir versucht haben, das abgezogene Blutvolumen auf ein Minimum zu reduzieren, lagen wir dennoch bei einer Abnahmemenge von 20 bis 35 ml Vollblut pro Untersuchungszeitpunkt. Der Verlust an roten Blutkörperchen und damit an verfügbarem Hämoglobin könnte natürlich die Sauerstoffversorgung der Organe beeinträchtigen. Aber gerade in der letzten Phase mit der niedrigsten Konzentration der Erythrozyten, erholen sich die Blutgaswerte wieder. Dies spricht gegen eine massive Beeinträchtigung der Sauerstoff-Homöostase durch unsere Manipulationen.

Um den Effekt von G-CSF auf die Clearance-Funktion der Abwehrcellen zu prüfen, wurden bei den Tieren der Endotoxinspiegel im Verlauf der Sepsis bestimmt. Wie in anderen Sepsisstudien, konnten auch wir einen an- und absteigenden Verlauf der Endotoxinkonzentration im Plasma nachweisen. Da wir lebende gramnegative Bakterien verabreicht haben, stieg der Endotoxingehalt erst im Verlauf der ersten Stunden bis zu einem Maximum nach 24 / 48 Stunden *post infectionem* an (s. S. 85). Danach fiel das freie Lipopolysaccharid (LPS) wieder ab. Dieser abfallende Verlauf, welcher auch in anderen Studien schon beobachtet werden konnte [Haberstroh 1995], ist nicht eindeutig zu klären.

Der verzögerte Anstieg wird sicherlich mit durch die *in vivo* erst allmählich einsetzende Bakteriolyse verursacht. Dabei wird LPS nicht nur direkt aus abgestorbenen und lysierten Bakterien frei, auch die Wiederfreisetzung aus absterbenden Phagozyten stellt eine Ursache für den anhaltenden Anstieg bis zur 24. / 48. Stunde dar. Ebenfalls von Bedeutung ist die erschöpfte Filterfunktion des Monozyten- / Makrophagensystems (früher retikuloendotheliales System). Mit Einsetzen einer Infektion muß das Immunsystem erst stimuliert werden. Dies führt zu einer gewissen Latenzzeit, in welcher sich Bakterien und auch LPS im Organismus anreichern können. Das Abwehrsystem hinkt gewissermaßen hinterher. Vorhandene Phagozyten (Makrophagen und Granulozyten) müssen erst aktiviert werden, um ihre Aktivitäten dann gezielt

gegen zirkulierende Bakterien und freies LPS zu richten. Ebenso müssen die gegen das LPS gerichteten Plasmafaktoren erst gebildet und freigesetzt werden. Lösliche LPS-bindende Moleküle sind das High Density Lipoprotein (HDL), das Bactericidal/Permeability Increasing Protein (BPI), das LPS-bindende Protein (LBP) sowie der von Zellmembranen abgelöste Rezeptor sCD14. HDL und LBP sind Akut-Phase-Proteine, welche auf eine entsprechende Stimulation hin in der Leber gebildet werden. Sie binden LPS mit unterschiedlichem Effekt. Während HDL das Endotoxin nur bindet, es so der Zirkulation entzieht und somit inaktiviert, potenziert LBP durch die Bindung des Endotoxins dessen aktivierende Wirkung auf CD14-positive Zellen (Monozyten / Makrophagen). Dennoch wird durch die Bindung an diese Plasmafaktoren Endotoxin aus der Zirkulation entzogen und ist so für die zur Verfügung stehenden Testverfahren nicht mehr detektierbar. Da die Akut-Phase-Proteine erst allmählich innerhalb 24 Stunden nach einer Infektion ansteigen, könnte dies eine mögliche Erklärung für den verzögerten Rückgang der Endotoxinkonzentration sein. Als weitere Ursachen kommen in Betracht: 1. Die Phagozytoserate und Effizienz des unspezifischen Abwehrsystems (mononukleäre und polymorphkerniges Phagozytosesystem) steigt allmählich an, trotz des zahlenmäßigen Einbruchs. 2. Die Abwehrleistung ist so stark beeinträchtigt, daß die Bakterienphagozytose und die Bakteriolyse stark zurückgeht und somit weniger LPS freigesetzt wird.

Wie schon bei der Darstellung des Verlaufs der Endotoxinkonzentrationen im Serum (s. S. 84) gezeigt, ergeben sich aufgrund der hohen Standardabweichungen keine signifikanten Unterschiede der Maximalwerte, bzw. der Phasenwerte im Bezug zum Ausgangswert, obwohl dies anhand der Mittelwerte zu erwarten wäre. Die großen Unterschiede zwischen den Tieren müssen wir leider auf ein mangelhaftes Testverfahren zurückführen, in welchem sich auch in wiederholten Messungen der Proben starke Differenzen ergaben.

Von diesen Schwierigkeiten abgesehen, kann zwischen den Gruppen sowohl im Sepsisverlauf (Phasendarstellung) als auch bei den Maximalwerten ein leichter Vorteil der G-CSF-Gruppe erkannt werden.

Eine Sepsis im Mensch wie im Tier verursacht eine kurzzeitige einmalige Freisetzung des Polypeptids Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). So ist aus verschiedenen Studien der initiale Peak innerhalb 90 bis 180 Minuten beschrieben [Michie 1989]. Diesen maximalen Anstieg wie auch den raschen Rückgang auf Werte nahe dem physiologischen Ausgangswert konnten wir nachvollziehen. Individuell unterschiedliche Reaktionen auf die applizierten Bakterien resultieren insbesondere in deutlich unterschiedlichen TNF- $\alpha$ -Maximalwerten, wodurch die hohen Standardabweichungen bedingt sind. Aus diesem Grund erreichen die Tiere auch den jeweiligen Maximalwert nicht alle exakt zur Stunde 2. Eine kürzere Abnahmefolge von Proben zur TNF- $\alpha$ -Bestimmung würde sicherlich den Maximalwert der einzelnen Tiere genauer festlegen, dies würde aber die Grenzen des abnehmbaren Blutvolumens überschreiten. Die absoluten Maximalwerte der TNF- $\alpha$ -Bestimmung sind auf der Seite 87 dargestellt.

In klinischen Studien wurde TNF- $\alpha$  als ein mit der Schwere der Erkrankung gut korrelierender Faktor erkannt [Függer 1993]. Die Ausschüttung an TNF- $\alpha$  im Verlauf einer Endotoxämie ist dabei abhängig von der freigesetzten / applizierten Endotoxinmenge [Hesse 1988]. Durch Standardisierung der Keimapplikation und der Dosierung der Bakterien konnten wir ein weitgehend einheitliches Reaktionsausmaß induzieren. Infolge individueller Schwankungen bewegen sich die TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im Plasma in einem relativ breiten Bereich zum Zeitpunkt 2 Stunden (Peakphase). Wir konnten aber in unserem Sepsismodell keine Korrelationen des maximalen TNF- $\alpha$ -Wertes mit dem Schweregrad der klinischen Veränderungen (APACHE II-Score, Überlebenszeit, Körpertemperatur) feststellen.

Neben TNF- $\alpha$  ist Interleukin-1 (IL-1) das wichtigste proinflammatorische Zytokin in der frühen Phase der Sepsis. IL-1 wird aus Monozyten / Makrophagen auf einen LPS-Stimulus lokal am Ort der Infektion freigesetzt. Bei einer massiven Stimulation durch zirkulierendes Endotoxin tritt IL-1 in großen Mengen in die Blutbahn über. Als Gegenregulation insbesondere der systemischen Reaktionen wird von den monozytären Phagozyten der IL-1 Rezeptorantagonist (IL-1ra) produziert und sezerniert. In klinischen wie in experimentellen Studien konnte in der Endotoxämie wie auch in der Sepsis der IL-1ra-Anstieg nachgewiesen werden. Während IL-1 seinen Maximalwert etwa ein bis drei Stunden nach einem Insult oder einer Endotoxinfreisetzung erreicht [Cannon 1990, Pruitt 1996], steigt IL-1ra erst später an. Meist wird das Maximum der IL-1ra-Konzentration im Plasma zwischen der 2. und 6. Stunde nach einem Insult oder einer Endotoxinapplikation erreicht. Da wir in unserer Studie in diesem Zeitraum nur die Abnahmen zur Stunde 2, 3 sowie 6 hatten, konnten wir sicherlich bei den wenigsten Tieren den absoluten Höhepunkt bestimmen. Unsere Tiere erreichten in Konsens mit den bisherigen Veröffentlichungen einen gemessenen Maximalwert entweder drei oder sechs Stunden nach Infektionsbeginn.

IL-1ra wird nach der veröffentlichten Literatur in Analogie zu einem erhöhten IL-1-Level freigesetzt [Fischer 1992]. Da wir in dieser Studie IL-1 nicht bestimmt haben (wir stützten uns bei der G-CSF-Studie vor allem auf die Wirkungen des TNF- $\alpha$ ), können wir diesen Zusammenhang weder bestätigen noch ablehnen. Indirekt kann die antagonistische Wirkung des IL-1ra auf IL-1-Rezeptoren durch die Körpertemperatur bestätigt werden. Bei Tieren mit einem hohen IL-1ra-Maximum steigt auch die Körpertemperatur deutlich geringer an. Die Wirkung von IL-1ra auf die septische Erkrankung ist aus dieser Untersuchung nicht zu klären. Es kann nur vermutet werden, daß die anti-inflammatorische Wirkung durch die

Antagonisierung des IL-1 eine so gravierende Auswirkung auf die Abwehrleistung des Organismus hat, daß dieser nicht mehr in einem entsprechenden Maße auf die eindringenden Bakterien reagieren kann. Die pyrogene Wirkung des Endotoxins bleibt aus, wohingegen alle anderen Symptome einer Sepsis bei diesen Tieren in einem verstärkten Ausmaß auftreten. Dieses Ergebnis der IL-1ra-Überproduktion und -Liberation sollte in weiteren Studien näher untersucht werden. Vorläufig bleibt nur der Hinweis, daß das IL-1ra in einem Netzwerk aus Zytokinen zwar keine herausragende Rolle hat, aber daß durch eine Applikation in einer septischen Infektion mit der Absicht, IL-1 zu antagonisieren, durchaus negative Effekte erzielt werden können. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen aus experimentellen und klinischen Studien, welche den Einsatz von IL-1ra untersuchten [Slotman 1995]. Es wäre interessant zu untersuchen, ob bei einem ausbleibenden reaktiven Temperaturanstieg im Verlauf einer Sepsis die IL-1ra-Konzentration im Plasma ebenfalls deutlich ansteigt und in diesen Fällen eine IL-1-Applikation nützlich sein könnte. Experimentelle und klinische Studien weisen darauf hin, daß eine verstärkte exogene oder endogene Erhöhung der IL-1ra-Plasmakonzentration durchaus negative (immunsupprimierende) Wirkungen nach sich ziehen kann [Slotman 1995].

Der Leukocyte Neutral Proteinase Inhibitor (LNPI) ist ein Elastase-Inhibitor aus dem Zytosol neutrophiler Granulozyten des Schweines. Es besitzt weitgehende Ähnlichkeiten mit leukozytären Proteinase-Inhibitoren anderer Säugetiere [Teschauer 1993]. Die inhibitorische Wirkung ist im wesentlichen gegen die in den azurophilen Granula lokalisierte Proteinase Elastase gerichtet. Die Elastase besitzt neben ihrer antimikrobiellen Potenz auch eine Wirksamkeit gegen körpereigenes Gewebe. Im gesunden Organismus wird die Elastase nicht freigesetzt und auch in normal funktionierenden Abwehrmechanismen bleibt die Elastase intravakuolär und entfaltet die proteolytische Wirkung nach Fusion der Granula mit dem Phagosom. Freigesetzt, gelten die granulären Proteasen als potente Effektoren der Gewebeschädigung. Erhöhte extrazelluläre Proteasenkonzentrationen kommen nach einer starken Aktivierung der Neutrophilen sowie nach deren Desintegration zustande. In klinischen Studien konnten Dittmer *et al.* einen Anstieg der Plasma-Elastase in Korrelation mit dem Schweregrad der Erkrankung und einem Maximum etwa 12 Stunden nach einem Trauma identifizieren [Dittmer 1986]. Die Serumkonzentration der Elastase-Inhibitoren (hier LNPI) kann als ein Marker für die freigesetzte Elastasemenge verwendet werden und reflektiert den Schweregrad einer bakteriellen Infektion. In Übereinstimmung mit den veröffentlichten Studien zu Elastase bzw. Elastase-Inhibitor können auch wir das Maximum der LNPI-Konzentration im Plasma zur 12. Stunde *post infectionem* festlegen. Auch hier haben wir keine Unterschiede zwischen einzelnen Tieren erarbeiten können, da die erzeugte Sepsis in ihrer Manifestation einen nahezu identischen Schweregrad aufwies. In Abschnitten erhöhter LNPI-Produktion (Phase 1 und 2), sind die in der Kontrollgruppe freigesetzten Mengen zwar erhöht gegenüber der G-CSF-Therapiegruppe, die Unterschiede zwischen den Gruppen sind jedoch nicht signifikant. Eine Erklärung für die in der G-CSF-Gruppe verringerte Freisetzung des LNPI könnte die unter G-CSF verminderte Hyperreaktivität der neutrophilen Granulozyten sein.

In der intensivmedizinischen Klinik werden verschiedene Klassifizierungsskalen (neben dem APACHE Score auch der Simplified Acute Physiology Score SAPS, Elebute-Score, Goris' Multiple Organ Failure Score, der Hannover Intensiv Score HIS oder der Septic Severity Score SSS) zur Erfassung der Schweregrade einer Erkrankung eingesetzt in der Hoffnung, mit solchen Einteilung ein einheitliches internationales Diagnose - Prognose - Therapie - Schema einzuführen [Pilz 1989]. Aber auch schon innerhalb der Spezies Mensch kommt es durch individuelle Schwankungen oft zu Problemen bei der Anwendbarkeit von Klassifizierungsskalen. Unter anderem werden deshalb ständig neue Skalen vorgestellt. Der hier einer Modifizierung zu Grunde gelegte APACHE II Score wurde 1985 von Knaus *et al.* vorgestellt [Knaus 1985]. Auch dieses System stellte schon eine Abwandlung einer im Jahre 1981 aus demselben Hause erarbeiteten Einteilung dar [Knaus 1981] und wurde inzwischen zu einem APACHE III Scoresystem weiterentwickelt [Knaus 1989]. Allerdings hat dieses System auch in die Klinik noch keinen Eingang gefunden, obwohl aus veröffentlichten Daten zur Evaluierung eine bessere Korrelation der Ergebnisse mit den Schweregraden einer Erkrankung besteht. Eine Verwendung hängt jedoch auch immer von der Anwendbarkeit und der klinisch-therapeutischen Relevanz eines solchen Klassifizierungssystems ab. Damit ist meist auch der Umfang der Datenerhebung gemeint.

Um das APACHE II Klassifizierungssystem möglichst einfach an die von uns verwendete Tierart Schwein anzupassen, wurden die Parameter Körpertemperatur und Hämatokrit an physiologische Werte beim Schwein adaptiert (Verfahren s. S. 54). Die Anwendung dieses modifizierten Systems stellt nicht die günstigste Verfahrensweise dar. Das Problem stellen zum Teil fehlende stichfeste Referenzwerte dar, zum Teil können Parameter, welche in der humanmedizinischen Klinik zur Erstellung des APACHE Scores herangezogen werden, am Tier nicht oder nicht vollständig erhoben werden. So wurde der Glasgow Coma Score nicht angewendet. Ein weiterer Kritikpunkt ist die Vergleichbarkeit von klinischen Verhältnissen und experimentellen Versuchen. So kann die Vergabe der chronic health points in Frage gestellt werden. Einerseits erscheint es nach Überlegungen durchaus logisch, wenn zur Ausgangslage 0 Punkte vergeben werden. Andererseits stellt sich dann die Frage, wieso bei keinem der Tiere zu diesem Zeitpunkt unter dem acute physiologic score 0 Punkte erschienen und die Tiere somit durchweg mit einer gewissen Punktzahl zur Stunde 0 in den Versuch eingingen. Dies müßte dem Verständnis des Klassifizierungssystems nach mit einer leichten Erkrankung korrelieren.

Das APACHE Score System stellt in seinem Aufbau noch eines der am besten auf das Tier zu übertragenden Klassifizierungssysteme dar, und es ist eines der am meisten in der internationalen Intensivmedizin angewandten Systeme. Um die Möglichkeit einer Vergleichbarkeit von experimentellen Studien mit der Klinik zu nutzen, sollte ein solcher entsprechender Score durchaus weiter angewandt und dazu entsprechend weiter modifiziert werden.

### 5.3 Diskussion der Applikation von G-CSF in der Sepsis

Nur bezüglich der Leukozytenzahl im peripheren Blut zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und der rhG-CSF-Therapiegruppe.

Der Wachstumsfaktor G-CSF ist in einem Infektionsgeschehen neben den hervorstechenden Zytokinen Interleukin-1 und Tumor Nekrose Faktor sowie anderen Interleukinen ein wichtiger Mediator. Er vermittelt insbesondere zwischen den Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten auf der einen und den neutrophilen Granulozyten auf der anderen Seite. Als Wachstumsfaktor stimuliert G-CSF die Stammzellen der Granulozyten (Granulozyten / Makrophagen-Vorläuferzelle) im Knochenmark. Es werden ausgehend von der Stammzelle mehr Abkömmlinge gebildet, welche unter dem Einfluß von G-CSF sich ausschließlich zu den neutrophilen Granulozyten differenzieren. Die gebildeten und ausgeschütteten Granulozyten sind nach Studien an Krebspatienten in ihrer Aufgabe voll funktionsfähig und unter der Wirkung von G-CSF besitzen die Zellen eine verlängerte Lebenszeit [Bronchud 1988, Gabrilove 1988]. Außerdem werden ausgereifte Granulozyten in ihrer Aktivität stimuliert.

Um hier noch einmal auf die Funktion der neutrophilen Granulozyten einzugehen:

Neutrophile unterscheiden sich von anderen weißen Blutzellen durch ihre Ubiquität und ihre rasche Rekrutierung. Neutrophile sind die ersten phagozytierenden Zellen, welche am Ort einer Infektion eintreffen. In einer Sepsis wie auch bei experimenteller Endotoxämie ist eine frühe Neutropenie gefolgt von einem allmählichen Wiederanstieg der Leukozytenzahlen im peripheren Blut [Smith 1995]. Abhängig von der Immunkompetenz des Patienten und des Schweregrades der Infektion entwickelt sich eine Neutrophilie oder aber der Patient bleibt neutropenisch. Die Neutropenie in der Sepsis resultiert aus einer Sequestration der Neutrophilen in verschiedene Organe wie die Lunge, die Leber oder die Milz [Grisham 1988]. Diese Ansammlung von Neutrophilen in den Lungengefäßen und den Alveolarsepten wird nicht nur bei einer Pneumonie beobachtet, auch bei einer viszeral induzierten Sepsis lassen sich in histologischen Schnitten leukozytäre Infiltrate nachweisen und es kommt zu einer respiratorischen Mangelfunktion [Toda 1993]. Es ist allgemein anerkannt, daß die der Sequestration folgende Aktivitätssteigerung der Neutrophilen durch Endotoxin oder Zytokine sowie durch Adhäsionsmoleküle zur lokalen Schädigung über eine Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies und Proteasen beiträgt. Die Neutrophilen-induzierte Endothelzellbeeinträchtigung ist eines der Hauptpathomechanismen in der Pathogenese der Lungenschädigung (ARDS) in der Sepsis. Zusätzlich zu den klassischen proinflammatorischen Zytokinen können die Wachstumsfaktoren G-CSF und GM-CSF die Neutrophilen stimulieren und die Rekrutierung der Neutrophilen beeinflussen [De Haas 1994].

Neutrophile Granulozyten sind Haupteffektoren in der Phagozytose. Oponisierte Bakterien werden durch Neutrophile über ihre membranständigen Fc- und Komplement-Rezeptoren erkannt und nachfolgend phagozytiert durch Einstülpungen der Zellwand und Ausformung von Pseudopodien (Aktivierung zytoplasmatischer kontraktile Strukturen führt zu Veränderungen der Zellform). Das so entstandene Phagosom (Zytoplasmavakuole) fusioniert mit den intrazellulären primären und sekundären Granula. Über einen NADPH-Oxidase-abhängigen Mechanismus wird Sauerstoff zu Superoxid ( $O_2^-$ ) reduziert. Dieses  $O_2^-$  wird zu Perhydroxylradikalen (OH) oder zu Wasserstoffperoxidase ( $H_2O_2$ ) enzymatisch umgesetzt.  $O_2^-$ , OH,  $H_2O_2$  sind effektive Zellgifte und wirken in den Lysosomen direkt auf den phagozytierten Partikel ein. Als weiteres hochreaktives Oxidans wird auf einen Stimulus durch Endotoxin und die proinflammatorischen Zytokine Stickstoffmonoxid (NO) gebildet. Physiologischerweise ist NO ein inter- und intrazellulärer Botenstoff im Gehirn und in den Gefäßen. Hier wirkt er insbesondere vasodilatatorisch und wird von einer konstitutiven Stickstoffmonoxidsynthetase in den Endothel- und Nervenzellen gebildet. Auf eine Stimulation werden in den Neutrophilen, wie auch in mononukleären Phagozyten eine induzierbare NO-Synthetase gebildet und darauf hin das Molekül gebildet und freigesetzt. Induktoren für die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase und auch die NADPH-Oxidase sind unter anderem die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 [Cendan 1994], welche nach einer LPS-Stimulation der Makrophagen und der Endothelzellen freigesetzt werden. Einige weitere Proteine, welche jederzeit in den Granula der neutrophilen Granulozyten verfügbar sind, wie die Kathepsine (Endopeptidasen), Elastasen und Kollagenasen, die Myeloperoxidase oder das Lysozym, sind ebenfalls in den lytischen Prozeß der Bakterienabtötung involviert. Neutrophile haben aber auch einige nicht-oxidative Mechanismen der Bakterienabwehr, wozu das

Bactericidal/Permeability-Increasing Protein (BPI) gehört, ein 55 kDa Protein in den azurophilen Granula der Neutrophilen. In Sepsis und experimenteller Endotoxämie steigt die BPI-Konzentration im Plasma um das dreifache an [von der Möhlen 1996]. An den Effekten der Endotoxämie gemessen aber zu wenig, um die enorme Menge an freiem Endotoxin wirksam zu reduzieren.

Endotoxin wirkt auf Neutrophile und stimuliert die Sauerstoffradikalproduktion und -freisetzung [Forehand 1989]. Allerdings verursacht eine anhaltende Stimulation der Neutrophilen eine funktionelle Beeinträchtigung, welche einen Verlust von lysosomalen Granula und ein Abwerfen von Fc-Rezeptoren von der Zelloberfläche beinhaltet. Vermutlich als Konsequenz auf eine kontinuierliche Stimulation unter pathologischen Verhältnissen ist die Radikalbildung sowie auch die Chemotaxis der Neutrophilen beeinträchtigt, was in einer erhöhten Anfälligkeit der Patienten für Sekundärinfektionen resultiert (z. B. bei Brandverletzungen). Fein *et al.* konnten 1991 zeigen, daß in septischen Patienten mit ARDS zirkulierende Neutrophile eine verringerte Kapazität der Sauerstoffradikalbildung und eine verminderte Adhärenz an pulmonale Kapillarendothelzellen aufweisen [Fein 1991]. Obwohl eine artefizielle Inhibition der Neutrophilen/Endothel-Interaktion ein interessanter Aspekt für eine (Immun-) Therapie in der Sepsis zu sein scheint, und auch obwohl einige Studien eine Verhinderung von ARDS im Ischämie/Reperfusion-Syndrom nachweisen konnten, könnte eine solche Maßnahme im infizierten Patienten Schaden anrichten [Übersicht in: Thiel 1996b]. Die entscheidende Rolle der Neutrophilen in einer effektiven Bekämpfung von Bakterien wurde in verschiedenen Tierstudien mit lokalen Infektionen demonstriert, in welchen die Neutrophilen-Rekrutierung durch Gabe von anti-CD 18 Antikörpern blockiert wurde, was in einer verminderten Endotoxin-Clearance und in einer erhöhten Mortalität resultierte. Wenige Studien haben auch den potentiell schädigenden Effekt von anti-Selectin Antikörpern in Infektionsmodellen untersucht. Jedoch durch die weite Streuung der verschiedenen Selectin-Typen konnte keine Beeinflussung der Neutrophilen-Rekrutierung und kaum ein Effekt auf bakterielle Phagozytose festgestellt werden.

Die im peripheren Blut nachweisbaren Leukozyten stellen nur einen Teil der ausgereiften Zellen im Blutsystem dar. Ein beträchtlicher Anteil der Leukozyten befinden sich in einem marginalen Pool der Gefäße vorwiegend der Lunge. Aus tierexperimentellen Daten wurde auf eine Poolgröße von  $6,1 \times 10^7$  Neutrophilen in der Lunge gesunder Menschen extrapoliert [Cohen 1983]. Durch die parabolische Verteilung der Blutflußgeschwindigkeit in den Gefäßen mit einer Abnahme zu den Gefäßwänden hin, wird die Stase der Zellen in diesem marginalen Pool begünstigt. Dies ist zunächst nicht durch eine Interaktion mit den Endothelzellen verursacht.

Diese Leukozyten können durch eine Steigerung der Blutflußgeschwindigkeit sehr rasch rekrutiert werden.

In einer Sepsis wie auch bei einer Endotoxämie kommt es jedoch über eine Aktivierung der Endothelzellen und der Leukozyten zu einem weiteren Phänomen. Auf den Endotoxinreiz exprimieren die Endothelzellen sialysierte Glykoproteine, welche als Liganden für die L-Selektine (CD62L) der Neutrophilen mit diesen interagieren und eine Molekülwechselwirkung eingehen. Es kommt zu einem Rollen der Leukozyten auf der Gefäßwand durch die noch relativ lockere Bindung der Neutrophilen an das Endothel. Die Wechselwirkung der Leukozyten mit den Endothelzellen wie auch eine weitere Stimulierung der Zellen durch zirkulierendes Lipopolysaccharid führt zu einer Expression und Aktivierung von Adhäsionsmolekülen auf den Zellen. Die Endothelzellen bilden zum Gefäßlumen hin die sogenannten interzellulären Adhäsionsmoleküle (ICAM-1 und ICAM-2), während auf den Neutrophilen die entsprechenden konstitutiven Liganden, das  $\beta_2$ -Integrin (CD11/CD18-Komplex) aktiviert werden. Die Bindung dieser zwei Moleküle bewirkt nun eine festere Adhäsion der Leukozyten an das Endothel. Durch die nun stattfindende gegenseitige Stimulation der Zellen sowie durch die chemotaktischen Faktoren IL-8, G-CSF und PAF werden weitere Adhäsionsmoleküle exprimiert und aktiviert. Es kommt zu einer festen Adhärenz der Leukozyten und im weiteren zu einer transendothelialen Diapedese. Die Emigration der Neutrophilen wird ebenfalls durch die nun in sehr hoher Zahl ausgebildeten Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und -2 sowie die  $\beta_2$ -Integrine vermittelt.

Daß dieses Phänomen des "rolling-sticking-diapedesis" in der Endotoxämie vorwiegend in der Lunge stattfindet, hat als eine Ursache sicherlich den physiologischen marginalen Pool in den Lungengefäßen, worüber es nach einer massiven Anflutung von Endotoxinen in den kleinen Kreislauf und der resultierenden raschen Aktivierung der Endothelzelle zu der beschriebenen lokalen Adhärenz der Zellen kommt. Als weitere Ursache ist der Durchmesser der Lungenkapillaren zu sehen. Dieser ist schon im gesunden Zustand geringer als der Leukozytenumfang. Solange die Leukozyten sich in einem nicht aktivierten Zustand befinden, sind sie noch relativ verformbar und können sich so durch das Kapillarbett der Lunge bewegen. Bei einer Aktivierung werden die Leukozyten jedoch zunehmend rigide und gewinnen zudem an Volumen. Das führt zum physikalischen Steckenbleiben der Leukozyten im Lungenkapillarbett.

Als Ursache für die Gewebeschäden bei Patienten mit Sepsis nach der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten an das Gefäßendothel wird die Freisetzung von reaktiven Radikalen diskutiert. Zu den Sauerstoffradikalen, welche insbesondere mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Zellwände reagieren und so die Zellwände schädigen, setzen die hypersensibilisierten Granulozyten Stickstoffmonoxid, diverse proteolytische Enzyme wie die Elastase, Kollagenasen und

Kathepsinproteasen und andere lytische Proteine (BPI, Lysozyme etc.) frei.

Diese Wirkstoffe entfalten bei regelgerechter Funktion der neutrophilen Granulozyten ihre lytische Wirkung in den Neutrophilen nach der Fusion von Phagosom mit dem Fremdpartikel und den Granula mit den Wirkstoffen. Bei einer übermäßigen Stimulation der Neutrophilen kann es 1. zu einer frustranen Sekretion der Granulainhalte, 2. zum lokalen Zelltod der Neutrophilen und damit zum Freiwerden der Substanzen, 3. über den Phagozytosevorgang mit gleichzeitiger Fusion von Granula mit den noch nicht vollkommen verschlossenen Phagosom zu einem Freiwerden der lytischen Wirkstoffe sowie 4. bei der lokalen Diapedese und der Gewebemigration der Neutrophilen zu einer kontaktaktivierten Exozytose kommen. Die Wirkstoffe greifen lokal die Endothelzellen, die interzelluläre Matrix sowie Gewebezellen an und führen zu einer Desintegration der Zellen. Die Kontinuität der Gefäßwand ist gestört und externe Matrix liegt frei, an welcher sich sekundär das Gerinnungssystem aktivieren kann.

Somit kommt es über zwei Mechanismen in der Lunge zu einer Beeinträchtigung des Blutflusses: adhärente und physikalisch steckengebliebene Leukozyten behindern den Durchfluß, deren lokal wirksame zytolytische Faktoren führen zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems mit Mikrothrombenbildung. Zu diesen Auswirkungen der Endotoxämie kommt es in den ersten Stunden einer Sepsis, erkennbar unter anderem an den initialen hämodynamischen Veränderungen. Eine Therapie mit Beginn drei Stunden nach Einsetzen dieser Pathomechanismen, kann an deren Verlauf und den primär gesetzten Schädigungen nichts mehr ändern.

Die Adhäsionskaskade verdeutlicht, daß die Leukozyten-Endothel-Interaktion einem fein abgestimmten, kaskadenartigen Regulationsmechanismus unterliegt, der gewährleistet, daß bestimmte Leukozyten-Subpopulationen ihre physiologische Aufgabe in einem adäquaten Funktionszustand zur rechten Zeit am rechten Ort ausüben können. Die physiologische Granulozytenfunktion wird bestimmt durch eine kontrollierte Interaktion von Granulozyten mit Endothelzellen, anderen Leukozyten, Thrombozyten und extrazellulären Matrixkomponenten. Gerät dieses Regelwerk unter dem Einfluß endogener (Zytokine) oder exogener (Endotoxin) Faktoren außer Kontrolle, wie zum Beispiel in einer Sepsis, kann eine Granulozyten-Dysfunktion entstehen, deren fatale Auswirkungen in einer Schädigung der Gefäßwände und auch der extravasalen Gewebe enden können. Die durch Adhäsionsmoleküle vermittelte Granulozyten-Endothel-Interaktion spielt in der Pathophysiologie der Sepsis und der nachfolgenden Kaskade daher eine wichtige Rolle.

#### 5.4 Diskussion des Applikationszeitpunktes von G-CSF

Dies ist die eine Seite der neutrophilen Granulozyten. Auf der anderen Seite ist die anhaltende Leukopenie in der Sepsis als prognostisch sehr ungünstig zu werten. Dies stellte auch die Grundlage für die Applikation des Wachstumsfaktors G-CSF in einer septischen Erkrankung dar. Die negative Auswirkung einer Neutropenie auf die Prognose einer schweren Sepsis wurde schon mehrfach dargestellt und auch in dem verwendeten Sepsis-Klassifizierungssystem APACHE II wird eine Neutropenie berücksichtigt [Knaus 1985]. Dabei tritt der initiale Leukozytensturz regelmäßig auf. Problematisch für den Patienten ist eine anhaltende Neutropenie, welche ausgelöst wird durch eine Dysregulation der Zytokine und insbesondere der Wachstumsfaktoren.

Um die Wirkung von appliziertem rhG-CSF in einem Sepsismodell zu erläutern, möchte ich zunächst noch einmal auf die Rolle von endogenem G-CSF in einer Sepsis / Infektion eingehen.

Verschiedene Studien konnten G-CSF in septischen Patienten und in experimenteller Endotoxämie nachweisen. Der Verlauf folgt dabei ebenso wie bei den meisten Zytokinen einem Anstieg mit einem Maximum im Verlauf der Sepsis und einem nachfolgenden Abfall bis auf Ausgangswerte. Der Peak der G-CSF-Konzentration liegt etwa 3 Stunden nach einem traumatischen Insult mit Werten von 400 bis 500 pg/ml. Er fällt innerhalb eines Tages deutlich ab und erreicht nach Tagen Werte im Normalbereich (< 30 pg/ml) [Kiryama 1993]. In septischen Patienten konnten anhaltend erhöhte G-CSF-Konzentrationen im Serum nachgewiesen werden, hier lag der Maximalwert im Bereich von 4500 pg/ml, danach blieben die Konzentrationen bis zur Rekonvaleszenz bei 150 pg/ml [Tanaka 1996].

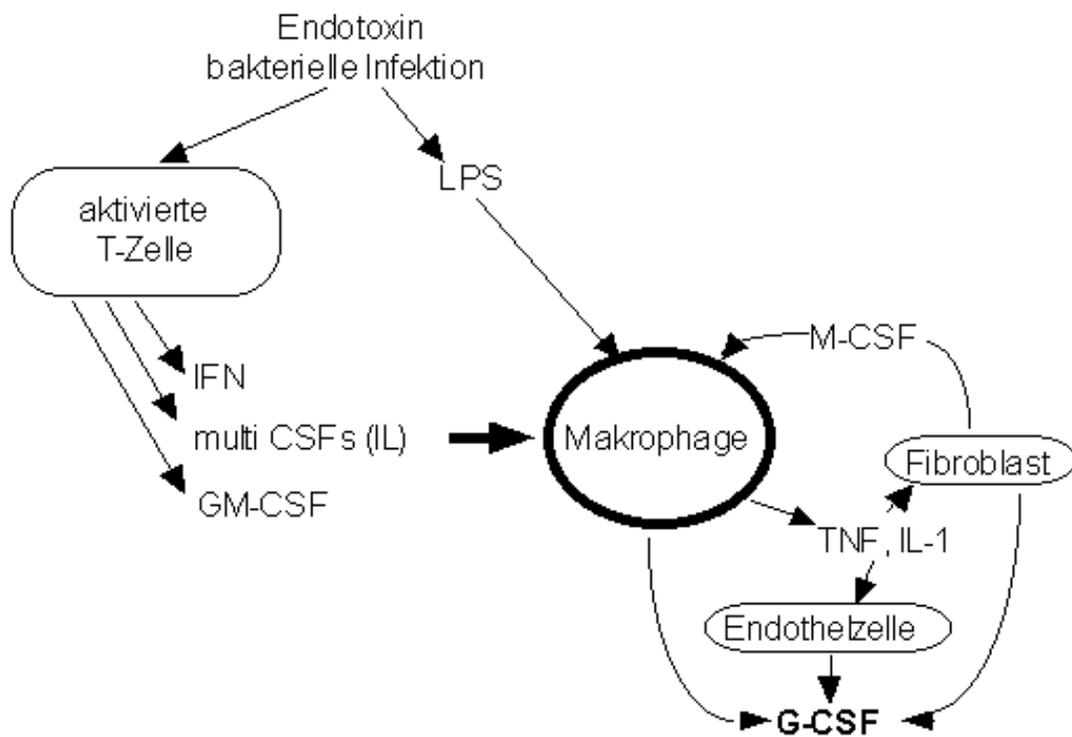


Abbildung 4: Makrophagenstimulation und G-CSF

Dieser endogene Anstieg von G-CSF im Serum kann jedoch dem initialen Leukozytensturz nicht ausreichend entgegen wirken, wie man an den initialen Veränderungen der Leukozytenzahlen in beiden Gruppen erkennen kann. Daß das endogene G-CSF nicht ausreicht, den Mehrbedarf an neutrophilen Granulozyten durch eine Neurekrutierung ausgleichen zu können, liegt sicherlich an einer gewissen Latenzzeit, welche das G-CSF in seiner Wirkung auf das Knochenmark hat. Studien an gesunden Probanden konnten im Gegenteil nach einer G-CSF-Gabe eine initiale Neutropenie beobachten. Dies ist durch die Aktivierung der zirkulierenden Neutrophilen mit Induzierung der oben beschriebenen Adhärenz-Phänomene zu erklären. Erst im Verlauf der nächsten Stunden kommt es zu einem allmählichen Anstieg der Leukozytenzahlen im peripheren Blut.

In der Sepsis werden diese aus dem Knochenmark freigesetzten Zellen sofort wieder in den geschädigten Gefäßen abgefangen. Da die Lunge das erste Organ nach dem Herzen ist, welches die Blutzellen nach ihrem Übertritt in die Zirkulation passieren müssen, reichern sich hier die gleichfalls aktivierten Leukozyten weiter an. Der endogene Knochenmarksstimulus reicht nicht aus, genügend Leukozyten zu rekrutieren, um die Leukopenie zu überwinden. Dies ist an Hand der Veränderungen des kleinen Blutbildes unserer Kontrolltiere zu ersehen (s. S. 77).

Mit einer therapeutischen Applikation von G-CSF drei Stunden nach Einsetzen einer Sepsis kommt man somit genau in den Bereich des endogenen Peaks. Wiederholt hohe G-CSF-Konzentrationen im Serum führen neben der sofortigen Rekrutierung der Neutrophilen aus dem vorhandenen Knochenmarkpool zu einer Aktivierung der Hämatopoese im Sinne einer Verkürzung. Während die Granulozytopoese im gesunden Organismus gut sieben Tage dauert, werden Neutrophile unter hohen G-CSF-Gaben schneller nachgebildet. Diese Verkürzung ist vorwiegend auf die Reduktion der Reifungsphase zwischen letzter Zellteilung und dem Übertritt in die Zirkulation von sechs Tagen auf bis unter drei Tagen zurückzuführen. Somit könnte unsere in den G-CSF-Tieren induzierte Leukozytose auf zwei aufeinanderfolgende Mechanismen beruhen. In einer ersten Phase innerhalb der ersten drei bis vier Tage kommt es durch die hohe G-CSF-Konzentration zu einer übermäßigen Entleerung des Knochenmarkpools. Eine gleichzeitig stattfindende Stimulation der Granulopoese resultiert erst im weiteren Verlauf in der Rekrutierung von neugebildeten Neutrophilen. Dies würde einen leichten Einbruch in der aufsteigenden Leukozytenkurve bei 96 Stunden *post infectionem* erklären, wie wir ihn in den Tagesverläufen beobachten konnten.

## 5.5 Wirkung von G-CSF auf die neutrophilen Granulozyten

Wie bereits erwähnt wirkt G-CSF jedoch nicht nur regulatorisch auf die Granulopoese. Es moduliert auch die Aktivität und Funktion der bereits ausgereiften Neutrophilen.

1. G-CSF beeinflusst die Chemotaxis der Neutrophilen. Dies geschieht in zweierlei Hinsicht. In niedriger Konzentration

fördert G-CSF die Chemotaxis auf eine chemotaktische Substanz hin, in höherer Konzentration dagegen hemmt G-CSF die Antwort der Neutrophilen auf einen chemotaktischen Stimulus [Wang 1988].

2. G-CSF vermag die Phagozytose der Neutrophilen zu steigern. Nach Applikation von rhG-CSF in gesunde Probanden konnte Turzanski eine Steigerung der Bakterienphagozytose *ex vivo* zeigen [Turzanski 1997]. Neben der Steigerung der Phagozytoseaktivität über die vermehrte Expression der dazu nötigen Rezeptoren, ist auch der Folgeprozeß stimuliert: G-CSF vermag die zytotoxische und bakterizide Aktivität der Neutrophilen zu steigern. Beschrieben ist hier insbesondere die Induktion des "respiratory burst" nach G-CSF-Applikation durch LPS [Ohsaka 1989, Turzanski 1997].

3. Über eine vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle  $\beta_2$ -Integrin (CD11/CD18-Komplex) kann G-CSF eine Sequestration der Neutrophilen mit Förderung der Emigration induzieren. Dies führt zu den oben beschriebenen Phänomenen.

4. Im Gegensatz dazu werden die Adhäsionsmoleküle L-Selektin (CD62L) von der Oberfläche der Neutrophilen abgeworfen, was zu einem verminderten Rollphänomen der Zellen an den Gefäßwänden führen kann. Primärer Effekt dieses Mechanismus ist die Rekrutierung der Neutrophilen aus peripheren Pools.

5. G-CSF verzögert den programmierten Zelltod (Apoptosis). Neben der Verlängerung des gesamten Lebenszyklus der neutrophilen Granulozyten ist unter G-CSF auch die Zirkulationszeit um etwa zehn Stunden erhöht.

Wie alle Zellmodulatoren wirkt G-CSF über membranständige spezifische Rezeptoren auf die Zelle. Die Rezeptoren konnten bislang nur - mit Ausnahme von Plazentazellen - auf Neutrophilen-Vorläuferzellen und den muren Neutrophilen nachgewiesen werden. G-CSF findet seine Effektorzellen somit nur in der Neutrophilen-Reihe. Sämtliche Reaktionen im Organismus auf eine G-CSF-Gabe hin müssen also über die neutrophilen Granulozyten vermittelt werden. Bei den oben beschriebenen Phänomenen kann dies leicht nachvollzogen werden. Komplexer ist die Wirkung des G-CSF auf die TNF- $\alpha$  -Konzentration. Verschiedene Studien konnten bei einer G-CSF-Applikation eine reduzierte TNF- $\alpha$  -Ausschüttung im Vergleich zu einer jeweils unbehandelten Gruppe nachweisen [Görgen 1992, Haberstroh 1995]. TNF- $\alpha$  stammt bekanntermaßen vorwiegend aus Zellen der Monozyten / Makrophagen-Reihe, die restlichen Quellen (z. B. Lymphozyten, Keratinozyten) dürften insbesondere in der initialen reichlichen Freisetzung keine bedeutende Rolle spielen. Eine direkte Wirkung von G-CSF auf die Monozyten kann ausgeschlossen werden und was auch von Görgen *et al.* sowie Terashima *et al.* experimentell nachgewiesen wurde [Görgen 1992, Terashima 1995]. Wie die neutrophilen Granulozyten die TNF- $\alpha$  -Freisetzung der Monozyten inhibieren, ist immer noch nicht exakt aufgeklärt. Daß es über einen direkt von Zelle zu Zelle vermittelten Mechanismus laufen muß, konnten Terashima und Mitarbeiter 1995 *in vitro* zeigen [Terashima 1995]. Über ein intrazelluläres Färbeverfahren konnten sie auch nachweisen, daß es sich um eine Suppression der TNF- $\alpha$  -Synthese handeln könnte. Die Suppression konnte dabei nur im Beisein der Neutrophilen ausgelöst werden, eine Zugabe von Kulturüberständen der stimulierten Neutrophilen erreichte keine Reduktion der TNF- $\alpha$  -Ausschüttung. Die Hemmung der Monozyten-TNF- $\alpha$  -Synthese scheint ein negativer Feedback-Mechanismus zu sein, um die Monozyten vor einer übermäßigen Ausschüttung von TNF- $\alpha$  , sowie den Organismus vor einem weiteren Anstieg der dann durchaus schädlichen TNF- $\alpha$  -Konzentration zu schützen. Diese und ähnliche Mechanismen könnten auch eine Erklärung für den Verlauf der TNF- $\alpha$  -Kurve in einem septischen Geschehen sein (schnelle Reduktion der Konzentration nach einem Maximum). Erfolgt die Gabe von G-CSF vor Induktion einer bakteriellen Sepsis oder vor exogener Applikation von Endotoxin, so ist eine Reduktion des TNF- $\alpha$  -Peaks 90 bis 180 Minuten *post infectionem* im Vergleich zu den Kontrollgruppen festzustellen [Görgen 1992, Haberstroh 1995]. Mit einer Gabe von G-CSF drei Stunden nach der Sepsisinduktion liegt man direkt hinter diesem initialen TNF- $\alpha$  -Peak. Er ist durch das G-CSF nicht mehr zu beeinflussen. Bei einer grundsätzlich reduzierenden Wirkung der durch G-CSF stimulierten Neutrophilen auf die TNF- $\alpha$  -Freisetzung durch monozytäre Zellen, könnte jedoch die weiter anhaltende TNF- $\alpha$  -Sekretion vermindert werden. Um dies zu untersuchen, haben wir die TNF- $\alpha$  -Menge, welche über die gesamte Versuchsphase freigesetzt wurde, summiert und dargestellt (s. S. 89).

Wie schon bei den Spitzenwerten dargestellt (s. S. 87), ist kein deutlicher Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den G-CSF-Therapietieren in den initialen Stunden zu sehen. Die nach Einsetzen der G-CSF-Therapie insgesamt freigesetzte Menge liegt zwar in der G-CSF-Gruppe etwas über der TNF- $\alpha$  -Menge der Kontrollgruppe, aber mit einem  $p = 0,49$  ist der Unterschied weit außerhalb der Signifikanzgrenzen. Würde sich eine Erhöhung der TNF- $\alpha$  -Freisetzung unter einer G-CSF-Therapie in weiteren Studien mit höherer Tierzahl und einer Verlängerung der Beobachtungsdauer aber bestätigen, könnte dies in einer proinflammatorischen Wirkung des Wachstumsfaktors begründet sein mit einem in diesem Fall positiven Feedback auf die mononukleären Phagozyten. Ein Einfluß der Neutrophilen auf die TNF- $\alpha$  -Liberation durch die Monozyten im Sinne einer Reduktion scheint sich unseren Ergebnissen nach auf die Phase der Hypersensibilisierung der Zellen zu beschränken. Oder anders ausgedrückt, eine zusätzliche G-CSF-Gabe kann die Neutrophilen nicht zu einer anhaltenden Monozyten-Suppression aktivieren. Es bleibt zukünftigen Studien, zu

untersuchen, ob eine G-CSF-Gabe in späteren Sepsisphasen über die Neutrophilen wirklich eine proinflammatorische Wirkung entfaltet. In diesem Falle bleibt hier noch einmal zu bemerken, daß eine proinflammatorische Stimulierung in einer verzögerten Phase der Sepsis durchaus gefordert werden kann, da hier die immunsuppressive Wirkung einer Hyperaktivierung in der Initialphase (welche zur Reaktionslosigkeit der Zellen gegenüber bestimmten Stimulantien führt [Stadler 1995]) anhält.

## 5.6 Immunsuppression in der Sepsis

Im Verlauf einer Sepsis kommt es über die Hypersensibilisierung der Entzündungszellen durch die initial freigesetzten proinflammatorischen Zytokine zu einem Ingangsetzen der antiinflammatorischen Konterregulation. Kortikosteroide der Nebennierenrinde wirken inhibitorisch auf eine Zytokin-Produktion. Die Zytokine IL-10 und Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) werden aus Entzündungszellen freigesetzt und wirken über verschiedene Suppressionsmechanismen (insbesondere reduzierend auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine) einer weiteren Steigerung der Entzündungsreaktion entgegen. Bei der Zellaktivierung durch die proinflammatorisch wirksamen Zytokine mit der Aktivierung der Phospholipase werden im folgenden nicht nur die proinflammatorischen Eicosanoide Thromboxan, Leukotriene und PAF freigesetzt, sondern auch das Prostaglandin E<sub>2</sub>. PG E<sub>2</sub> wirkt inhibitorisch auf die IL-2-Produktion wirkt und reduziert die zytotoxische Potenz einiger Killerzellen. Auch das in der Endotoxämie freigesetzte Radikal Stickstoffmonoxid besitzt neben seiner zytotoxischen und proinflammatorischen eine entgegengesetzte Wirkung. Es hemmt die Proliferation von Makrophagen, Granulozyten und Gewebezellen. Als Antwort auf eine hohe Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen im Kreislauf werden systemisch auch Antagonisten sowie lösliche Rezeptoren der Zytokine freigesetzt. Beispiele hierfür sind die Rezeptoren für TNF- $\alpha$ , sowie die beiden Rezeptoren für IL-1 (IL-1RI und IL-1RII). An identifizierbaren Zytokin-Antagonisten hat bislang insbesondere der IL-1 Rezeptorantagonist Bedeutung erlangt. Neben dieser aktiven Unterdrückung der systemischen Entzündungsreaktion kommt es aber auch zu unspezifischen Erschöpfungszuständen in einer prolongierten Sepsis. Dies spielt einerseits in der Leber eine Rolle, wo die Akut-Phase-Proteine nicht mehr in ausreichender Menge gebildet werden, wie auch im Knochenmark, wo es zu einer Knochenmarksinsuffizienz kommt. Dies schwächt die Abwehrleistung natürlich ganz besonders. Es werden nicht nur weniger, sondern auch defekte Abwehrzellen gebildet. Grund für diese Knochenmarksinsuffizienz ist einerseits der relative Mangel an Wachstumsfaktoren [Gillan 1993], andererseits Mediatoren, welche die Proliferation von Zellen negativ beeinflussen können. Hierzu zählt, wie bereits erwähnt, das Stickstoffmonoxid.

Daß das Zusammenspiel der pro- und antiinflammatorischen Zytokine auch Auswirkungen auf die Überlebensdauer der neutrophilen Granulozyten hat, konnten Ertel *et al.* in einer aktuellen Studie zeigen [Ertel 1997]. Während die antiinflammatorischen Zytokine die Apoptosis der Granulozyten reduzierte und so die Anzahl und Lebensdauer vitaler Zellen im peripheren Blut steigerte, kann dieser Effekt durch die proinflammatorischen Mediatoren aufgehoben werden. Dies entspricht wiederum dem immunsupprimierten Status in der initialen Schockphase.

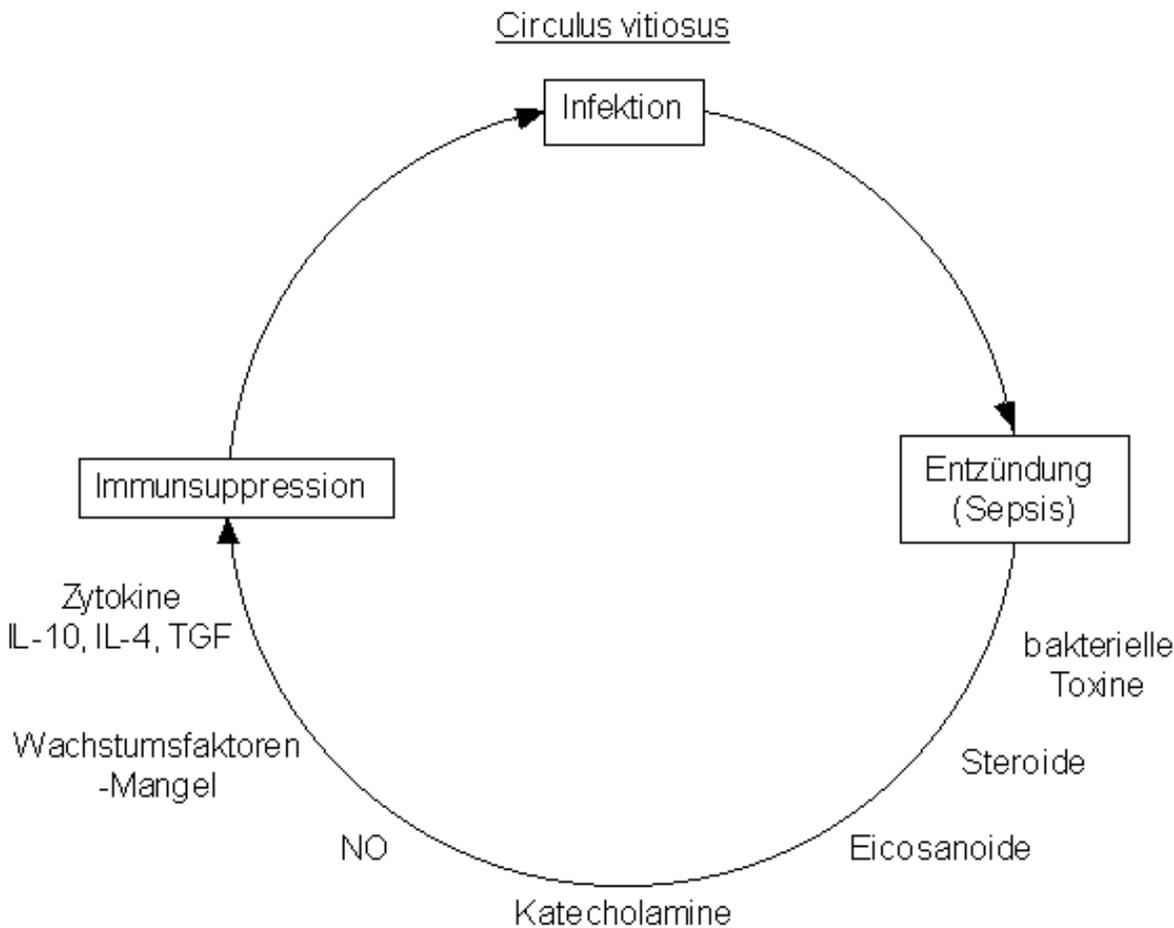


Abbildung 5, nach *Thiel 1996b*: der Circulus vitiosus der Immunsuppression

In der Intensivmedizin kommt es darüber hinaus durch die polypragmatischen Medikation septischer Patienten, über eine allmähliche Vergiftung und ein Versagen von Leber und Niere zu der Beeinträchtigung von Zellwachstum und -differenzierung. Aus diesem Grunde kann es durchaus von Nutzen sein, Wachstumsfaktoren, welche prinzipiell einen proinflammatorischen Charakter haben, in einer prolongierten Sepsis und im Multiorganversagen mit der Entwicklung einer Immunsuppression einzusetzen.

Der Anstieg der Leukozytenzahlen ist ein Zeichen, daß man mit einer Gabe von Granulozyten-Wachstumsfaktoren zu einem Zeitpunkt des Leukozyteneinbruchs, die Anzahl der zur Verfügung stehenden funktionsfähigen unspezifischen Abwehrzellen wieder in Bereiche heben kann, in welchen eine körpereigene Erregerabwehr effektiv stattfinden kann. Daß wir in dieser Studie keine protektive Wirkung trotz der enormen Leukozytensteigerung nachweisen konnten, kann auch an dem Modell einer kontinuierlichen intravenösen Keiminfusion liegen. Bei einer Sepsis, ausgehend von einer lokalen Infektion (Peritonitis, Pneumonie, etc.) oder einer kurzfristigen Keiminfusion mit eventueller zeitlich deutlich abgesetzter Wiederholung (Modell eines intermittierend streuenden Herdes), könnten die Konsequenzen deutlicher in einen positiv wirksamen Charakter führen. Das Manko an einer intravenösen Keimdauerinfusion kann einerseits in dem anhaltenden Nachschub an vitalen Erregern liegen, welche die Abwehrzellen trotz Anstieg nicht zu bewältigen vermögen. Andererseits kann es durch die andauernde Endotoxinfreisetzung im gesamten Gefäßsystem zu einer systemischen Hyperaktivierung der zirkulierenden Leukozyten wie auch der Endothelzellen kommen. Die Abwehrzellen liegen zwar in erhöhter Anzahl vor, können aber durch die anhaltende "Rundumaktivierung" ihre Mechanismen zur Erregerbekämpfung nicht gezielt einsetzen.

### 5.7 Konsequenzen aus unseren Ergebnissen:

Eine Therapie mit rhG-CSF in der manifestierten Sepsis bringt aus unserer Sicht bei nicht-neutropenischen Patienten keine zusätzliche positive Wirkung. Da wir keine fatalen Auswirkungen durch die Leukozytensteigerung feststellen konnten, ist die manifestierte Sepsis auch am nicht-neutropenischen Patienten keine absolute Kontraindikation. Unter dem Aspekt der Ineffektivität einer additiven rhG-CSF-Therapie und der Kosten-Nutzen-Analyse ist aber von einer rhG-CSF abzuraten. Um die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut zu steigern, muß rhG-CSF

mindestens täglich appliziert werden. Bei einer anhaltenden Sepsis über mehrere Tage steigen so die Kosten bald in Tausender Bereiche (eine Tagesdosis liegt bei etwa DM 430,-).

### 5.8 Änderungsvorschläge für zukünftige Sepsis-Studien unter Verwendung von rhG-CSF:

1. Um die Mortalität und die klinische Verbesserung einer septischen Infektion unter einer Therapie beurteilen zu können, sollte der Beobachtungszeitraum weiter verlängert werden. Dies bedeutet zwar einen erheblichen Aufwand für das betreuende Personal, jedoch ist zu überlegen, ob nach einer initialen intensiv zu überwachenden Phase nicht die Katheter bei entsprechendem klinischen Bild entfernt werden können. Die Tiere können dann ohne das umfassende Monitoring bis zu einem endgültigen Abbruch der Versuchsphase gehalten werden. Diese Überlegung ergab sich in unserer Studie wiederholt, als Tiere im Verlauf der Sepsis eine konstante Besserung in klinischen und hämodynamischen Parametern zeigten, unabhängig von der Therapiestrategie.

2. Um das Studienmodell weiter an klinische Verhältnisse anzupassen, sollte überlegt werden, ob man die Bakteriendauerinfusion nicht nach einer gewissen Zeit beendet. Um einen streuenden Herd zu imitieren, kann auch eine Keiminfusion in einem gewissen Abstand wiederholt werden. So kann sich auch der Organismus bzw. das Abwehrsystem zwischenzeitlich erholen und wird nicht konstant überfordert. Dies spielt insbesondere bei dem Ziel einer Steigerung der unspezifischen Abwehrleistung (wie auch der spezifischen) eine Rolle. Bei einer Überflutung mit Krankheitserregern, wie sie im normalen klinischen Geschehen seltener vorkommt, kann das Abwehrsystem nicht voll effektiv arbeiten und eine Infektion oder zumindest deren fatalen Auswirkungen verhindern.

3. Es wäre interessant, vor allem unter einer G-CSF-Therapie in der verlängerten Sepsis die Funktion der neutrophilen Granulozyten, wie auch der anderen Abwehrzellen zu überprüfen. Konkret gibt es hier verschiedene Möglichkeiten, z. B. die Phagozytoserate, den "respiratory burst", die Freisetzung von Stickstoffmonoxid oder die Freisetzung von Zytokinen und Mediatoren wie auch die Exprimierung von Oberflächen-Antigenen in Vollblutproben zu bestimmen. So kann überprüft werden, ob unter einer G-CSF-Therapie in der Sepsis die Funktionsfähigkeit der Granulozyten wirklich voll ausgebildet ist. Dies ist zwar aus *in vitro* Studien beschrieben. Da wir in unserer Studie keinen Effekt auf die Blutgase, die Freisetzung granulozytärer Mediatoren (LNPI, NO) trotz erheblicher Steigerung der Leukozytenzahl hatten, stellt sich hier die Frage, ob diese induzierten Granulozyten wirklich das gleiche Reaktionsschema aufweisen, wie die Granulozyten der Kontrollgruppe, welche nicht durch G-CSF-Applikation stimuliert wurden.

4. Es sollte in künftigen Studien auch eine Selektion der Tiere hinsichtlich ihrer Leukozytenzahlen *prä infektionem* und / oder im Leukozytensturz gemacht werden. Die Berücksichtigung der Leukozytenkonzentration sollte einer Beeinflussung der Studie durch diesen erheblichen Faktor entgegenwirken. So konnte Smith in seiner Studie an Kaninchen eine deutliche Mortalitätssenkung unter einer G-CSF-Therapie nur bei leukopenischen Tieren feststellen [Smith 1995]. Dies bedeutet einen erheblichen Mehraufwand an Tieren, da zusätzliche Gruppen gebildet werden müssen, bzw. einzelne Tiere, welche zwar schon auf die Studie vorbereitet wurden, aber dann aufgrund abweichender Leukozytenzahlen aus der Studie ausgeschlossen werden müssen.

5. Des Weiteren bleibt zu überprüfen, ob der hier festgestellte Effekt von rhG-CSF auf die Sepsis nicht dosisabhängig ist. So konnte insbesondere in *in vitro* Studien gezeigt werden, daß die Wirkung von G-CSF auf neutrophile Granulozyten durchaus konzentrations- (dosis-) abhängig ist.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Studie wurde die Wirkung von rhG-CSF auf die gramnegative Sepsis am nicht sedierten Schwein untersucht. Berücksichtigt wurden insbesondere der klinische Verlauf, die hämodynamischen Parameter, die Blutgase sowie einzelne Mediatoren. Der Wachstumsfaktor wurde zur Simulation von klinischen Verhältnissen drei Stunden nach Induktion der *Pseudomonas aeruginosa*-Sepsis appliziert und danach wiederholt alle 24 Stunden. In der G-CSF-Therapiegruppe wurden 7 und in einer Kontrollgruppe 10 Tiere verwendet. Die Untersuchungsdauer wurde mit 120 Stunden angesetzt. 5 Tiere der G-CSF-Gruppe sowie 5 Tiere der Kontrollgruppe erreichten den Endpunkt der Studie (71 % bzw. 50 %). Tiere, die den Wachstumsfaktor erhielten, reagierten circa 24 Stunden nach der ersten Applikation mit einem gegenüber der Kontrollgruppe erhöhten Leukozytenzahl im peripheren Blut. In der dritten Phase (Stunde 60 bis 120) wurden in dieser Gruppe 140 % des Ausgangswertes der Leukozyten erreicht. Außer diesem Anstieg konnten wir keine signifikanten Unterschiede in den untersuchten Parametern zwischen der Kontrollgruppe und der G-CSF-Therapiegruppe feststellen.

Die neutrophilen Granulozyten gelten allgemein als die Haupteffektoren der Organschädigungen in einer septischen Erkrankung. Sie werden in diesem Geschehen durch die Mediatoren Endotoxin, TNF- $\alpha$ , IL-1 und andere zu einer Adhäsion und Emigration in das Gewebe sowie zu einer Produktion und Freisetzung von zellschädigenden Enzymen und Radikalen stimuliert. Dies manifestiert sich primär in der Lunge.

In der untersuchten G-CSF-Gruppe stieg der Leukozytengehalt in der letzten Phase auf 162 % des Wertes der Kontrollgruppe. Dennoch konnten wir keine verstärkten Lungenschädigungen feststellen. Dies liegt vermutlich vorwiegend in der veränderten Reaktionslage der induzierten Granulozyten, welche durch den Wachstumsfaktor zwar stimuliert werden, unter der Wirkung des G-CSF aber auch die Adhäsionsmoleküle CD62L von ihrer Oberfläche abstoßen und so weniger an der Gefäßendothel haften.

In Übereinstimmung mit einer klinischen Studie an Sepsis- und SIRS-Patienten mit einer niedrigeren Filgrastim-Dosierung als die von uns eingesetzte [Gross-Weege 1997], können wir somit durch die therapeutische Applikation von G-CSF am nicht-neutropenischen Schwein keine negativen Effekte aufzeigen, es fehlen uns aber auch Hinweise auf eine nützliche Wirkung des Faktors auf die gramnegative Sepsis. Unter diesem Aspekt und unter Berücksichtigung der erheblichen Kosten einer solchen additiven Therapie, sollte die Gabe von rhG-CSF beim septischen nicht-neutropenischen Patienten kritisch beurteilt werden.

## 7 Summary

### ***Pseudomonas aeruginosa* sepsis in the non-anesthetized pig: effect of the granulocyte colony-stimulating factor Filgrastim on hemodynamic and clinical course**

In this study the effect of rhG-CSF on the Gram-negative sepsis in the not sedated pig were investigated. The clinical course, hemodynamic parameters, the blood gas conditions and different mediators were considered. For a simulation of the clinical situation the growth factor was given 3 hours after the induction of a *P. aeruginosa* septicemia and repeated every 24 h afterwards. We used 7 animals in the G-CSF group and 10 in the control group. The observation period was appointed to 120 hours. 5 animals of the G-CSF group and 5 of the controls attained the endpoint (71 % and 50 % respectively). Those animals who received the growth factor, responded within 24 h of the first application with a increased leukocyte count in the peripheral blood compared with the control. The level reached 140 % of the baseline count in this group. Apart from these increase we could not ascertain any significant distinctions in the investigated parameters between the control and the G-CSF group.

The neutrophilic granulocyte are valid as the main effectors of the organ injury in a septicemic disorder. In these occurrence they are stimulated by the mediators endotoxin, TNF- $\alpha$ , IL-1 and others to adhesion and emigration in the tissue as well as to the production and liberation of cytotoxic enzymes and radicals. This is primary manifested in the lung.

In the investigated G-CSF group the leukocyte count increased in the last phase up to 162 % of the control level. Nevertheless we could not find out any enhanced lung injuries. Presumably this is mainly caused by the changed reactions of the induced granulocytes, which are sure stimulated by the growth hormone, but which as well shed the adhesion molecules CD62L from their surface, so that they are less adhesive to the endothelium.

So with the therapeutical application of G-CSF in the non-neutropenic pig we could not show any negative effects, but we also do not have benefit to the Gram-negative sepsis. By this aspect and in consideration of the high costs of such an additive therapy one should do without G-CSF in the non-neutropenic patient with *Pseudomonas* sepsis.

## 8 Anhang

### 8.1 Literaturverzeichnis

**Aasen A. O., Smith-Erichsen N., Amundsen E.**  
Plasma kallikrein-kinin-system in septicemia

Arch. Surg. 1983; 118: 343-346

**Alexander H. R., Doherty G. M., Venzon D. J., Merino M. J., Fraker D. L., Norton J. A.**

Recombinant interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra): effective therapy against gram-negative sepsis in rats  
Surgery 1992; 112: 188-193

**Asensio J. A., Demetriades D., Berne T. V., Shoemaker W. C.**

Invasive and noninvasive monitoring for early recognition and treatment of shock in high-risk trauma and surgical patients  
Surg. Clin. North Am. 1996; 76: 985-997

**Bagby G. C. Jr., Dinarello C. A., Wallace P., Wagner C., Hefeneider S., McCall E.**

Interleukin-1 stimulates granulocyte macrophage colony-stimulating activity release by vascular endothelial cells  
J. Clin. Invest. 1986; 78: 1316-1323

**Baumann H., Gauldie J.**

The acute phase response  
Immunol. Today 1994; 15: 74-80

**Bispe J., Gatell J. M., Puig J., Mallolas J., Martinez J. A., Jimenez de Anta M. T., Soriano E.**

*Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: Univariate and multivariate analysis of factors influencing the prognosis in 133 episodes  
Rev. Infect. Dis. 1988; 10: 629-635

**Bodey G. P., Jadeja L., Elting L.**

*Pseudomonas* bacteremia: Retrospective analysis of 410 episodes  
Arch. Intern Med. 1985; 145: 1621-1629

**Böhm M., Gierschik P., Jakops K.-H., Kemkes B., Schnabel P., Erdmann E.**

Mechanismus der verminderten Katecholaminwirkung im Schock und bei Herzinsuffizienz  
Intensivmed. 1989; 26 (Suppl. 1): 55-59

**Bone R. C., Balk R. A., Cerra F. B., Dellinger R. P., Fein A. M., Knaus W. A., Schein R. M. H., Sibbald W. J.**

Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis  
Chest 1992; 101: 1644-1655

**Bradley T. R., Metcalf D.**

The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*  
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 1966; 44: 287-299

**Breuer H. E.**

Einfluß der täglichen Applikation von rhG-CSF auf den Verlauf der gramnegativen Sepsis beim wachen Schwein  
Dissertation 1994

**Bronchud M. H., Potter M. R., Morgenstern G., Blasco M. J., Scarffe J., Thatcher N., Crowther D., Souza L. M., Alton N. K., Testa N. G.**

*In vitro* and *in vivo* analysis of the effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients  
B. J. Cancer. 1988; 58: 64-69

**Broudy V. C., Kaushansky K., Segal G. M., Harlan J. M., Adamson J. W.**

Tumor necrosis factor type  $\alpha$  stimulates human endothelial cells to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83: 7467-7471

**Cannon J. G., Tompkins R. G., Gelfand J. A., Michie H. R., Stanford G. G., van der Meer J. W., Endres S., Lonnemann G., Corsetti J., Chernow B.**

Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever  
J. Infect. Dis. 1990; 161: 79-84

**Carnot P., Deflandre C.**

Sur l'activité hémapoïétique des différents organes au cours de la régénération du sang  
CR Hebd. Acad. Sci. 1906; 143: 432-435

**Cendan J. C., Moldawer L. L., Souba W. W., Copeland E. M. 3rd, Lind D. S.**

Endotoxin-induced nitric oxide production in pulmonary artery endothelial cells is regulated by cytokines  
Arch. Surg. 1994; 129: 1296-1300

**Cohen A. B., Rossi M.**

Neutrophils in normal lung  
Am. Rev. Resp. Dis. 1983; 127: S9-S15

**De Haas M., Kerst J. M., van der Schoot C. E., Hack C. E., Calafat J., Nuijen J. H., Roos D., van Oers R. H. J., von dem Borne A. E. G. Kr.**

rG-CSF administration to healthy volunteers: immediate effects on circulating neutrophils  
Blood 1994; 84: 3885-3894

**Devereux S., Linch D. C., Campos Costa D., Spittle M. F., Jelliffe A. M.**

Transient leukopenia induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
Lancet 1987; 2: 1523-1524

**Dhainaut J. F., Lanore J. J., de Gournay J. M., Huyghebaert M. F., Brunet F., Villemant D., Monsallier J. F.**

Right ventricular dysfunction in patients with septic shock  
Intensive Care Med. 1988; 14: 488-491

**DiPersio J., Billing P., Kaufman S., Eghtesady P., Williams R. E., Gasson J. C.**

Characterization of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor  
J. Biol. Chem. 1988; 263: 1834-1841

**Dittmer H., Jochum M., Fritz H.**

Freisetzung von granulozytärer Elastase und Plasmaproteinveränderungen nach traumatisch-hämorrhagischem Schock  
Unfallchirurg. 1986; 89: 160-169

**Duhrsen U., Villeval J. L., Boyd J., Kannurakis G., Morstyn G., Metcalf D.**

Effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients  
Blood 1988; 72: 2074-2080

**Ertel W., Keel M., Ungethum U., Trentz O.**

Pro-inflammatory cytokines regulate apoptosis of granulocytes during systemic inflammation  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Kongressbd. 1997; 114: 627-629

**Fegler G.**

Measurement of cardiac output in anaesthetized animals by a thermodilution method  
Quart. J. Exp. Physiol. 1954; 39: 153-164

**Fein A. M., Grant M. M., Niederman M. S., Kantrowitz M.**

Neutrophil-endothelial cell interaction in critical illness  
Chest 1991; 99: 1456-1462

**Fischer E., Van Zee K. J., Marano M. A., Rock C. S., Kenney J. S., Poutsiaka D. D., Dinarello C. A., Lowry S. F., Moldawer L. L.**

Interleukin-1 receptor antagonist circulates in experimental inflammation and in human disease  
Blood 1992; 79: 2196-2200

**Fisher C. J. J., Opal S. M., Dhainaut J.-F., Stephens S., Zimmerman J. L., Nightingale P., Harris S. J., Schein R. M. H., Panacek E. A., Vincent J.-L., Foulke G. E., Warren E. L.**

Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis  
Crit. Care Med. 1993; 21: 318-327

**Forehand J. R., Pabst M. J., Phillips W. A., Johnston R. B. Jr.**

Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular calcium  
J. Clin. Invest. 1989; 83: 74-83

**Függer R., Zadrobilek E., Götzinger P., Klimann S., Rogy M., Winkler S., Andel H., Mittelböck M., Roth E., Schulz F., Fritsch A.**

Perioperative TNF $\alpha$  and IL-6 concentrations correlate with septic state, organ function, and APACHE II score in intra-abdominal infection

Eur. J. Surg. 1993; 159: 525-529

**Gabrilove J. L., Jakubowski A., Fain K., Grous J., Scher H., Sternberg C., Yagoda A., Clarkson B., Bonilla M. A., Oettgen H. F.**

A phase I study of granulocyte colony-stimulating factor in patients with transitional cell carcinoma of the urothelium  
J. Clin. Invest. 1988; 82: 1454-1461

**Galanos C., Lüderitz O., Rietschel E. T., Westphal O., Brade H., Brade L., Freudenberg M. A., Schade F. U., Imoto M., Yoshimura S., Kusumoto S., Shiba T.**

Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities  
Eur. J. Biochem. 1985; 148: 1-5

**Ganz W., Swan H. C. J.**

Measurement of blood flow by thermodilution  
Am. J. Cardiol. 1972; 29: 241-246

**Gasson J. C., Kaufman S. E., Weisbart R. H., Tomonaga M., Golde D. W.**

High-affinity binding of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to normal and leukemic human myeloid cells  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986; 83: 669-673

**Gatell J. M., Marrades R., el-Ebiary M., Torres A.**

Severe pulmonary infections in AIDS patients  
Semin. Respir. Infect. 1996; 11 (2): 119-128

**Gates D. M.**

Cardiac dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome  
Crit. Care Nurs. 1994; 16 (4): 39-48

**Gillan E., Plunkett M., Cairo M. S.**

Colony-stimulating factors in the modulation of sepsis  
New Horiz. 1993; 1: 96-109

**Glaspy J. A., Golde D. W.**

Clinical applications of the myeloid growth factors  
Semin. Hematol. 1989; 26: 14-17

**Glauser m. P., Zanetti G., Baumgartner J.-D., Cohen J.**

Septic shock: Pathogenesis  
Lancet 1991; 338: 732-736

**Goldfarb R. D., Nightingale L. M., Kish P., Weber P. B., Loegering D. J.**

Left ventricular function during lethal and sublethal endotoxemia in swine  
Am. J. Physiol. 1986; 251: H364-H373

**Görgen I., Hartung T., Leist M., Niehörster M., Tiegs G., Uhlig S., Weitzel F., Wendel A.**

Granulocyte colony-stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor- $\alpha$   
J. Immun. 1992; 149 (3): 918-924

**Goris R. J. A., te Boekhorst T. P. A., Nuytinck J. K. S., Gimbrère J. S. F.**

Multiple-organ failure  
Arch. Surg. 1985; 120: 1109-1115

**Greenman R. L., Schein R. M., Martin M. A., Wenzel R. P., MacIntyre N. R., Emmanuel G., Chmel H., Kohler R. B., McCarthy M., Plouffe J.**

A controlled clinical trial of E5 murine monoclonal IgM antibody to endotoxin in the treatment of gram-negative sepsis. The XOMA Sepsis Study Group  
JAMA 1991; 266: 1097-1102

**Grisham M. B., Everse J., Janssen H. F.**

Endotoxemia and neutrophil activation *in vivo*  
Am. J. Physiol. 1988; 254: H1017-H1022

**Gross-Weege W., Weiss M., Schneider M., Wennig M., Harms B., Dumon K., Ohrmann C.,**

**Röhder H.-D.**

Safety of a low-dosage Filgrastim (rhG-CSF) treatment in non-neutropenic surgical intensive care patients with an inflammatory process

Intensive Care Med. 1997; 23: 16-22

**Haberstroh J., Breuer H., von Specht B.-U.**

Effect of recombinant human Granulocyte Colony Stimulating Factor on hemodynamic and cytokine response in a porcine model of *Pseudomonas* sepsis

Shock 1995; 4: 216-224

**Hack C. E., Nuijens J. H., Felt-Bersma R. J., Schreuder W. O., Eerenberg-Belmer A. J., Paardekooper J., Bronsveld W., Thijs L. G.**

Elevated plasma levels of the anaphylatoxins C3a and C4a are associated with a fatal outcome in sepsis

Am. J. Med. 1989; 86: 20-26

**Hermann F., Oster W., Meuer S. C., Lindemann A., Mertelsmann R. H.**

Interleukin-1 stimulates T lymphocytes to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

J. Clin. Invest. 1988; 81: 1415-1418

**Hesse D. G., Tracey K. J., Fong Y., Manouge K. R., Palladino M. A., Shires G. T., Cerami A., Lowry S. F.**

Cytokine appearance in human endotoxemia and non-human primate bacteremia

Surg. Gynecol. Obstet. 1988; 166: 147-153

**Hinshaw L. B., Emerson T. E. Jr., Taylor F. B. Jr., Chang A. C., Duerr M., Peer G. T., Flournoy D. J., White G. L., Konsanke S. D., Murray C. K.**

Lethal staphylococcus aureus-induced shock in primates: prevention of death with anti-TNF antibody

J. Trauma 1992; 33: 568-573

**Horiguchi J., Warren M. K., Kufe D.**

Expression of the macrophage specific CSF in human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony stimulating factor

Blood 1987; 69: 1259-1261

**Jarvis W. R., Martone W. J.**

Predominant pathogens in hospital infections

J. Antimicrob. Chemother. 1992; 29 (Suppl. A): 19-24

**Jochum M., Gippner-Steppert C., Machleidt W., Fritz H.**

The role of phagocyte proteinases and proteinase inhibitors in multiple organ failure

Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1994; 150: S123-S130

**Jochum M., Machleidt W., Fritz H.**

Proteolysis induced pathomechanisms in acute inflammation and related therapeutic approaches

In: Sies H., Flohe L., Zimmer G. (eds): Molecular aspects of inflammation.

Springer, Berlin Heidelberg New York; 1992; 73-92

**Johnston R. B.**

Monocytes and macrophages

N. Engl. J. Med. 1988; 318: 747-752

**Kaushansky K., Lin N., Adamson J. W.**

Interleukin-1 stimulates granulocyte macrophage and granulocyte colony-stimulating factors: mechanism for the hematopoietic response to inflammation

J. Clin. Invest. 1988; 81: 92-97

**Kiryama R., Chichibu K., Matsuno T., Ohsawa N.**

Sensitive chemoluminescent immunoassay for granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in clinical applications

Clin. Chim. Acta 1993; 220: 201

**Knaus W. A., Draper E. A., Wagner D. P.**

APACHE III study design: analytic plan of severity and outcome in intensive care unit patients. Introduction

Crit. Care Med. 1989; 17: S176-S180

**Knaus W. A., Draper E. A., Wagner D. P., Zimmerman J. E.**

APACHE II: A severity of disease classification system  
Crit. Care Med. 1985; 13: 818-829

**Knaus W. A., Zimmerman J. E., Wagner D. P., Draper E. A., Lawrence D. E.**

APACHE-acute physiology and chronic health evaluation: a physiologically based classification system  
Crit. Care Med. 1981; 9: 591-597

**Koeffler H. P., Gasson J., Ranyard J., Souza L., Shepard M., Munker R.**

Recombinant human TNF  $\alpha$  stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor  
Blood 1987; 70: 55-59

**Komatsu Y., Matsumoto T., Kuga T.**

Cloning of granulocyte colony-stimulating factor cDNA from human macrophages and its expression in *Escherichia coli*  
Jpn. J. Cancer Res. 1987; 78: 1179-1181

**Kraft W., Dürr U.**

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin  
3. Aufl. - Schattauer Stuttgart New York; 1995

**Kragsbjerg P., Holmberg H., Vikerfors T.**

Dynamics on blood cytokine concentrations in patients with bacteremic infections  
Scand. J. Infect. Dis. 1996; 28: 391-398

**Kreimeier U., Brueckner U. B., Gerspach S., Veitinger K., Messmer K.**

A porcine model of hyperdynamic endotoxemia: Pattern of respiratory, macrocirculatory, and regional blood flow changes  
J. Invest. Surg. 1993; 6: 143-156

**Kumar A., Thota V., Dee L., Olson J., Uretz E., Parrillo J. E.**

Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  are responsible for *in vitro* myocardial cell depression induced by human septic shock serum  
J. Exp. Med. 1996; 183: 949-958

**Loppnow H., Flad H. D., Rietschel E. T., Brade H.**

The active principle of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) for cytokine induction  
In: Schlag G., Redl H. (eds): Pathophysiology of shock, sepsis, and organfailure  
Springer, Berlin Heidelberg New York; 1993; 405-416

**Maki D. G.**

Risk factors for nosocomial infection in intensive care  
Arch Intern Med. 1989; 149: 30-35

**Mallolas J., Gatell J. M., Miro J. M., Marco F., Bispe J., Jimenez de Anta M. T., Soriano E.**

Analysis of prognostic factors in 274 consecutive episodes of *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia  
Antibiot. Chemother. 1991; 44: 106-114

**Matthews J. N. S., Altman D. G., Campbell M. J., Royston P.**

Analysis of serial measurements in medical research  
BMJ 1990; 300: 230-235

**Mermel L. A., Maki D. G.**

Bacterial Pneumonia in solid organ transplantation  
Semin. Respir. Infect. 1990; 5 (1): 10-29

**Michie H. R., Guillou P. J., Wilmore D. W.**

Tumor necrosis factor and bacterial sepsis  
Br. J. Surg. 1989; 76: 670-671

**Michie H. R., Manogue K. R., Spriggs D. R., Revhaug A., O'Dwyer S., Dinarello C. A., Cerami A., Wolff S. M., Wilmore D. W.**

Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration  
N. Engl. J. Med. 1988; 318: 1481-1486

**Morstyn G., Campbell L., Souza L. M.**

Effect of granulocyte colony-stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy  
Lancet 1988; 1: 667-672

**Munker R., Gasson J., Ogawa M., Koeffler H. P.**

Recombinant human TNF induces production of granulocyte-monocyte colony-stimulating factor  
Nature 1986; 323: 79-82

**Nagata S., Tsuchiya M., Asano S., Kaziro Y., Yamazaki T., Yamamoto O., Hirata Y., Kubota N., Oheda M., Nomura H.**

Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor  
Nature 1986a; 319: 415-418

**Nagata S., Tsuchiya M., Asano S., Yamamoto O., Hirata Y., Kubota N., Oheda M., Nomura H., Yamazaki T.**

The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor  
EMBO J. 1986b; 5: 575-581

**Natanson C., Eichenholz P. W., Danner R. L., Eichacker P. Q., Hoffman W. D., Kuo G. C.,**

**Banks S. M., MacVittie T. J., Parrillo J. E.**

Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock  
J. Exp. Med. 1989;169: 823-832

**Neugebauer E., Dimmeler S., Troidl H.**

Mediatorensysteme und Sepsis  
Chirurg. 1995; 66: 2-10

**Nicola N. A., Begley C. G., Metcalf D.**

Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells  
Nature 1985; 314: 625-628

**Nomura H., Imazeki I., Oheda M., Kubota N., Tamura M., Ono M., Ueyama Y., Asano S.**

Purification and characterization of human granulocyte colony-stimulating factor  
EMBO J. 1986; 5: 871-876

**Ohsaka A., Kitagawa S., Sakamoto S., Miura Y., Takanashi N., Takaku F., Saito M.**

*In vivo* activation of human neutrophil functions by administration of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in patients with malignant lymphoma  
Blood 1989; 74: 2743-2748

**Oster W., Herrmann F., Mertelsmann R.**

Hormone der Blutbildung  
Lab. med. 1990; 14: 125-132

**Otsuka T., Miyajima A., Brown N., Otsu K., Abrams J., Saeland S., Caux C., de Waal Malefijt R., de Vries J., Meyerson P.**

Isolation and characterization of an expressible cDNA encoding human IL-3; induction of IL-3 mRNA in human T-cell clones  
J. Immunol. 1988; 140: 2288-2295

**Park L. S., Friend D., Gillis S., Urdal D. L.**

Characterization of the cell surface receptor for human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor  
J. Exp. Med. 1986; 164: 251-262

**Parker M. M., McCarthy K. E., Ognibene F. P., Parrillo J. E.**

Right ventricular dysfunction and dilation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans  
Chest 1990; 97: 126-131

**Parker M. M., Shelhamer J. H., Bacharach S. L., Green M. W., Natanson C., Frederick T. M., Damske B. A., Parrillo J. E.**

Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock  
Ann. Intern Med. 1984; 100: 483-490

**Parrillo J. E.**

Pathogenetic mechanisms of septic shock  
N. Engl. J. Med. 1993; 328: 1471-1477

**Parrillo J. E.**

The cardiovascular pathophysiology of sepsis  
Ann. Rev. Med. 1989; 40: 469-485

**Pilz G., McGinn P., Boekstegers P., Käab S., Weidenhöfer S., Werdan K.**

*Pseudomonas* sepsis does not cause more severe cardiovascular dysfunction in patients than non-*Pseudomonas* sepsis  
Circulatory Shock 1994; 42: 174-182

**Pilz G., Werdan K.**

Score-Systeme bei Sepsis und septischem Schock  
Intensivmed. 1989; 26 (Suppl. 1): 65-71

**Platzer E., Welte K., Gabrilove J. L., Lu L., Harris P., Mertelsmann R., Moore M. A.**

Biological activities of a human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor on normal and leukemic cells  
J. Exp. Med. 1985; 162: 1788-1801

**Pluznik D. H., Sachs L.**

The cloning of normal "mast" cells in tissue culture  
J. Cell Comp. Physiol. 1965; 66: 319-324

**Pories S. E., Gamelli R. L., Mead P. B., Goodwin G., Harris F., Vacek P.**

The epidemiologic features of nosocomial infections in patients with trauma  
Arch. Shock 1991; 126: 97-99

**Pruitt J. H., Welborne M. B., Edwards P. D., Harward T. R. S., Seeger J. W., Martin T. D., Smith C., Kenney J. A.,  
Wesdorp R. I. C., Meijer S., Cuesta M. A., Abouhanze A., Copeland III E. M., Giri J., Sims J. E., Moldawer L. L.,  
Oldenburg H. S. A.**

Increased soluble interleukin-1 type II rezeptor concentrations in postoperative patients and in patients with sepsis  
syndrome  
Blood 1996; 87: 3282-3288

**Redl H., Bahrami S., Schlag G., Traber D. L.**

Clinical detection of LPS and animal models of endotoxemia  
Immunbiol. 1993; 187: 330-345

**Reithmann C., Hallstrom S., Pilz G., Kapsner T., Schlag G., Werdan K.**

Desensitization of rat cardiomyocyte adenylyl cyclase stimulation by plasma of noradrenaline-treated patients with septic  
shock  
Circ. Shock 1993; 41 (1): 48-53

**Reithmann C., Panzner B., Werdan K.**

Distinct pathways for  $\beta$ -adrenozeptor-induced up-regulation of muscarinic acetylcholine receptors and inhibitory G-protein  
 $\alpha$ -subunits in chicken cardiomyocytes  
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 1992; 345 (5): 530-540

**Reithmann C., Werdan K.**

Tumor necrosis factor alpha decreases inositol phosphate formation and phosphatidylinositol-biphosphate (PIP2)  
synthesis in rat cardiomyocytes  
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 1994; 349 (2): 175-182

**Ridings P. C., Sugerman H. J., Blocher C. R., Fisher B. J., Fowler A. A.**

Hemodynamic effects of bradykinin antagonism in porcine gram-negative sepsis  
J. Invest. Surg. 1995; 8 (2): 115-122

**Rietschel E. T., Brade H.**

Bacterial Endotoxins  
Scientific American 1992; 267: 54-61

**Rietschel E. T., Brade H., Holst O., Brade L., Müller-Loennies S., Mamat U., Zähringer U., Beckmann F., Seydel U.,**

- Brandenburg K., Ulmer A. J., Mattern T., Heine H., Schletter J., Loppnow H., Schönbeck U., Flad H.-D., Hauschildt S., Schade U. F., Di Padova F., Kusumoto S., Schumann R. R.**  
Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification  
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1996; 216:39-82
- Rüden H., Daschner F., Schumacher M.**  
Nosokomiale Infektionen in Deutschland - Erfassung und Prävention (NIDEP-Studie) Teil 1: Prävalenz nosokomialer Infektionen, Qualitätssicherung in der Krankenhaushygiene.  
Hrsg.: Das Bundesministerium für Gesundheit  
Nomos Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Baden-Baden, 1995
- Sawyer R. G., Adams R. B., May A. K., Rosenlof L. K., Pruett T. L.**  
Anti-tumor necrosis factor antibody reduces mortality in the presence of antibiotic-induced tumor necrosis factor release  
Arch. Surg. 1993; 128: 73-77
- Schirmer W. J., Schirmer J. M., Fry D. E.**  
Recombinant human tumor necrosis factor produces hemodynamic changes characteristic of sepsis and endotoxemia  
Arch. Surg. 1989; 124: 445-448
- Schoenberg M. H., Nüssler A. K., Beger H. G.**  
Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid in der Sepsis  
Chirurg. 1995; 66: 18-26
- Schottmüller H.**  
Wesen und Behandlung der Sepsis  
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 1914; 31: 257
- Sherr C. J., Rettenmier C. W., Sacca R., Roussel M. F., Look A. T., Stanley E. R.**  
The c-fms proto-oncogene product is related to the receptor for the mononuclear phagocyte growth factor, CSF-1  
Cell 1985; 41: 2970-2974
- Sibbald W. J., Driedger A. A., Myers M. L., Short A. K., Wells G. A.**  
Biventricular function in the adult respiratory distress syndrome: hemodynamic and radionuclide assessment, with special emphasis on right ventricular function  
Chest 1983; 84: 126-134
- Sieff C. A., Niemeyer C. M., Mentzer S. J., Faller D. V.**  
Interleukin-1, tumor necrosis factor and the production of colony-stimulating factors by cultured mesenchymal cells  
Blood 1988; 72: 1316-1323
- Simmers R. N., Webber L. M., Shannon M. F., Garson O. M., Wong G., Vadas M. A., Sutherland G. R.**  
Localization of the G-CSF gene on chromosome 17 proximal to the breakpoint in the t(15:17) in acute promyelocytic leukemia  
Blood 1987; 70: 330-332
- Slotman G. J., Friedman B., Brathwaite C., Mure A. J., Quinn J. V., Shapiro E.**  
Interleukin-1 mediates increased plasma levels of eicosanoids and cytokines in patients with sepsis syndrome  
Shock 1995; 4: 318-323
- Smith II J. W., Urba W. J., Curti B. D., Elwood L. J., Steis R. G., Janik J. E., Sharfman W. H., Miller L. L., Fenton R. G., Conlon K. C., Sznol M., Creekmore S. P., Wells N. F., Ruscetti F. W., Keller J. R., Hestdal K., Shimizu M., Rossio J., Alvord W. G., Oppenheim J. J., Longo D. L.**  
The toxic and hematologic effects of interleukin-1 alpha administered in a phase I trial to patients with advanced malignancies  
J. Clin. Oncol. 1992; 10: 1141-1152
- Smith R. L., Meixler S. M., Simberkoff M. S.**  
Excess mortality in critically ill patients with nosocomial bloodstream infections  
Chest 1991; 100: 164-168
- Smith W. S., Sumnicht G. E., Sharpe R. W., Samuelson D., Millard F. E.**  
Granulocyte colony-stimulating factor versus placebo in addition to Penicillin G in a randomized blinded study of

gram-negative pneumonia sepsis: Analysis of survival and multisystem organ failure  
Blood 1995; 86: 1301-1309

**Socinski M. A., Cannistra S. A., Elias A., Antman K. H., Schnipper L., Griffin J. D.**

Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expands the circulating hemopoietic progenitor cell compartment in man

Lancet 1988; 1: 1194-1198

**Souza L. M., Boone T. C., Gabrilove J., Lai P. H., Zsebo K. M., Murdock D. C., Chazin V. R., Bruszewski J., Lu H., Chen K. K.**

Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells

Science 1986; 232: 61-65

**Stadler J., Heidecke C. D., Bartels H., Holzmann B., Wagner B., Siewert J. R.**

Immunsuppression und Sepsis

Chirurg. 1995; 66: 11-17

**Steel D. M., Whitehead A. S.**

The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein

Immunol. Today 1994; 15: 81-88

**Stone R.**

Search for sepsis drugs goes on despite past failure

Science 1994; 264 (5157): 365-367

**Tanaka H., Ishikawa K., Nishino M., Shimazu T., Yoshioka T.**

Changes in granulocyte colony-stimulating factor concentrations in patients with trauma and sepsis

J. Trauma 1996; 40: 718-725

**Tanaka H., Mituo T., Yukioka T., Matsuda H., Shimazaki S., Igarashi H.**

Comparison of hemodynamic changes resulting from toxic shock syndrome toxin-1-producing Staphylococcus aureus sepsis and endotoxin-producing gram-negative rod sepsis in patients with severe burns

J. Burn Care Rehabil. 1995; 16 (6): 616-621

**Taylor G. D., Buchanan-Chell M., Kirkland T., McKenzie M., Wiens R.**

Bacteremic nosocomial pneumonia. A 7-year experience in one institution

Chest 1995; 108: 786-788

**Terashima T., Soejima K., Waki Y., Nakamura H., Fujishima S., Suzuki Y., Ishizaka A., Kanazawa M.**

Neutrophils activated by granulocyte colony-stimulating factor suppress tumor necrosis factor- $\alpha$  release from monocytes stimulated by endotoxin

Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 1995; 13: 69-73

**Teschauer W. F., Mentele R., Sommerhoff C. P.**

Primary structure of a porcine leukocyte serpin

Eur. J. Biochem. 1993; 217: 519-526

**Thiel M.**

Therapie der Leukozytendysfunktion bei Sepsis

Intensivmedizin 1996b; 33: 386-398

**Thiel M., Zourelidis C., Peter K.**

Die Rolle der polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten in der Pathogenese des akuten Lungenversagens (ARDS)

Anaesthesist 1996a; 45:113-130

**Toda H., Murata A., Matsuura N., Uda K., Oka Y., Tanaka N., Mori T.**

Therapeutic efficacy of granulocyte colony stimulating factor against rat cecal ligation and puncture model

Stem Cell 1993; 11: 228-234

**Töns C., Klosterhalfen B., Klinge U., Kirkpatrick C.-J., Mittermayer C., Schumpelick V.**

Septischer Schock und multiples Organversagen in der chirurgischen Intensivmedizin

Langenbecks Arch. Chir. 1993; 378: 217-232

**Turzanski J., Crouch S. P. M., Fletcher J., Hunter A.**

*Ex vivo* neutrophil function in response to three different doses of glycosylated rHuG-CSF (Lenograstim)  
Br. J. Haematol. 1997; 96: 46-54

**Ulevitch R. J., Tobias P. S.**

Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin  
Ann. Rev. Immunol. 1995; 13: 437-457

**Vadas M. A., Nicola N. A., Metcalf D.**

Activation of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of human neutrophils and eosinophils by separate colony-stimulating factors  
J. Immunol. 1983; 130: 795-799

**Vellenga E., Rambaldi A., Ernst T. J., Ostapovicz D., Griffin J. D.**

Independent regulation of M-CSF and G-CSF genes expression in human monocytes  
Blood 1988; 71:1529-1532

**Verbist L.**

Epidemiology and sensitivity of 8625 ICU and hematology/oncology bacterial isolates in Europe. International Study Group  
Scand. J. Infect. Dis. 1993; Suppl. 91: 14-24

**Vincent J.-L., Bihari D. J., Suter P. M., Bruining H. A., White J., Nicolas-Chanoin M.-H., Wolff M., Spencer R. C., Hemmer M.**

The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe  
JAMA 1995; 274: 639-644

**Von der Möhlen M. A. M., van der Poll T., Jansen J., Levi M., van Deventer J. H.**

Release of Bactericidal/permeability Increasing Protein in experimental endotoxemia and clinical sepsis  
J. Immunol. 1996; 156: 4969-4973

**Wakabayashi G., Gelfand J. A., Jung W. K., Connolly R. J., Burke J. F., Dinarrello C. A.**

Staphylococcus epidermidis induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia  
J. Clin. Invest 1991; 87: 1925-1935

**Wang J. M., Chen Z. G., Collela S., Bonilla M. A., Welte K., Bordignon C., Mantovani A.**

Chemotactic activity of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor  
Blood 1988; 72: 1456-1460

**Welte K., Platzer E., Lu L., Gabrilove J. L., Levi E., Mertelsmann R., Moore M. A.**

Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1985; 82: 1526-1530

**Werdan K., Boekstegers P., Müller U., Pfeifer A., Pilz A., Reithmann C., Hallström S., Koidl B., Schuster H. P., Schlag G.**

Akute septische Kardiomyopathie: Bestandteil des Multiorganversagens in der Sepsis?  
Med. Klin. 1991; 86: 526-534

**Wilson R. F., Thal A. P., Kindling P. H., Grifka T., Ackerman E.**

Hemodynamic measurements in septic shock  
Arch. Surg. 1965; 91: 121-129

**Witt D. J., Craven D. E., McCabe W. R.**

Bacterial infections in adult patients with the acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex  
Am. J. Med. 1987; 82: 900-906

**Wong G. G., Witek J. S., Temple P. A., Wilkens K. M., Leary A. C., Luxemburg D. P., Jones S. S., Brown E. L., Kay R. M., Orr E. C.**

Human GM-CSF: Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins  
Science 1985; 228: 810-815

**Young L. S.**

Gram-negative sepsis

In: Mandell G. L., Douglas R. G. Jr., Bennett J. E. (eds): Principles and Practice of Infectious Diseases  
Churchill Livingstone, New York; 1990; 611-636

**Ziegler E. J., Fisher C. J. Jr., Sprung C. L., Straube R. C., Sadoff J. C., Foulke G. E., Wortel C. H.,  
Fink M. P., Dellinger R. P., Teng N. N.**

Treatment of gram-negative bacteremia and septic shock with HA-1A human monoclonal antibody against endotoxin. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The HA-1A Sepsis Study Group  
N. Engl. J. Med. 1991; 324: 429-436

**Zucali J. R., Dinarello C. A., Oblon D. J., Gross M. A., Anderson L., Weiner R. S.**

Interleukin-1 stimulates fibroblasts to produce granulocyte-macrophage colony-stimulating activity and prostaglandin E2  
J. Clin. Invest 1986; 77: 1857-1863

## 8.2 Ergebnistabellen

Auf den folgenden Seiten sind die Ergebnisse tabellarisch dargestellt. Bei einzelnen Parameter wurden neben den zu Phasen zusammengefaßten Ergebnissen auch Maximalwerte oder die Werte zur Stunde 2 dargestellt.

Es sind die Mittelwerte (x) sowie die Standardabweichungen (s) in Zahlen aufgeführt. Haben sich in den statistischen Auswertungen im Student-T-Test Signifikanzen ergeben, sind diese dargestellt. Vor der Kennzeichnung wurde die Bonferonikorrektur durchgeführt. \* bedeutet signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppe im Bezug auf den Basalwert, \*\* deutet einen hochsignifikanten Unterschied an. # kennzeichnet den signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

Tab. 1: Ergebnisse der klinischen Untersuchungen

		Basalwert		Phase 1		Phase 2		Phase3	
		Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF
Körpertemperatur	x	38,6	38,6	40,4**	41,1**	41,0**	41,1**	40,4**	40,4**
[°C]	s	0,3	0,3	1,2	0,2	0,4	0,3	0,7	0,6
Herzfrequenz	x	88	77	110*	108**	126**	122**	129**	136**
[Schläge/min]	s	19	16	20	9	14	10	16	10
Atemfrequenz	x	30	26	54*	54*	53**	51	53*	66
[Züge/min]	s	9	11	21	13	13	24	18	28

Tab. 2: Ergebnisse der Druckmessungen

	Basalwert	Stunde 2	Phase 1	Phase 2	Phase3
--	-----------	----------	---------	---------	--------

		Kontrolle	G-CSF								
MAP	x	108	106	115	122	109	106	97	87**	97*	92
[mmHg]	s	15	13	15	18	14	13	9	12	10	14
MPAP	x	13	13	34**	34**	27**	23**	21**	18	25**	30**
[mmHg]	s	3	2	8	5	8	3	4	3	3	6
ZVD	x	1	1	2	2	1	1	1	1	0	2
[mmHg]	s	1,6	1,5	3,7	1,9	2,2	1,2	1,2	1,1	1,3	2,6
PCWP	x	3	3	6*	5	5	3	2	1	2	3
[mmHg]	s	2,3	2,7	2,7	2,1	2,7	1,8	1,0	2,0	0,8	2,7

Tab. 3: Hämodynamische Parameter

		Basalwert		Stunde 2		Phase 1		Phase 2		Phase3	
		Kontrolle	G-CSF								
HZV	x	2,8	2,4	2,7	2,3	2,9	2,4	4,8**	4,3**	5,3**	5,0**
[l/min]	s	0,6	0,7	1,3	0,8	1,0	0,5	1,2	1,1	0,9	0,9
CI	x	115	110	110	106	116	109	190**	182*	215**	224**
[ml/min/kg]	s	19	30	46	39	33	24	26	50	31	46
SVI	x	1,4	1,5	1,0	1,1	1,1	1,0	1,5	1,5	1,7	1,7
[ml/Herzschlag/kg]	s	0,3	0,4	0,4	0,4	0,2	0,3	0,2	0,4	0,1	0,4
SVRI	x	76	81	94	103	82	88	42**	43*	37**	34*
[dyn/sec/cm <sup>5</sup> /kg]	s	16	26	39	43	21	25	5	16	7	9
PVRI	x	7	7	26*	24*	19*	17**	8	8	8	10
[dyn/sec/cm <sup>5</sup> /kg]	s	1,4	1,8	17,5	10,1	12,1	4,7	2,5	3,6	1,6	3,4

Tab. 4: Pulmonalvaskulärer Widerstandsindex: Maximalwerte

		Basalwert		Absolute Maximalwerte der Stunde 0 - 12	
		Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF
PVRI	x	7	7	31**	32**
[dyn/sec/cm <sup>5</sup> /kg]	s	1,4	1,8	20,5	10,1

Tab. 5: Ergebnisse der Blutbildbestimmungen

		Basalwert		Phase 1		Phase 2		Phase3	
		Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF
Leukozyten	x	15,7	13,0	10,3*	10,6	11,1*	16,5*	11,3	18,3**#
[10 <sup>9</sup> /l]	s	3,2	3,0	4,1	3,0	4,3	3,8	2,1	4,6
Thrombozyten	x	216	192	126**	132	51**	52	40	46
[10 <sup>9</sup> /l]	s	100	94	49	55	14	14	26	15
Erythrozyten	x	6,4	6,1	6,4	6,1	5,2**	5,2**	4,0**	3,7**
[10 <sup>12</sup> /l]	s	0,6	0,9	1,1	1,1	0,8	1,1	0,7	0,7
Hämatokrit	x	33,2	31,7	34,3	33,0	27,8**	27,4*	20,6**	20,8**
[%]	s	1,7	4,0	3,4	4,6	3,5	5,4	2,6	5,0
Hämoglobin	x	10,7	10,3	11,2	10,7	9,0**	8,8*	6,5**	6,6**
[g/dl]	s	0,6	1,4	1,3	1,5	1,2	1,8	0,9	1,7

Tab. 6: Ergebnisse der Blutgasmessungen

		Basalwert		Phase 1		Phase 2		Phase3	
		Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF
pH	x	7,46	7,48	7,48	7,51	7,54**	7,53**	7,51*	7,49*
	s	0,03	0,03	0,05	0,02	0,03	0,02	0,01	0,02
paCO <sub>2</sub>	x	40,3	38,3	35,4*	32,9*	34,3**	35,1	35,3	35,2
[mmHg]	s	2,7	2,7	4,9	0,9	2,4	1,7	3,3	2,0
paO <sub>2</sub>	x	84,0	87,3	68,3*	66,6**	72,9	76,8	74,0	71,8
[mmHg]	s	7,5	10,5	9,2	6,1	7,6	6,6	7,0	7,1
SaO <sub>2</sub>	x	98,6	98,9	93,5	95,6**	97,8	98,3	98,3	95,6
[%]	s	1,9	2,0	6,4	2,1	2,6	1,2	1,9	3,2
HCO <sub>3</sub>	x	28,3	28,3	25,7	25,8**	29,1	29,4	28,7	27,3
[mmol/l]	s	1,7	1,6	2,4	1,0	2,7	2,0	2,5	2,3
taCO <sub>2</sub>	x	66	66	61	60**	67	68	65	63
[Vol%]	s	3,9	3,7	6,0	2,2	6,2	4,6	4,0	6,0

Tab. 7: Ergebnisse der APACHE II Klassifizierung

		Basalwert		Phase 1		Phase 2		Phase3	
		Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF
APACHE II	x	4	3	12**	12**	14**	14**	13**	15**
[Punkte]	s	2	2	2	2	2	2	2	3

Tab. 8: Ergebnisse der Endotoxin- und Mediatorenbestimmungen

		Basalwert		Phase 1		Phase 2		Phase3	
		Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF
Endotoxin	x	0	0	126	79	488**	482**	124	89
[EU/ml]	s	0,5	0,5	155,0	98,6	270,9	248,3	130,9	124,6
TNF- $\alpha$	x	2,0	1,6	56,3	58,7**	10,3	19,8	9,1	15,5
[pg/ml]	s	2,47	2,81	64,86	40,83	10,32	33,84	13,05	14,47
IL-1ra	x	402	257	2250*	1854*	755	759	539	659
[pg/ml]	s	359	319	1804	690	702	270	223	510

Tab. 9: Ergebnisse der Endotoxin- und Mediatorenbestimmungen: Maximalwerte

		Basalwert		Maximalwerte					
		Kontrolle	G-CSF	Stunde 1,5		Stunde 2		absoluter Maximalwert	
		Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF
Endotoxin	x	0	0					808**	823**
[EU/ml]	s	0,5	0,5					405,2	404,8
TNF- $\alpha$	x	2,0	1,6	201**	224	222*	197**	269**	271**
[pg/ml]	s	2,47	2,81	109,6	155,0	172,6	67,7	142,8	101,0
IL-1ra	x	402	257	3048	1819	3924	2614*	4075*	2654
[pg/ml]	s	359	319	2776	1462	3827	973	3744	1022

Tab. 10: Ergebnisse der Phagozytoseparameterbestimmungen

		Basalwert		Stunde 12		Phase 1		Phase 2		Phase3	
		Kontrolle	G-CSF								
LNPI	x	95	95	285**	222**	184**	152*	168*	121	84	85
[ng/ml]	s	37	21	127	74	84	44	72	24	41	15
p-3-p	x	11	12	20	25	15	19	16	16	11	14
[E/ml]	s	6	4	16	14	11	9	11	4	5	3

Tab. 11: Organparameter

		Basalwert		Phase 2		Phase 3	
		Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF
GOT	x	14	11	49*	35*	25	13
[E/l]	s	4,9	2,3	27,2	18,2	19,9	7,6
GPT	x	31	24	22*	17**	14**	9**
[E/l]	s	9,3	6,0	7,1	2,9	5,2	2,6
Kreatinin	x	1,3	1,3	1,5	1,3	1,4	1,2
[mg/dl]	s	0,14	0,10	0,45	0,05	0,58	0,19
Harnstoff	x	12	15	27*	24*	28	28
[mg/dl]	s	6,3	5,8	9,8	4,6	11,7	17,3

Tab. 12: Laboruntersuchungen klinische Chemie

		Basalwert		Phase 2		Phase3	
		Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF	Kontrolle	G-CSF
Natrium	x	139	139	134	135*	135	134*
[mmol/l]	s	3	1	7	3	3	3
Kalium	x	3,7	3,6	3,5	3,2	4,0	3,7
[mmol/l]	s	0,24	0,20	0,20	0,13	0,28	0,85
Calcium	x	2,4	2,3	2,2**	2,2	2,2**	2,2
[mmol/l]	s	0,08	0,10	0,16	0,13	0,11	0,10
Bilirubin gesamt	x	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2

[mg/dl]	s	0,05	0,04	0,16	0,03	0,09	0,06
Gesamteiweiß	x	5,5	5,1	4,9	4,9	5,0*	4,3
[g/dl]	s	0,69	0,40	1,13	0,57	0,64	1,01
Glucose	x	136	129	72*	88*	79*	91
[mg/dl]	s	55	46	31	27	33	43

### 8.3 Verwendete Einheiten und Abkürzungen

#### 8.3.1 physikalische und biochemische Einheiten:

##### Längenangaben

m = Meter

cm = Zentimeter ( $10^{-2}$  m)

mm = Millimeter ( $10^{-3}$  m)

nm = Nanometer ( $10^{-9}$  m)

##### Volumenangaben

l = Liter

dl = Deziliter ( $10^{-1}$  l)

ml = Milliliter ( $10^{-3}$  l)

mm<sup>3</sup> = Kubikmillimeter (1 mm<sup>3</sup> entspr. 1 dl)

##### Gewichtsangaben

kg = Kilogramm ( $10^3$  g)

g = Gramm

mg = Milligramm ( $10^{-3}$  g)

µg = Mikrogramm ( $10^{-6}$  g)

ng = Nanogramm ( $10^{-9}$  g)

pg = Pikogramm ( $10^{-12}$  g)

kDa = Kilodalton

##### Zeitangaben

h = Stunde

min = Minute

sec = Sekunde

sonstige Einheiten

°C = Grad Celsius

dyn =  $10^{-5}$  Newton (Krafteinheit)

IE = Internationale Einheit (Enzymaktivität)

EU = Endotoxin Unit (bestimmt im LAL-Test)

mmHg = Millimeter Quecksilbersäule (Druckeinheit)

kcal = Kilokalorien (Energieeinheit)

### 3.3.2 Verwendete Abkürzungen

ACTH.....Adrenocorticotropes Hormon

APACHE II.....Acute Physiology And Chronic Health Evaluation II

ARDS.....Adult Respiratory Distress Syndrome

BPI.....Bactericidal / Permeability Increasing Protein

CD.....Cluster of Differentiation

CI.....Cardiac Index (Herzindex)

CO<sub>2</sub>.....Kohlendioxid

DNS.....Desoxyribonukleinsäure

(rh) G-CSF.....(rekombinant humaner) Granulozyten Kolonie-Stimulierender Faktor

GM-CSF.....Granulozyten / Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor

GOT = AST.....Glutamat-Oxalacetat-Transferase

GPT = ALT.....Glutamat-Pyruvat-Transferase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.....Wasserstoffperoxid

Hb.....Hämoglobin

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.....Bikarbonat

HDL.....High Density Lipoprotein

HF.....Herzfrequenz

Hkt.....Hämatokrit

HZV.....Herzzeitvolumen

ICAM.....Interzelluläres Adhäsionsmolekül

IFN.....Interferon

IL.....Interleukin

IL-1ra.....Interleukin-1 Rezeptorantagonist

IL-1RI / II.....	Interleukin-1 Rezeptor I / II
LBP.....	LPS Bindendes Protein
LNPI.....	Leukocyte Neutral Proteinase Inhibitor
LPS.....	Lipopolysaccharid
M-CSF.....	Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor
MAP.....	Mittlerer Arterieller Druck
MPAP.....	Mittlerer Pulmonalarterieller Druck
N <sub>2</sub> O.....	Lachgas
NO.....	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub> / O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	Sauerstoff / Superoxid
p-3-p.....	Prokollagen 3 Peptid
paCO <sub>2</sub> / paO <sub>2</sub> .....	arterieller Kohlendioxid / Sauerstoff Partialdruck
PAF.....	Plateled Activating Factor
PCWP.....	Pulmonary Capillar Wedge Pressure Pulmonalkapillärer Verschlussdruck
PGE / PGF.....	Prostaglandin E / Prostaglandin F
PVRI.....	Pulmonalvaskulärer Widerstandsindex
SaO <sub>2</sub> .....	arterielle Sauerstoffsättigung
SIRS.....	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SVI.....	Schlag Volumenindex
TGF.....	Transforming Growth Factor
TNF.....	Tumor Nekrose Faktor
SVRI.....	Systemischer vaskulärer Widerstandsindex
TxA <sub>2</sub> .....	Thromboxan A <sub>2</sub>
ZVD.....	Zentral Venöser Druck

## 9 Danksagung

Ich möchte mich hier in erster Linie bei meiner Kollegin Andrea Geist bedanken, die diese Studie mit vorbereitet und durchgeführt hat und auch in der nachfolgenden Aufarbeitungsperiode jederzeit helfend zur Verfügung stand.

Ebenso mit in die intensivmedizinische Betreuung der Tiere involviert war Belma Gülra Dorsunoglu, welche auch immer wieder Aspekte aus der humanmedizinischen Klinik einbrachte.

Herr PD Dr. med. vet. Haberstroh konnte durch seine langjährige Erfahrung in der Forschung und durch seinen Einsatz bei der Unterstützung in Anästhesie, Chirurgie und Intensivmedizin diese Studie ermöglichen und vorantreiben. Er war und ist ein guter Lehrmeister.

Das Thema, Arbeitsplatz und Finanzierung wurde von Herrn Prof. Dr. Dr. von Specht zur Verfügung gestellt. Auch er stand jederzeit beratend zur Seite.

Allen Laborassistenten sei ein gemeinsames Dankeschön ausgesprochen, wobei ich hier Hilde Schmidt-Pilger für die zügige Bestimmung der Endotoxine danken möchte .

Die Zusammenarbeit mit dem Zentrallabor klappte vorzüglich. Auch hier möchte ich eine Person hervorheben: Frau Haas hat die TNF-Bestimmungen durchgeführt.

In Fragen der statistischen Auswertung stand mir Frau Dr. Schmoor aus dem Instut für Biomathematik und Statistik der Albert-Ludwigs-Universität zur Seite.

Mein Dank geht auch an die Ludwig-Maximilians-Universität in München, wo im Labor von Frau Prof. Dr. Jochum IL-1ra, LNPI sowie p-3-p bestimmt wurde und wo mir Frau Dr. Gippner-Steppert als Ansprechpartner jederzeit zur Verfügung stand. An der Universität Ulm wurden in den Labors von Herrn Prof. Dr. Brückner die NO-Bestimmungen durchgeführt.

Herr Prof. Dr. Brunberg an der Klinik und Poliklinik für Kleintiere der Freien Universität Berlin hat sich dankenswerterweise bereit erklärt, die Dissertation in seine veterinärmedizinische Obhut zu nehmen.

An der Chirurgischen Forschung möchte ich mich außerdem noch bei allen Mitarbeitern bedanken, welche direkt oder indirekt die Studie unterstützt und mitgetragen haben.

Zu guter Letzt aber nicht minder herzlich möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Meine Eltern standen allzeit hinter mir und so konnte ich die Arbeit fertigstellen und meine Brüder konnten mir aus ihrem Medizinstudium durchaus hilfreiche Tips geben, insbesondere bei der schriftlichen Fertigstellung der Dissertation.

## 10 Lebenslauf

Geburtsdatum: 21. Juni 1968

Geburtsort: Heidenheim a. d. Brenz

Mutter: Sieglinde Wiese, geb. Meyer, Oberschulrätin

Vater: Hubert Wiese, Reitlehrer FN a. D.

Familienstand: ledig

### Ausbildung

Schule:Grundschule in Steinheim a. A. 1975- 1979

Gymnasium in Heidenheim a. d. Br. 1979 - 1988

Abschluß: Abitur

Hochschule: Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover 1989 - 1995

Abschluß: Tierärztliche Approbation

### Praktische Ausbildung

1986 vierwöchiges Schulpraktikum an der Pferdeklinik  
Dr. Witzmann, Kirchheim

1992 sechswöchiges Praktikum an der veterinärmedizinischen Klinik der Universität Zürich

1993 sechswöchiges Praktikum an der Pferdeklinik  
Dr. Witzmann, Kirchheim

sechswöchiges Praktikum am Städtischen Veterinäramt Bamberg, Schlacht- und Viehhof

1994 dreimonatiges Praktikum an der Klinik für Nutztiere und Pferde, Rinderklinik der Universität Bern

achtwöchiges Praktikum an der 1. Medizinischen Klinik, Pferdeklinik der Veterinärmedizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

### **Beruflicher Werdegang**

seit 1. Sept. 1995 Wissenschaftlicher Angestellter an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Chirurgische Forschung, dabei Anfertigung dieser Dissertation und Mitarbeit in verschiedenen Studien

---