

AUS DER KLINIK UND POLIKLINIK
FÜR INNERE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT ROSTOCK

Direktor: Professor Dr. med. habil. R. Schmidt

Nachweis der Eignung der Promyelozytenzelllinie
HL-60 für ein bioartifiziell extrakorporales Immununterstützungssystem
In-vitro Resultate und Ergebnisse eines Nager-Tiermodells
der Gram-negativen Sepsis

INAUGURALDISSERTATION ZUR
ERLANGUNG DES AKADEMISCHEN GRADES
DOKTOR DER MEDIZIN

DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT ROSTOCK

VORGELEGT VON MARTIN SAUER
AUS ROSTOCK

ROSTOCK, 2008

urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0040-3

Promotion verteidigt am: 14. Mai 2008

Dekan der Medizinischen Fakultät: Herr Prof. Dr. E. C. Reisinger

Gutachter:

1 - Herr Prof. Dr. Steffen Mitzner (Universität Rostock)

2 - Herr PD Dr. Thomas Mencke (Universität Rostock)

3 - Herr Prof. Dr. Martin Scholz (Universität Düsseldorf)

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	
1.1 Phagozytose	1
1.2 Phagozytose- Immundefekte	2
1.3 Sepsis	5
1.4 Therapie der Sepsis	8
1.5 Extrakorporale Sepsistherapie	12
1.6 Bioartifizielle Organunterstützungssysteme	14
2. Ziele der Arbeit	17
3. Material und Methoden	
3.1 Zellkultur, Bakterienkultivierung und Statistik	18
3.1.1 Zellkultur und Stimulation der HL-60 Zellen	18
3.1.2 Kultivierung der Bakterien	18
3.1.3 Gewählte Bakterien Stämme	21
3.1.4 Statistische Methoden	21
3.2 In vitro-Untersuchungen	22
3.2.1 Konzentrationskinetik von E. coli O7:K1	22
3.2.2 Filtrierung von HL-60 Zellen und Bakteriensuspension	23
3.2.3 Bestimmung der quantitativen Phagozytoseleistung der HL-60 Zellen im standardisierten Phagozytoseexperiment	25
3.2.4 Freisetzung von TNF-alpha, IL-6 und IL-1 beta durch die HL-60 Zellen während des standardisierten Phagozytoseexperimentes	26
3.2.5 Nachweis der Phagozytose von lebenden Bakterien (E. coli) mittels der Elektronenmikroskopie	27
3.3 Nager-Tier-Modell der Gram negativen Sepsis	28
3.3.1 Vorexperiment Verträglichkeit	29
3.3.2 Sepsis-Tier Modell	31

	Seite
4. Ergebnisse	
4.1 In vitro-Untersuchungen	37
4.1.1 Konzentrationskinetik von E. coli O7:K1	37
4.1.2 Filtrierung von HL-60 Zellen und Bakteriensuspension	37
4.1.3 Bestimmung der quantitativen Phagozytoseleistung der HL-60 Zellen im standardisierten Phagozytoseexperiment	39
4.1.4 Freisetzung von TNF-alpha, IL-6 und IL-1 beta durch die HL-60 Zellen während des standardisierten Phagozytoseexperimentes	41
4.1.5 Nachweis der Phagozytose von lebenden Bakterien (E. coli) mittels der Elektronenmikroskopie	42
4.2 Nager-Tier-Modell der Gram negativen Sepsis	48
4.2.1 Vorexperiment Verträglichkeit	48
4.2.2 Sepsis-Tier Modell	50
5. Diskussion	71
6. Zusammenfassung	79
7. Anhang	
7.1 Messwerte ausgewählter Parameter	81
7.2 Daten der Normalwertbildung - Blutbild Ratten	84
7.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	85
7.4 Histologische Arbeitsschritte	88
8. Literaturverzeichnis	90
9. Thesen	101
10. Eidesstattliche Erklärung	107
11. Danksagung	108
12. Lebenslauf	109

Abkürzungsverzeichnis

A.: Arteria

Abb.: Abbildung

AIDS: Acquired Immunodeficiency Syndrome erworbenes Immundefektsyndrom

APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (-Score)

APC: aktiviertes Protein C

ARDS: Adult Respiratory Distress Syndrom

AT: Antithrombin

BA: Basenabweichung

BG: Behandelte Gruppe

CRP: C-reaktives Protein

DIC: disseminated intravascular coagulation Verbrauchskoagulopathie

DNA: Desoxyribonukleinsäure

E. coli: Escherichia coli

EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

EISS: Extracorporeal Immune Support System

FFP: fresh frozen plasma frisches Gefrierplasma

g: Gramm

h: Stunden

H2-Rezeptor: Histamin-2-Rezeptor

HE: Hämatoxylin Eosin

HF: Hämofiltration

HL-60: Humane Leukämiezelllinie 60

HLA: Human Leukocyte Antigene

IL: Interleukin

IFN: Interferon

i.p.: intraperitoneal

i.v.: intravenös

KBE: Kolonie bildende Einheiten

KG: Kontroll Gruppe

k: kilo

kcal: Kilokalorien

kPa: kilo Pascal
l: Liter
LAL: Limulus Amebocyte Lysate
LPS: Lipopolysaccharid (Endotoxin)
Lsg.: Lösung
LW: letzter Wert
µm: Mikrometer
M: molar
m: Mol
MHC: Major Histocompatibility Complex Haupthistokompatibilitätskomplex
mmol: millimol
MAB: Mittlerer Arterieller Blutdruck
MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin Mittleres Korpuskuläres Hämoglobin
Min.: Minuten
ml: Milliliter
mm: Millimeter
mmHg: Millimeter Quecksilbersäule
MODS: Multiple Organ Dysfunction Syndrom (-Score)
MOV: Multiorganversagen
MW: Mittelwert
NaCl: Natriumchlorid
ng: Nanogramm
Nr.: Nummer
n.s.: nicht (statistisch) signifikant
OD: Optical Density Optische Dichte
pCO₂: Kohlendioxidpartialdruck
PCT: Prokalzitonin
PEEP: positive end-expiratory pressure
pg: Pikogramm
PF: Plasmafiltration
pNA: para Nitroanillin
pO₂: Sauerstoffpartialdruck
REM: Rasterelektronenmikroskopie
SA: Standardabweichung

SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrom

SpO₂: Sauerstoffsättigung

TEM: Transmissionselektronenmikroskopie

TNF: Tumornekrosefaktor

TPA: Therapeutischer Plasmaaustausch

TSP: tryptische Sojabohnenfleischbrühe

UG: Unbehandelte Gruppe

V.: Vena

1. Einleitung

1.1 Phagozytose

Ein wesentlicher Bestandteil der immunologischen Kompetenz eines Organismus ist die Fähigkeit zur Phagozytose von körpereigenen und körperfremden Stoffen (1-3). Die Phagozytose wird durch Monozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und Gewebsmakrophagen durchgeführt. Eosinophile Granulozyten sind wahrscheinlich nur zur Phagozytose von Parasiten fähig. Zu den Gewebsmakrophagen gehören die Alveolarmakrophagen (Lunge), die Histiozyten (Bindegewebe), die Kupffer-Sternzellen (Leber), die Mesangiumzellen (Niere), die Mikrogliazellen (Gehirn), die Langerhans-Zellen (Haut), die Riesenzellen (Granulome), die Peritoneal- und Pleuramakrophagen und die Osteoklasten (Knochen). Die oben genannten (o.g.) Zellen sind Bestandteil der unspezifischen Immunität. Die Phagozytose, als eine Art von Endozytose zur Aufnahme von lebendem und nicht lebendem Material (Antigen), vollzieht sich in mehreren Schritten (1-3):

1. Adhärenz des zu phagozytierenden Materials (Antigen: z.B. Mikroorganismen, unlösliche Partikel, geschädigte und tote Zellen und Zellbestandteile, aktivierte Gerinnungsfaktoren) an lange Membranfortsätze der Phagozyten, sogenannte Pseudopodien; teilweise gezieltes Anlocken der Phagozyten durch chemotaktische Stoffe mit folgender gezielter Migration
2. die Pseudopodien umschließen das zu phagozytierende Material es bildet sich das sogenannte Phagosom
3. Verschmelzung des Phagosomes mit einem Lysosom unter Bildung eines Phagolysosomes das Lysosom enthält eine Reihe von Stoffen mit antimikrobieller und zytotoxischer Aktivität (siehe Tabelle 1)
4. das aufgenommene Material wird meist, aber nicht immer, teilweise zersetzt
5. Freisetzung der zersetzten Teile durch den Phagozyten (durch Exozytose)
6. ein Teil des Antigens wird auf der Phagozytenmembran präsentiert (sogenannter Antigenpeptid / MHC [Major Histocompatibility Complex] Klasse II Komplex) an diesen Komplex binden T-Helferzellen, die dann die spezifische Immunantwort einleiten; des weiteren werden chemotaktische Stoffe von den Phagozyten (z.B. IL-8 von neutrophilen Granulozyten) freigesetzt, die u.a. zu einer Akkumulation von Phagozyten und anderen Immunzellen führt

Die Membran der Phagozyten hat so genannte Fc-Rezeptoren für einige Klassen von Antikörpern (Immunglobuline) und Komplementfaktoren. Sowohl die Immunglobuline, als auch die Komplementfaktoren alleine oder in Kombination mit den Immunglobulinen können an vielen Antigenen binden. Dieser Prozeß wird Opsonierung genannt. Er führt zu einer bis 4000-fach erhöhten Phagozytoserate, im Vergleich zur Phagozytose von nicht opsonierten Antigenen (1).

Tabelle 1: Mediatoren von antimikrobieller und zytotoxischer Aktivität, die von Phagozyten gebildet werden und im Lysosom vorhanden sind

<u>Sauerstoffabhängige Mediatoren</u>	<u>Sauerstoffunabhängige Mediatoren</u>
Sauerstoffradikale (Superoxid-Anion, Hydroxyl-Radikal, Wasserstoffperoxid, Hypochlorid-Anion, Wasserstoffsuperoxid) [wichtige Enzyme: NADPH-Oxidase, Superoxiddismutase, Myeloperoxidase, Katalase+Glutathionsystem]	Enzyme Proteasen (Lysozym, Kathepsine, Elastase, Kollagenase), Phospholipasen, Lipasen, Ribonukleasen, Glykosidasen, Sulfatasen, Phosphatasen, Histaminase, Plasminogenaktivator, Arylsulfatase, Glucosaminidase
Nitrogenradikale (Nitrid-Oxid, Nitrogen-Dioxid, Nitrosäure, Peroxynitrit) [wichtiges Enzym: NO-Synthase]	Defensine (Proteine) Lactoferrin (Protein)
Andere (z.B. Monochloramine)	

Modifiziert nach Goldsby RA und Mitarbeiter, 2000 (1) und Gemsa D und Mitarbeiter, 1997 (3)

1.2 Phagozytose- Immundefekte

Erkrankungen, die mit einer Einschränkung der Phagozytose einhergehen, werden in drei Gruppen eingeteilt (1-3):

1. Physiologische Phagozytose- Immundefekte
2. Primäre Phagozytose- Immundefekte, meist durch genetische Defekte verursacht
3. Sekundäre Phagozytose- Immundefekte, die durch andere Erkrankungen, bzw. ihre Behandlung entstehen

zu 1.) Zu dieser Gruppe gehören die Immundefizienz der Neonatalperiode, die v.a. durch eine Unreife des B-Zell-Systems begründet ist, und die Immundefizienz im Alter.

zu 2.) Patienten mit den insgesamt sehr seltenen primären Phagozytosedefekten haben ein wesentlich erhöhtes Risiko für Infektionen und septische Episoden. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die wichtigsten Krankheitsbilder:

Tabelle 2: Erkrankungen, die mit einem primären Phagozytosedefekt einhergehen

Erkrankung	Spezifische (genetische) Defekte	Funktionsdefekt
SCID (Severe Combined Immunodeficiency)	RAG-1/-2, ADA, PNP, JAK-3, IL-2Rgamma, ZAP 70 - Defekte/Mangel - Chromosomen: 2,11,14,19,20,X	gestörte B- und T-Zellfunktion und Zahl ↓, defektive Signale von IL-2, -4, -7, -9, 15, TCR - Rezeptorendefekt, Immunglobuline ↓
MHC- Klasse I - Defizienz	Mutation im TAP-Gen	keine MHC-Klasse I Moleküle, keine CD8-T-Zellen
Bare Lymphozyten Syndrom	Defekt im MHC-Klasse II Genpromotor - Chromosom: 16	keine MHC-Klasse II Moleküle, keine CD4-T-Zellen
DiGeorge Syndrom	Aplasie des Thymus Chromosom: 22	keine T- und B-Zellreifung, T-Zellen ↓
Ataxia Teleangiectasia	gestörte Zellzykluskinase Chromosom: 11	niedrige IgA- und IgG-Spiegel, T-Zellen ↓
Wiskott - Aldrich - Syndrom (WAS)	u.a. fehlerhafte Expression von CD-43 - Chromosom: X	IgM ↓, IgG normal oder IgG +IgE ↑, T-Zell-Immunität eingeschränkt
<u>Gammaglobulinämien:</u> 1. X-Chromosom gebundene Agammaglobulinämie	Defekt der Bruton's Tyrosinkinase - Chromosom: X	keine reifen B-Zellen: Immunglobuline ↓ v.a. IgG
2. X-Chromosom gebundenes Hyper-IgM-Syndrom	chromosomaler Defekt: Xq26	defekter CD40 Ligand , B- Zellreifung gestört (IgM ↑, IgG, IgA, IgG ↓)
3. allgemeine variable Immundefizienz (Variable Hypogammaglobulinämie)	Komplex (nicht genau bekannt)	IgG – IgA ↓, variable IgM-Spiegel, Plasmazellen ↓
4. selektive Immunglobulinklassen-Defizienz (meist IgA)	Komplex (nicht genau bekannt)	selektive B-Zellreifung ↓
Chediak-Higashi-Syndrom	Defekt: intrazelluläres Transportproteins (Mutation LYST-Protein–Chromosom: 1)	keine Lyse von Bakterien, da Lysosom unvollständig
Hereditärer Myeloperoxidasedefekt	Gendefekt - Chromosom: 17	keine Myeloperoxidase - Phagozytose beeinträchtigt
Chronische Granulomatose	Defekt: Cyt -p91, -p67, -p22 (Cytochrom b558) - Chromosomen: 1, 7, 16 und X	kein Oxidative Burst für Bakterienzerstörung (Hydrogen-Peroxidase-Funktion gestört)

Erkrankung	Spezifische (genetische) Defekte	Funktionsdefekt
Leukozyten-Adhärenz-Defekt (LAD)	Defekt: Integrin $\beta 2$ (CD18) - Chromosom: 21	geringe / keine Leukozytenextravasation durch u.a. geringe Anheftung an vaskuläres Endothel
Defekte des Komplementsystems (für alle einzelnen Faktoren beschrieben)	z.B. Mangel an Properdin (stabilisiert die C3a-Konvertase im alternativen Weg) - Chromosom: X	Opsonierung ↓, direkte Ag-Zerstörung ↓
Bloom's Syndrom	defektive DNA-Helikase	T-Zellen ↓, Immunglobuline ↓
Kongenitale Agranulozytosen	Unbekannt, Defekte der Vorläuferzellen, vermutlich G-CSF ↓ - Chromosom: 17	Neutropenie (<500/mm ³)
(Idopathische) Aplastische Anämie (Panmyelopathie)	Unbekannt, Erkrankung der CFU-GEMM und tw. der pluripotenten Stammzelle	periphere Panzytopenie
Paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie	somatische Mutation des Phosphatidylinositol-Glykan-Klasse-A-Anker-Gens auf einem X-Chromosom einer pluripotenten Stammzelle	alle Endzellen haben eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der Komplementlyse → Panzytopenie
Myelodysplastische Syndrome	Komplex und meist unbekannt, Proliferations- und Differenzierungsstörungen	Proliferations- und Differenzierungsstörungen der Stammzellen → Mono- bzw. Bilytopenien

Modifiziert nach Goldsby RA und Mitarbeiter, 2000 (1) und Gemsa D und Mitarbeiter, 1997 (3)
(Abkürzungen in der Tabelle: SCID=severe combined immunodeficiency, RAG=recombination activating proteins, ADA=adenosin desaminase, PNP= purin nucleosid phosphorylase, JAK=Januskinase, "ZAP"=eine Tyrosinkinase, MHC=major histocompatibility complex, TAP=transporter of antigenic peptides, Cyt=Cytochrome, G-CSF=granulocyte colony-stimulating factor, Ag=Antigen, TCR [membranständiger] T-Zellrezeptor, CFU-GEMM=colony-forming unit-granulocytes, erythrocytes, macrophages, megakaryocytes)

zu 3.) Die sekundären Phagozytose- Immundefekte, die durch andere Erkrankungen, bzw. ihre Behandlung entstehen, sollen nur überblickshaft dargestellt werden. Dazu gehören nach heutigem Erkenntnisstand (1-3):

- hämatologische Erkrankungen (z.B. Lymphome, Leukämien)
- immunsuppressive Therapie, Chemotherapie, Bestrahlung
- Knochenmarkstransplantation, onkologische Erkrankungen
- operative Eingriffe, exzessiver Stress
- Zustände nach Virusinfekten (u.a. Masern-, Mumps-, Varizellen-Zoster-, Herpes-, Rubella-, Influenza-, Poliomyelitis-, Gelbfieber-, Hepatitis-, Zytomegalie-, Epstein-Barr- Virus)
- chronische Infektionen, AIDS
- Unter-/Überernährung, Diabetes mellitus, Alkoholabusus
- Polytrauma /Verbrennungen, Eiweißverlust renal/enteral
- akute/chronische Lebererkrankungen, akutes/chronisches Nierenversagen
- Z.n. Milzentfernung, splenogene Neutropenie

- chronische Hämodialyse (u.a. Neutropenie)
- rheumatische Erkrankungen (z.B. Felty-Syndrom, Neutropenie und Komplementdefekte bei systemischem Lupus erythematoses)
- Sepsis

1.3 Sepsis

Auch bei Sepsiskranken kommt es zu einer Dysregulation des Immunsystems mit konsekutiver Einschränkung der Phagozytose (4). So ist z.B. bekannt, dass ein dramatischer Abfall von HLA-DR Protein (ein MHC Klasse II-Protein) auf der Monozytenoberfläche bei Patienten im septischen Schock auftritt. Dadurch kommt es bei reduzierter Antigenpräsentation zu einer deutlichen Einschränkung der Phagozytose (5). Eine supprimierte Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten von Sepsiskranken, die besonders markant bei den Nichtüberlebenden in Erscheinung tritt, beeinträchtigt ebenfalls die Funktion des unspezifischen Immunsystems in der Sepsis (6). Keel und Mitarbeiter berichteten 1997 über einen Zusammenbruch der autoregulatorischen Mechanismen von Neutrophilen bei Sepsiskranken, die z.B. in der proinflammatorischen Phase zu einer Inhibierung der Apoptose von neutrophilen Granulozyten führt (7). In der Phase der Immunparalyse wird v.a. durch IL-10 die Apoptose von Neutrophilen verstärkt. Ebenso ist die Migration der neutrophilen Granulozyten bei Patienten mit schwerer Sepsis deutlich eingeschränkt (8). Ursächlich dafür sollen erhöhte Plasmaspiegel des Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) sein (9). Wenisch und Mitarbeiter berichteten über eine reduzierte Phagozytose von E.coli und Sauerstoffradikalbildung der Granulozyten von Sepsispatienten im Vergleich zu Proben von Gesunden (10).

Sepsis stellt ein großes Problem in der modernen Medizin dar (11, 12). In den letzten Jahrzehnten konnte man zwar einen sehr langsamen, aber doch stetigen Anstieg der Inzidenz um 1,5 % pro Jahr verzeichnen (13, 14). Die Vereinigten Staaten von Amerika haben jährlich ca. 751.000 Sepsisfälle (14). Die Letalität liegt bei allen Sepsiskranken zwischen 28,6 % (14) und 35% (13), im septischen Schock bei über 60 % (13). Begleitumstände, die den Ausgang der Sepsis mitbestimmen, sind (13):

- der Grunderkrankung des Patienten und seine Begleiterkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, Lebererkrankungen)
- dem Infektionserreger (Gram-positive/ negative Bakterien, Pilze, Viren)

- der immunologischen Antwort (Grad der Hyperinflammation /Immunparalyse, immunsupprimierter Organismus z.B. bei Chemotherapie)
- der antimikrobiellen Therapie / früher oder später Beginn der antimikrobiellen Therapie
- Auftreten von septischen Schock und Multiorganversagen (MOV)

Die Sepsis stellt auch ein sozialökonomisches Problem dar. Schmid und Mitarbeiter errechneten 2002 direkte und indirekte Kosten, die durch Sepsiskranke in Deutschland hervorgerufen werden. Sie kalkultierten eine jährliche Gesamtsumme zwischen 3,6 und 7,9 Milliarden Euro (15).

Zur Definition der Sepsis werden meistens die gemeingültigen Sepsiszeichen nach der Konsensuskonferenz des „American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine im Jahre 1991 herangezogen (16). Dabei wird zwischen SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrom), Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock unterschieden:

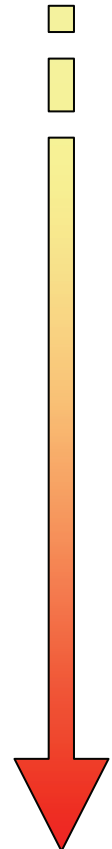
SIRS: mindestens zwei der folgenden Kriterien müssen erfüllt sein:

- Temperatur $> 38^{\circ} \text{C}$ oder $< 36^{\circ} \text{C}$
- Herzfrequenz > 90 Schläge / min
- Atemfrequenz > 20 Atemzüge / min oder $\text{PaCO}_2 < 4,3 \text{ kPa}$
- Anzahl Leukozyten $> 12.000 \text{ Zellen} / \text{mm}^3$, $< 4.000 \text{ Zellen} / \text{mm}^3$ oder $> 10\%$ unreife Formen (Linksverschiebung)

Sepsis: Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS) + klinische Zeichen und /oder Nachweis einer Infektion (positiver mikrobiologischer Befund)

Schwere Sepsis: Sepsis + mindestens eine Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotension

Septischer Schock: Schwere Sepsis + mit alleiniger Volumengabe nicht zu therapierende (vasopressorenpflichtige) Hypotension



Andere allgemein akzeptierte klinische Zeichen / Laborparameter der Sepsis können folgende sein (17, 18):

- | | |
|---------------------------------------|---|
| + Zeichen der peripheren Vasodilation | + Verschlechterung im mentalen Status |
| + erhöhter Sauerstoffverbrauch | + erhebliche Laktatazidose |
| + Thrombozytopenie / DIC | + erhöhte Werte von PCT, CRP, Zytokinen |
| + niedriger systemischer Widerstand | (z.B. IL-6), Neopterin, Elastase, Selektine |
| + ansteigendes Herzzeitvolumen | + Organdysfunktion / Organversagen |

Die nun relativ genau definierten SIRS-/Sepsiszeichen führten zu einer besseren Vergleichbarkeit von Sepsistherapiestudien untereinander seit 1992. Interessanterweise hatte diese Entwicklung zur Folge, dass seit dem über weniger positive Blutkulturbefunde in den Sepsistherapiestudien berichtet wurde, gleichzeitig aber mehr Daten über Organdysfunktionen gesammelt und erfasst wurden (19).

Die von der Konsensuskonferenz 1991 erarbeitete Definition blieb von Anfang an umstritten (20, 21). Aus diesem Grund wurde das so genannte „PIRO“-System entwickelt. In einer Konsensuskonferenz im Dezember 2001 trafen sich die führenden Intensivmedizinervereinigungen Europas und Nordamerikas, um neue Sepsis-Definitionen zu erarbeiten, die dem inzwischen angewachsenen pathophysiologischen Erkenntnisstand Rechnung tragen sollten. Ähnlich wie bei einer Tumorklassifikation wird ein Staging bei Patienten mit Verdacht auf Sepsis durchgeführt (22). Dieses Graduierungssystem umfaßt folgende vier wesentliche Bereiche:

- **P** für Prädisposition (vorbestehende Begleiterkrankungen, Alter, Geschlecht, genetische Polymorphismen bei Komponenten der Entzündungsantwort)
- **I** für Infektion (Art und Ort der Infektion, Resistenzlage, bakterielle Produkte z.B. LPS, bakterielle DNA)
- **R** für Response, also der Immunantwort (SIRS-Zeichen, andere Zeichen der Sepsis, Schock, CRP, PCT, IL-6, andere Zytokine, HLA-DR, Protein C)
- **O** für Organdysfunktion (welche und Anzahl der Organversagen und deren Einordnung in Scoringssysteme [z.B. MODS], Messung zytopathischer Effekte Zellstress - Apoptose bei einzelnen Organen)

Die Pathogenese (11, 12, 23-26) der Sepsis ist sehr komplex und bisher nicht in allen Einzelheiten bekannt. Heutzutage interpretiert man die Sepsis als eine Fehlregulation des Immunsystems bei einer Entzündungsreaktion (Inflammation) neben dem Vorliegen

einer Infektion. Dabei folgt dem SIRS, dass durch ein Überwiegen von proinflammatorischen Mediatoren gekennzeichnet ist, eine Phase dominierender Antiinflammation (CARS: Compensatory Antiinflammatory Response Syndrom). Das folgende Schema (Abb. 1) gibt nur eine stark vereinfachte Darstellung der Pathogenese:

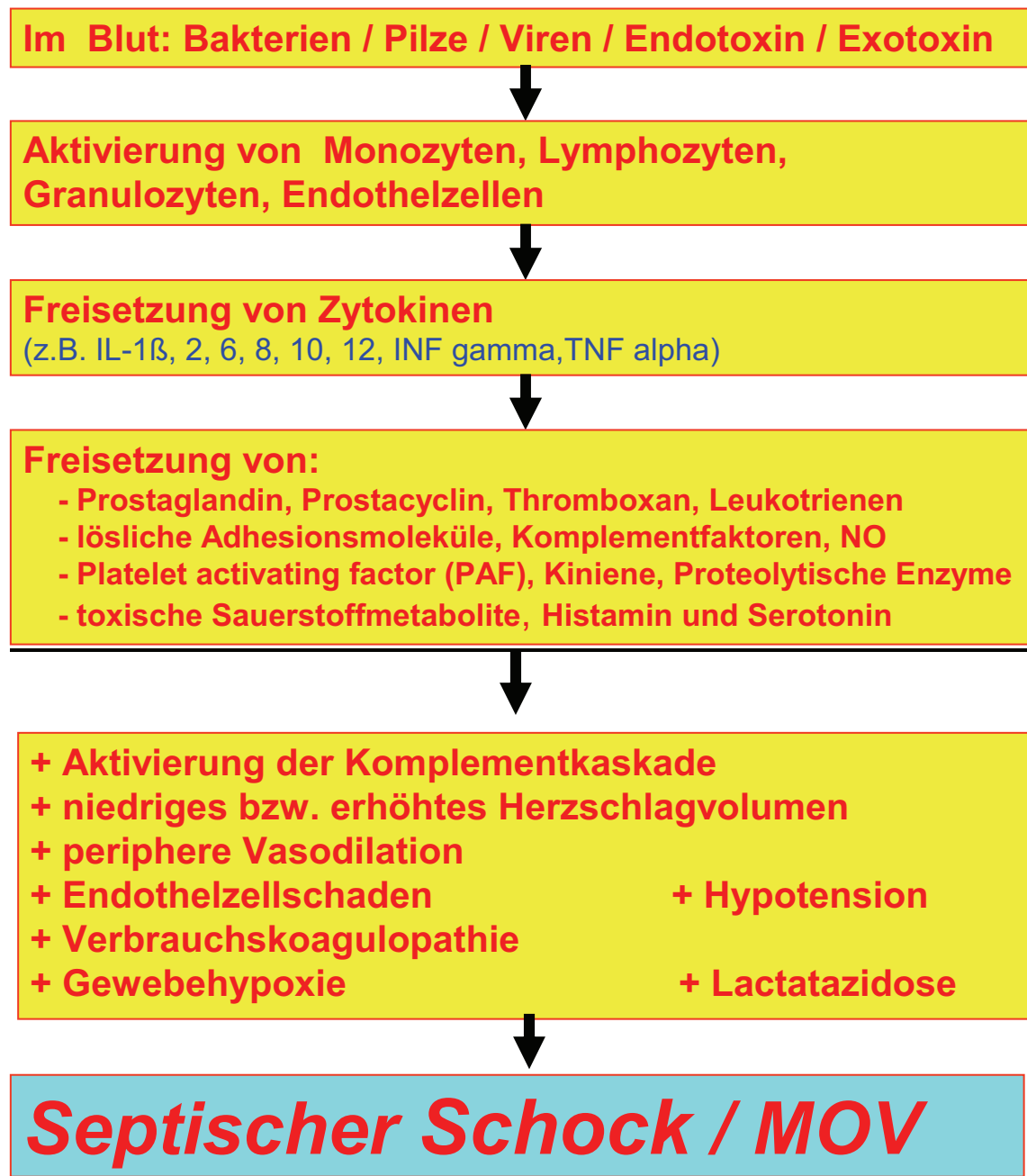


Abb. 1: Schematische Darstellung der Sepsispathogenese (modifiziert nach Literatur: 11, 12, 23-26)

1.4 Therapie der Sepsis

Zu den kausalen Therapien gehören die Fokussanierung und die Antibiotikatherapie. Die Fokussanierung (chirurgische Intervention oder computertomographisch gestützte

Punktion von Abszessen) ist ein wichtiger Teil der Standardtherapie und verbessert, je früher sie begonnen wird, die Prognose des Sepsis-Patienten (17, 18, 27).

Ebenfalls eine Prognoseverbesserung erbringt eine sehr frühzeitige (innerhalb der ersten Stunde nach Diagnosestellung) intravenöse antibiotische Behandlung (28). Vor Initiierung der zunächst kalkulierten Antibiotikatherapie sollten mindestens zwei periphere Blutkulturen, Kulturen von Trachealsekret und Urin, Kulturen von zentralvenösen Kathetern und Wundabstriche gewonnen werden (27). Studien zeigten, dass eine initiale antibiotische Kombinationstherapie die Entstehung von resistenten Bakterien und die Inzidenz von Superinfektionen reduziert (17, 18, 27). Die Antibiotikatherapie sollte alle 48-72 Stunden evaluiert werden und bei Befunderhalt des kausalen Mikroorganismus gegebenenfalls gezielt umgestellt werden (17, 18, 27). Eine empirische antimykotische Therapie ist nicht indiziert (17, 18, 27, 29).

Im folgenden Abschnitt werden kurz die weiteren Therapieansätze zur Behandlung von Patienten geschildert, die an einer Sepsis erkrankt sind (17, 18, 27).

Die Therapie der Hypotension beinhaltet als ersten Schritt die Volumengabe, wobei man sowohl Kolloide als auch Kristalloide verwenden kann. Keine der beiden Substanzgruppen hat sich in großen Studien wirksamer und verträglicher, als die andere erwiesen (18, 27). Bleibt darunter die Hypotension therapieresistent, sollten Vasopressoren und inotrope Substanzen eingesetzt werden. Noradrenalin (30, 31) als Vasopressor und Dobutamin (30) als inotrope Substanz erwiesen sich in kontrollierten Studien als am besten geeignet. Eine Inotropiesteigerung im Verlauf einer schweren Sepsis ist bei vielen Patienten sinnvoll, da die Patienten bei Ausbildung einer septischen Kardiomyopathie ein erniedrigtes Herzzeitvolumen haben. Je eher man der Hypotension und der daraus resultierenden Gewebshypoxie entgegensteuert, um so höhere Chancen hat der Patient zu überleben (32, 33). Nach Rivers E. und Mitarbeiter (2001) sollte nach dem Konzept der "Early goal-directed therapy" die hämodynamische Stabilisierung innerhalb von sechs Stunden erfolgen (32). Dabei sind vier diagnostische Marker vorgeschlagen worden: die zentralvenöse oder gemischtvenöse Sauerstoffsättigung (Ziel: >70%), der zentrale Venendruck (Ziel: 8-12 mmHg, bei Beatmung: 12-15 mmHg), der mittlere arterielle Blutdruck (Ziel: >65 mmHg) und der Laktatverlauf. Ein weiteres therapeutisches Vorgehen ist das Messen des Hämatokrits, der eventuell durch Blutkonserven auf 30% bei kritisch Kranken angehoben werden sollte, falls die zentralvenöse Sauerstoffsättigung unter 70 % ist.

Beim akuten Nierenversagen, als eine häufige Komplikation einer schweren Sepsis, steht an erster Stelle die Behandlung der Hypotension, bei Therapieversagen der Einsatz der kontinuierlichen Hämofiltration oder Hämodiafiltration (als veno-venöse Behandlung) und bei Kreislaufstabilität die intermittierende Hämodialyse (17, 27, 34).

Zum Ausgleich der metabolischen Azidose, die zu einem wichtigen Teil durch Anstieg des Laktates im Blut der Sepsiskranken verursacht wird, sollten Bikarbonatinfusionen, nur wenn der $\text{pH} < 7,35$ ist, verwendet werden (17, 27, 35). Diese Empfehlung ist allerdings durch keinerlei evidenzbasierte Daten abgesichert. Generell steht die Behandlung der Hypoperfusion an erster Stelle (18).

Eine schwerwiegende Komplikation des Sepsissyndroms ist das akute Lungenversagen, das bis zum Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS) weiter fortschreiten kann. Die Standardtherapie ist die mechanische Beatmung mit relativ hohen PEEP (Positive End-Expiratory Pressure) und einem geringen Atemzugvolumen (Ziel: 6 ml/kg Körpergewicht) (17, 18, 27). Ziel ist u.a. eine Begrenzung des Spitzendrucks (< 30 mmHg), und damit der weiteren Lungenschädigung. Unter diesem Regime konnte in mehreren großen Studien eine Reduktion der Mortalität um bis zu 9% nachgewiesen werden (36). Dabei erwies sich ein geringgradiges (permissive) Hyperkapnie als nicht mortalitätssteigernd (37). Eine Bauchlagerung bzw. 135 Grad Seitenlage kann bei Patienten mit ARDS die Oxygenierung signifikant verbessern (38). Als nicht überzeugend in der Therapie des akuten Lungenversagens bei erwachsenen Patienten erwiesen sich die Inhalation von NO, die intravenöse (i.v.) Gabe von Glukokortikoiden, die Applikation von Surfactant und die Inhalation von β Agonisten (17, 18, 27).

Eine Sepsis ist häufig assoziiert mit einer Verbrauchskoagulopathie (DIC Dissiminated Intravascular Coagulation). Es besteht ein Circulus vitiosus, da sowohl eine Inflammation eine DIC fördert, aber auch eine DIC wiederum zur weiteren Inflammation führt (11, 12). Die Behandlung der Verbrauchskoagulopathie erfolgt nur bei Blutungen oder Blutungsgefährdung, z.B. bei frisch operierten Patienten (17, 27). Zur Therapie werden die Bestandteile des Gerinnungssystems eingesetzt, die vermehrt verbraucht wurden. Verfügbar sind Fresh Frozen Plasma (FFP), Konzentrate von Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten. Thrombozyten sollten nur gegeben werden, wenn der Anzahl $< 5000 /\mu\text{l}$ ist, oder wenn der Patient blutet und die Anzahl unter $50000 /\mu\text{l}$ ist (17, 27). Ebenfalls als sinnvoll hat sich in großen Studien die AT-Gabe (Antithrombin) erwiesen, aber nur wenn der AT Wert im Blut wesentlich erniedrigt ist (ca. $< 70 \%$, 17, 27).

Als eine weitere Therapieoption hat sich die Gabe von Kortikosteroiden etabliert. Im Verlauf einer Sepsis kommt es häufig zu einer relativen Insuffizienz der Nebennieren. So hat sich die Gabe von niedrig dosiertem Hydrokortison (200-300 mg pro Tag) für sieben Tage bei Patienten im septischen Schock als sehr effektiv in einer großen Studie gezeigt (39). Sie führte zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität. Diese positiven Ergebnisse wurden in einer weiteren Studie bestätigt (33). Als unwirksam erwies sich die Gabe von hoch dosierten Glukokortikoiden für eine kurze Zeit (30 mg/kg für ein bis zwei Tage) (17, 27).

Zu einer ebenfalls signifikanten Reduktion der Mortalität führte die intensivierete Insulintherapie bei kritisch kranken Patienten auf Intensivstationen, auch bei vorher nicht bestehendem Diabetes mellitus. Der Blutzuckerspiegel der Patienten soll dabei unter einem Wert von $<8,3$ mmol/l gehalten werden (18, 33, 40). Ein Beleg der Wirksamkeit dieser Therapie auch bei Sepsispatienten im Rahmen einer großen Studie ist bisher nicht erfolgt (18).

Die gesicherten unterstützenden Therapien umfassen die Thromboseprophylaxe mit der Gabe von unfractionierten oder niedermolekularen Heparinen, die Ulkus Prophylaxe mit H_2 Rezeptorinhibitoren (z.B. Ranitidin) und die optimale Ernährung des Sepsiskranken (17, 18, 27). Eine tägliche Kalorienzufuhr von mindestens 25-30 kcal/kg sollte gewährleistet werden. Die enterale Ernährung, wenn es keine Kontraindikationen dafür gibt, ist die bevorzugte Methode, da sie die normale Magen Darm Funktion anregt und die Normalflora stabilisiert. Eine frühzeitige, d.h. innerhalb von 48 Stunden begonnene enterale Ernährung senkte signifikant die Mortalität in einer kürzlich erschienen Studie von kritisch kranken und beatmeten Patienten (41).

Eine neue Strategie zur Verminderung der Entstehung von freien Radikalen und Superoxiden ist die supranormale Selensubstitution. Dies erscheint ein sinnvoller Therapieansatz bei Sepsispatienten zu sein, da nach bisherigen Studien in der Sepsis ein Mangel an antioxidativ wirkenden Substanzen besteht. Die alleinige Gabe von Antioxidantien erbrachte bisher keinen Überlebensvorteil für Sepsispatienten, so dass der enzymatisch geregelte Weg (oft Selenoproteine) überlegen erscheint. Bisher sind sieben kleinere Studien mit Sepsispatienten gelaufen, die aber in der Metaanalyse kein signifikanten Trend erkennen ließen (18, 42). Andererseits sind im Jahre 2007 die Daten einer multizentrischen prospektiven Phase-III-Studie (SIC-Studie) mit 189 SIRS- oder Sepsis-Patienten bekannt geworden: durch Selengabe (1000 μ g/Tag für 14 Tage i.v.) kam es zu einer statistisch signifikanten Reduktion der Letalität um 14,3% (43).

Zwei weitere neue Therapieansätze zur Behandlung der Sepsis sind die Gabe von AT (Antithrombin) und von APC (Activated Protein C; 17, 27).

AT, als ein Inhibitor der Blutgerinnung mit antiinflammatorischen Eigenschaften, wurde in einer Phase III Studie mit über 2300 Patienten über vier Tage i.v. (täglich 30000 IU) gegeben (44). Es zeigte sich, daß sowohl die Anzahl der Organversagen, als auch die Dauer einer DIC durch AT Gabe reduziert wurden. Aber die Mortalität konnte durch AT nicht signifikant gesenkt werden (Endpunkt: 28 Tage Mortalität). Ein Problem der Studiendurchführung war, daß meistens auf die gleichzeitige Gabe von niedrigdosiertem Heparin i.v. nicht verzichtet wurde. So kam es zu mehr Blutungen in der AT Gruppe. Andererseits ist bekannt, dass Heparin die antiinflammatorische Wirksamkeit von AT stark hemmt. AT wird derzeit nicht zur Behandlung der schweren Sepsis und des septischen Schockes empfohlen (18).

Die derzeit hoffnungsvollste Neuentwicklung ist das aktivierte (rekombinante) Protein C (APC). Diese Substanz hat antithrombotische, antiinflammatorische und profibrinolytische Eigenschaften. In einer Phase III Studie (PROWESS-Studie, 45) mit 1690 Patienten mit septischen Schock oder schwerer Sepsis wurde APC über 96 Stunden i.v. (24 µg/kg Körpergewicht/h) gegeben. Die 28 Tage Mortalität betrug in der APC Gruppe 24,7 %, in der Placebo Gruppe 30,8 %. Ein Problem der Anwendung von APC liegt in der Verstärkung einer Blutungsneigung. Die Inzidenz von Blutungen war mit 3,5 % höher in der APC-Gruppe, als in der Placebo-Gruppe (2,0%, p 0,06). So darf APC z.B. bei chirurgischen Patienten nur eingesetzt werden, wenn die letzte Operation mehr als 30 Tage her ist (18). Angus und Mitarbeiter veröffentlichten 2004 eine Arbeit, in der sie über das Langzeitüberleben der in der PROWESS-Studie eingeschlossenen Patienten berichteten (46). Danach war das Krankenhausüberleben statistisch signifikant höher in der APC-Gruppe, als in der Placebo-Gruppe (p 0,03). Das Überleben nach drei, sechs und zwölf Monaten unterschied sich aber nicht signifikant zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

1.5 Extrakorporale Sepsistherapie

Größere Studien erfolgten bei den extrakorporalen Behandlungsverfahren mit Hämofiltration und Hämodialyse bei Patienten mit schwerer Sepsis, mit und ohne Nierenversagen (17, 47, 48). Es zeigte sich kein positiver Effekt für das Überleben der Patienten (49). Teilweise ergaben die Studien statistisch signifikant niedrigere Zytokin

Werte bei den filtrierten Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine neuere Entwicklung ist die Hochvolumen Hämofiltration für Patienten im katecholaminresistenten septischen Schock (47, 50). Durch eine deutliche Erhöhung der Ultrafiltrationsrate konnten die Arbeitsgruppen um C. Ronco (2000) und CS Bouman (2002) die Letalität von Intensivpatienten mit einem Nierenversagen signifikant senken (51, 52).

Mit viel Hoffnung wurden Adsorber zum unspezifischen, aber auch zum spezifischen Entgiften von Sepsismediatoren eingesetzt (53, 54). Als Adsorber werden u.a. verwendet: Aktivkohle (55), Ionenaustauscher (Resin, 56, 57), Endotoxin-Adsorber (z.B. Polymyxin-B (58-60) und Polymethacrylat-gebundenes Albumin (61). In der Zusammenschau der Literatur wird bewusst, dass auch die Adsorbertechnologie bisher in der Sepsistherapie keinen Überlebensvorteil bei Sepsispatienten erbringen konnte (47, 48).

Studien über Therapeutischen Plasmaaustausch (TPA) bei Patienten mit schwerer Sepsis gibt es nur sehr wenige, außerdem beinhalten sie meist nur ein kleines Patientenkollektiv. Sie zeigten zwar meist eine deutliche positive Tendenz der TPA Gruppe im Sinn einer besseren Krankheitsbewältigung; letztendlich müssen aber größere und kontrollierte Studien den Beweis der Wirksamkeit des TPA bei der Sepsis erbringen (17, 49). Mit unterschiedlichem Erfolg wurde der TPA bei schwerer Meningokokkensepsis bei Kindern angewandt (17). Stegmayr und Mitarbeiter veröffentlichten 2003 die Resultate einer retrospektiven Plasmaaustauschstudie, in der 76 Patienten eingeschlossen worden waren (62). Die Patienten, die ein Multiorganversagen und eine sich verschlechternde Verbrauchskoagulopathie aufwiesen, wurden neben der konventionellen Therapie durchschnittlich zwei Mal mit einem Plasmaaustausch (30-35 ml/kg Körpergewicht) behandelt. 66% der Patienten benötigten ein Nierenersatzverfahren, bei 88% lag ein septischer Schock vor und der mediane APACHE (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) II Score lag bei 21. Bei dieser Studie überlebten 82% der Patienten und konnten das Krankenhaus verlassen. Das vorausgesagte Überleben der eingeschlossenen Patienten, basierend auf dem APACHE II Score, lag bei nur 33%. Dieses Ergebnis war erstaunlich positiv, allerdings ist ihr Wert wegen des Fehlens einer Kontrollgruppe und des retrospektiven Charakters eingeschränkt. Im Jahre 2002 veröffentlichten Busund und Mitarbeiter die Ergebnisse einer prospektiven, randomisierten und kontrollierten klinischen Studie mit 106 Patienten, die entweder eine schwere Sepsis oder einen septischen Schock hatten

(63). Alle Patienten erhielten eine konventionelle Sepsistherapie. 54 Patienten wurden zusätzlich mit einem Plasmaaustausch (30-40 ml/kg Körpergewicht) behandelt (27 Patienten zweimal innerhalb von 24 Stunden, 27 Patienten nur einmal). Der mediane APACHE III Score der Patienten war 59 und 55,5% der Patienten waren im septischen Schock. Der primären Endpunkt war die 28-Tage Mortalität. Sie lag in der Kontrollgruppe bei 53,8 % und in der Plasmapherese Gruppe bei 33,3% (was einer absoluten Risikoreduktion von 20,5% in dieser Gruppe entsprach). Letztendlich werden die bisherigen hoffnungsvollen Resultate zur Anwendung des Plasmaaustausches bei schwerer Sepsis durch eine große multizentrische, prospektive, randomisierte und kontrollierten klinischen Studie überprüft werden müssen.

1.6 Bioartifizielle Organunterstützungssysteme

Bioartifizielle Organunterstützungssysteme sind auf der Nutzung von Zellen basierende Bioreaktoren, die für eine gewisse Zeit den Ausfall eines Organsystems bei einem kritisch kranken Patienten kompensieren sollen. Dabei soll die organunterstützende Therapie auch zu einer Regeneration des betroffenen Organsystems beitragen. Als extrakorporale Behandlungsverfahren gibt es bioartifizielle Organunterstützungssysteme für Patienten mit Leberversagen, mit Nierenversagen und für Patienten mit schwerer Sepsis.

Die Entwicklung von Leberzellbioreaktoren ist relativ weit fortgeschritten:

Ein effektives Leberunterstützungssystem soll nach Möglichkeit das ganze biochemische Potential einer gesunden Leberzelle besitzen (64). Bei den Biohybridsystemen für die Lebertherapie sollen die tierischen oder humanen Leberzellen die Funktion der Entgiftung übernehmen. Außerdem könnte durch ihren Einsatz theoretisch auch die Übernahme von Synthese- und Regulationsfunktionen erwartet werden.

Das ELAD-System (Extracorporeal Liver Assist Device-VitalTherapies, Inc., San Diego, USA) mit humanen Hepatozyten (Hepatoma-Zelllinie C3A) an der Außenseite von Hohlfasermembranen wurde zuerst erfolgreich an Hunden eingesetzt (65-68) und befindet sich zurzeit in klinischer Erprobung (69). Die erste kleine Studie mit 24 Patienten zeigte allerdings keinen Vorteil des Systems im Hinblick auf Überleben und Überbrückung zur Transplantation (70, 71).

In dem Berliner MELS-System (Modular Extracorporeal Liver Support-Hybrid Organ GmbH, Berlin) werden isolierte Schweinehepatozyten im Extrakapillarraum eines Hohlfaserbioreaktors verwendet (72). Eine kleine Anzahl von Patienten konnte erfolgreich behandelt und so die Zeit bis zur Lebertransplantation überbrückt werden (73). Ein neuer Ansatz dieser Arbeitsgruppe ist die Kombination ihrer bioartifiziellen mit einer artifiziellen (Albumindialyse) Leberunterstützung. Sauer und Mitarbeiter berichteten 2003 über die erfolgreiche Behandlung einer Patienten mit primärer Nichtfunktion einer transplantierten Leber mit dieser kombinierten Methode, die im Verlauf der Behandlung ihre volle Funktion aufgenommen hat (74). Eine etwas andere Idee verfolgt das HepatAssist-System (Arbios Systems, Inc., Los Angeles, USA), in dem die porcinen Hepatozyten auf beschichteten Dextranmikroträgern gezüchtet und in den Extrakapillarraum eines Dialysators gebracht werden (75-78). Mit dem HepatAssist-System wurde die bisher größte klinische Studie bei den bioartifiziellen Leberunterstützungsverfahren durchgeführt (171 Patienten). Es wurde eine positive Rolle bei der Überbrückung zur Transplantation festgestellt, leider aber kein Einfluss auf die Überlebensrate bei den Nichttransplantierten (79).

Zur Behandlung eines septischen Schocks mit Multiorganversagen (mit Nierenversagen) versucht die Arbeitsgruppe Humes (Ann Arbor, USA) einen Nierentubuluszellbioreaktor zu etablieren. Bei dem sogenannten RAD-System (Renal Tubule Assist Device) wachsen ca. 1×10^9 Tubuluszellen als Monolayer in einem normalen Hämofilter. In einem i.p. Schweinemodell der Gram-negativen Sepsis konnte eine verlängerte Überlebenszeit, eine kardiovaskuläre Stabilisierung und geringere Zytokinspiegel bei den mit Zellen behandelten Tieren, im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden (80). Eine erste größere klinische Studie bei Patienten mit septischen Schock und Multiorganversagen läuft derzeit (81-82).

Dasselbe System erbrachte in einer Phase I/II klinischen Studie eine Reduktion der Zytokinspiegel, einer Verbesserung der kardiovaskulären Stabilität, eine Besserung der Nierenfunktion bei Patienten mit akutem Nierenversagen bei Multiorganversagen (83, 84).

Extrakorporale bioartifizielle Immununterstützungssysteme zur Sepsistherapie befinden sich am Beginn der klinischen Erprobung. Neben direkten Wirkungen, wie z.B. der Phagozytoseunterstützung, sollen bioartifizielle Immununterstützungssysteme

(Bioreaktoren) eine immunmodulatorische Komponente besitzen, z.B. durch Mediatorenfreisetzung, aber auch durch deren Adsorption. Die Immunmodulation soll der Dysregulation des Immunsystems des Sepsiskranken positiv entgegenwirken.

Gegenstand dieser Promotionsarbeit ist ein weiteres extrakorporales bioartifizielles Organunterstützungssystem, das so genannte Extracorporeal Immune Support System (EISS, Abb. 2). Durch einen Phagozytenbioreaktor in einem Plasmaperfusionsmodell soll das Immunsystem von Patienten mit einer Sepsis unterstützt werden (85). Dieser Ansatz erscheint sinnvoll, da eine Einschränkung der Phagozytosefähigkeit bei Sepsispatienten bekannt ist (siehe Punkt 1.3). Andererseits könnte dieses System auch zu einer Immunregulation beitragen, indem die Phagozyten selber Zytokine produzieren oder eventuell auch abreichern. Für die Entwicklung eines Phagozytenbioreaktors wurde die humane Promyelozytenzelllinie HL-60 verwendet, die in die granulozytäre Richtung differenziert wurde. Bei guter Funktionalität dieser Zellart als Modellzelle muss man aber streng auf Sicherheitsaspekte zur sicheren Anwendung am Menschen bei der Entwicklung eines Phagozytenbioreaktors achten (85). Potentielle Risiken solch einer Behandlung könnten folgende Komplikationen sein: das Auftreten einer allergischen Reaktion, Hämolyse, Reaktionen durch Mediatoreneinschwemmung (z.B. durch IL-8), transfusionsassoziierte Reaktionen (z.B.: die transfusionsassoziierte akute Lungeninsuffizienz), Infektionsübertragung und die HLA (human leukocyte antigen) Sensibilisierung.

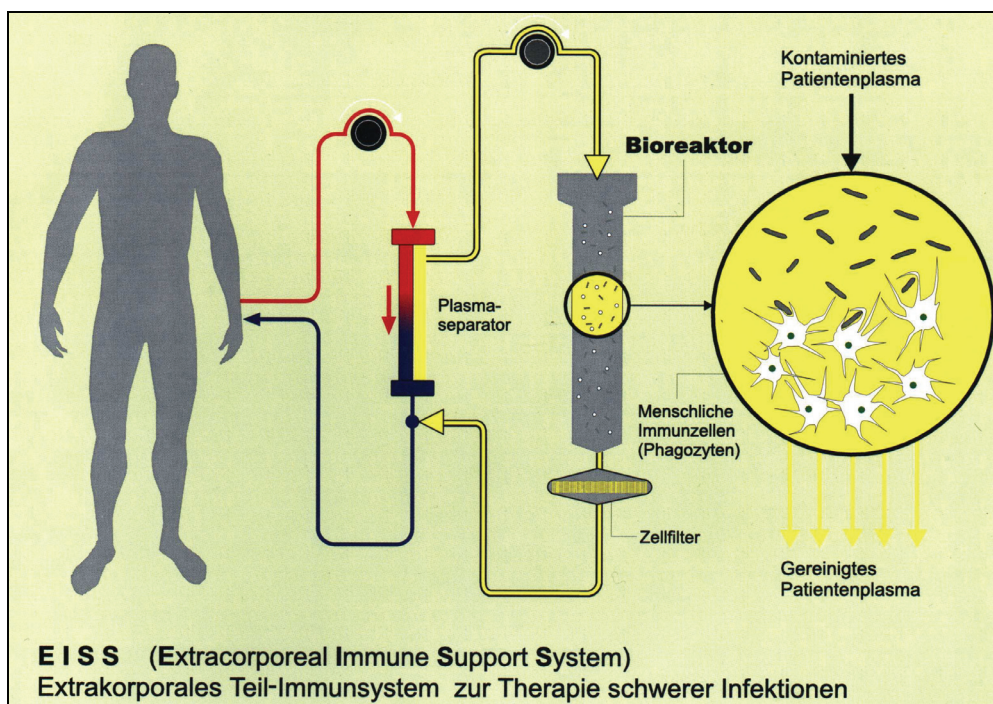


Abb. 2: Schema des EISS-Therapieverfahrens

2. Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, Erkenntnisse zur Leistungsfähigkeit und zur Sicherheit einer phagozytenbasierten Sepsistherapie zu gewinnen. Die Aufgabenstellung der Arbeit beinhaltet einen Teil in-vitro Vorversuche und einen experimentellen Hauptteil.

Vorversuche

Ein standardisiertes Phagozytoseexperiment soll aufgebaut werden, bei dem lebende Bakterien mit in die granulozytäre Richtung differenzierten HL-60 Zellen kontaktiert werden. Dabei soll die Phagozytoserate der HL-60 Zellen von Gram-negativen Bakterien ermittelt werden.

Ferner soll bei dem Phagozytoseexperiment die Zytokinfreisetzung bei der gewählten Kontaktzeit zwischen lebenden Bakterien und HL-60 Zellen gemessen und die Phagozytose elektronenmikroskopisch nachgewiesen werden.

Eine weitere Aufgabenstellung beinhaltet die Ermittlung eines geeigneten Filtermaterials zur sicheren Zurückhaltung der HL-60 Zellen, u.a. auch zur Sicherheit bei einer späteren Anwendung am Menschen.

Experimenteller Hauptteil

In diesem Teil der Arbeit soll dann die Verträglichkeit und Wirksamkeit der extrakorporalen bioartfiziellen Immununterstützung auf der Basis der HL-60 Zellen in einem ex-vivo Nager-Modell der Gram-negativen Sepsis nachgewiesen werden.

Die Überlebenszeit, klinische Parameter und das Auftreten von unerwünschten Effekten sollen Schwerpunkte der Beobachtungen im Tierexperiment sein.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur, Bakterienkultivierung und Statistik

3.1.1 Zellkultur und Differenzierung der HL-60 Zellen

Die permanente humane Promyelozytenleukämie-Zelllinie HL-60 (ATCC Nr. CCL-240) wurde in RPMI 1640-Medium (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) kultiviert, mit 1% Glutamin (SERVA Feinbiochemika GmbH, Heidelberg, Deutschland) und 10% fetalem Kälberserum (FCS, GIBCO Life Technologies, Eggenstein, Deutschland) substituiert und unter Standardbedingungen gehalten (37°C, 5% Kohlendioxid-Konzentration). Ein Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

Die Zelldifferenzierung in die granulozytäre Richtung wurde mit Vitamin-A-Säure (all-trans retinoic acid: atRA, CILAG GmbH, Sulzbach, Deutschland) angeregt in einer Konzentration von 1×10^{-5} molar (M) über fünf Tage. Die Differenzierung in die granulozytäre Richtung und eine damit verbundene Erhöhung der Zellaktivität konnte dabei in unserem Labor nachgewiesen werden (Promotionen von Tilo Kleinfeldt, 2004 und von Sybille Schmitz, 2005 an der Universität Rostock, Medizinische Fakultät), andererseits ist sie vielfach in der internationalen Literatur beschrieben (86-93).

Die Zellzählung erfolgte nach Anfärbung mit 0,4 prozentigem (%) Trypanblau in 0,9% Natriumchloridlösung (NaCl-Lsg.) in einen Mengenverhältnis von 1:1 in der Neubauerzählkammer.

3.1.2 Kultivierung der Bakterien

Alle mikrobiologischen Arbeiten wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Rostock durchgeführt.

Escherichia coli 07:K1, ein bekapselter Stamm (ATCC 23503), wurde auf Blutagar-Platten gezüchtet und für die Experimente in eine Stammkultur überimpft. Die Stammkultur bestand aus tryptischer Sojabohnen-Fleischbrühe (TSP; Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH Berlin, Berlin, Deutschland), die mit 10% humanem EDTA-Plasma versetzt wurde, um eine plasmaresistente Variante des Keimes zu züchten.

Die Stammkultur wurde bei 4-7 °C aufbewahrt. Die Reinheit der Kultur wurde durch regelmäßiges Ausplattieren einer entsprechenden Verdünnungsreihe mindestens

zweimal im Monat überprüft. Dabei wurden sich die Kolonieförmungen und Farben angeschaut, eine Gram Färbung angefertigt und eine "Bunte Reihe" durchgeführt.

Bunte Reihe

Zur Identifizierung und Differenzierung von Mikroorganismen werden verschiedene Stoffwechselleistungen der Bakterien getestet. Bakterien unterscheiden sich vielfältig in ihrer Enzymausstattung und damit in ihren Fähigkeiten, organische oder anorganische Verbindungen ab- oder umzubauen. Da in den Teströhrchen für die verschiedenen Stoffwechselleistungen nach Bebrütung und eventueller Zugabe der Indikatorreagenzien ein buntes Bild entsteht, spricht man hier von der „Bunten Reihe“ (94, 95).

Die biochemischen Tests waren Röhrchentests, die im mikrobiologischen Institut selbst hergestellt wurden.

Folgende Tests wurden durchgeführt [(+) bedeutet positive Reaktion, (-) negative Reaktion bei E. coli O7:K1]: Indolbildung mit dem Kovacs Reagenz: (+); Ureasenachweis: (-); Citratverwertung im Wachstumstest (Schrägagar Mangelmedium): (-); Kligler Test mit Zweizucker Eisen Schrägagar (enthält Glukose, Laktose und Eisen-II-sulfat) 1. Glukoseabbau: (+), 2. Laktoseabbau: (+), 3. Schwefelwasserstoffbildung: (-)

Gram-Färbung und Tusche-Kapselfärbung

Für die Gram Färbung werden die hitzefixierten Ausstriche für drei Minuten mit Karbolgentianaviolettsg. gefärbt, dann eine Minute mit Jodkaliumlsg. (Lugolsche Lsg.) gebeizt, anschließend in 96 % Alkohol entfärbt und mit verdünnter Safranlsg. (Fuchsin) für ca. 45 Sekunden gegengefärbt und zum Schluß mit Wasser abgespült und luftgetrocknet (94, 95). Im Anschluss erfolgte die mikroskopische Auswertung unter Ölimmersion. Die Gram positiven Bakterien binden Anilinfarbstoffe bei nachfolgender Jodbehandlung so fest, dass sie durch Alkohol nicht entfärbt werden (blaue Anfärbung). Die Gram-negativen Bakterien geben den Farbstoff wieder ab und werden dann mit einer Kontrastfärbung (Safranlsg.) dargestellt (rote Anfärbung).

Für die Tusche Kapselfärbung wurde ein Tropfen Tusche mit einem Tropfen Bakteriensuspension auf dem Objektträger gut gemischt und anschließend mit einem Deckglas ausgestrichen. Dann erfolgte die Hitzefixierung über offener Flamme und die Färbung mit verdünnter Safranlsg. für ca. eine Minute. Danach wird der Objektträger vorsichtig mit Wasser abgespült und das Präparat wird luftgetrocknet (94, 95). Zum

Schluss wurde das Präparat mit Canada Balsam fixiert und ein Deckgläschen aufgelegt. Im Anschluß erfolgte die mikroskopische Auswertung unter Ölimmersion. Der Gram negative *E. coli* wird durch das Fuchsin rot angefärbt. Die Kapsel nimmt den Farbstoff nicht auf und wird indirekt durch die nicht von Tusche ausgefüllten Bereiche im Präparat angezeigt.

Abb. 3 zeigt Gram-gefärbte *E. coli* O7:K1 (eigene Färbung und digitale Aufnahme mittels analoger Restlichtkamera, TIF-Dateien). Der rechte untere Bildausschnitt zeigt eine Tusche Kapselfärbung.

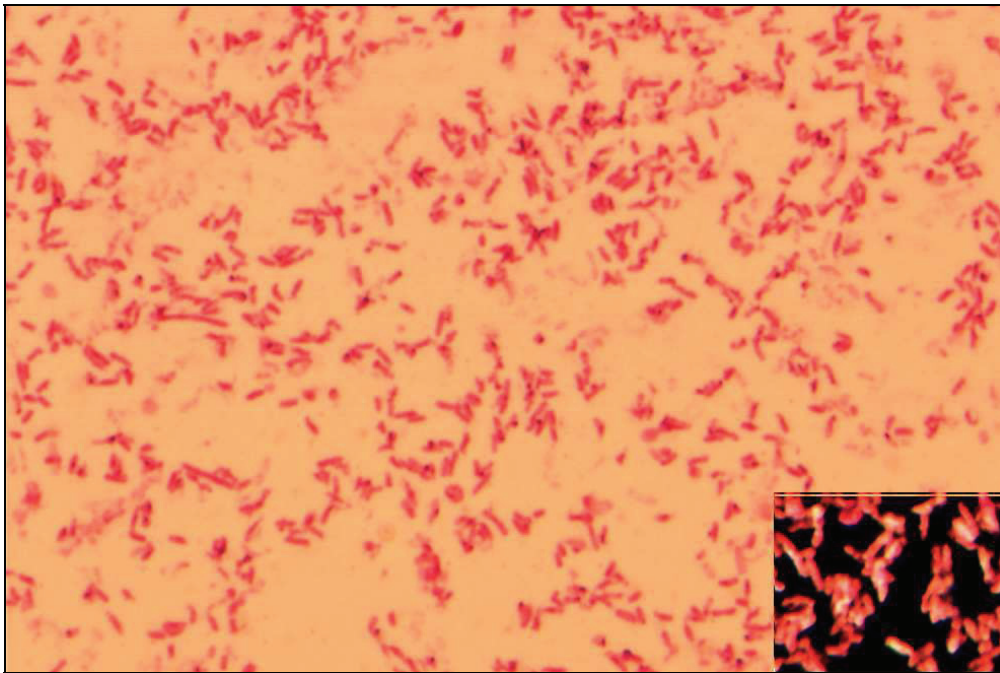


Abb. 3: Gram-Färbung und Tusche-Kapselfärbung (rechter, unterer Bildausschnitt) von *E. coli* O7:K1 (Beschreibung: siehe Text; Vergrößerung: 1:960-1000 unter Ölimmersion)

Zwei Tage vor einem Experiment wurden 0,5 Milliliter (ml) der Stammkultur in 4,5 ml TSB überimpft, die mit 10 % humanem EDTA-Plasma versetzt und 16 Stunden bei 37 °C bebrütet wurde. Danach wurden die Bakterien zweimal mit 0,9 % NaCl Lsg. gewaschen und zum Versuch in 0,9 % NaCl Lsg. mit 10 % humanem EDTA-Plasma aufgenommen.

Die Konzentration der Bakterien wurde nach Erstellen einer Verdünnungsreihe in 1:10er Schritten (4,5 ml 0,9 % NaCl-Lsg. + 0,5 ml der nächst höheren Verdünnung) durch Ausplattieren auf Agarplatten (Nähragar I, Institut für Immunpräparate und Nährmedien GmbH Berlin, Berlin, Deutschland) bestimmt. Für jede Verdünnungsstufe wurden zwei Platten verwendet, die mit je 50 Mikroliter (µl) beimpft wurden. Die

Agarplatten wurden dann bei 37 °C im Brutschrank für mindestens 16 Stunden bebrütet und anschließend die Anzahl der Bakterienkolonien manuell mit einem Zählgerät (KZG 01, Firma Maas, Deutschland) bestimmt. Als Resultat erhielt man die Kolonie bildenden Einheiten pro Milliliter (KBE/ml).

E. coli O111:B4, ein unbekapselter Stamm (ATCC 33780) wurde nur für die Filtrierungsexperimente verwendet. Dieser Stamm wurde wie *E. coli* O7:K1 kultiviert, mit dem Unterschied, dass er nicht mit 10 % humanem EDTA-Plasma gezüchtet wurde.

Die Ermittlung von OD-Werten (Optical Density) zur Konzentrationseinstellung der Bakterien erwies sich in Vorexperimenten als nicht zuverlässig.

3.1.3 Gewählte Bakterienstämme

E. coli O7:K1 wurde für unsere Experimente gewählt, da er in einem Sepsis-Nager-Modell beschrieben worden ist, das auch Grundlage des Sepsis-Modells dieser wissenschaftlichen Arbeit wurde (96). Außerdem wurde Wert auf die klinische Relevanz des Keimes gelegt. Sepsis wird in ca. 40 % der Fälle durch Gram-negative Bakterien hervorgerufen, *E. coli* ist dabei die am häufigsten isolierte Spezies. Bei 20 % der *E. coli* Bakteriämien findet man eine K1-Kapsel. Der Serotyp O7 und die K1-Kapsel Träger zählen zu den *E. coli* Gruppen, die außerhalb des Interstitiums überleben und stark pathogen sind (97).

E. coli O111:B4 wurde nur für Filtrationsexperimente verwendet. Der Serotyp O111 zählt zu den klassischen enteropathogenen Stämmen von *E. coli* (97). Dieser Keim wurde ebenfalls in dem oben genannten Sepsis Nager Modell verwendet (98).

3.1.4 Statistische Methoden

Alle Gruppenwerte wurden als Mittelwerte (MW) angegeben $\pm$ einfacher Standardabweichung (SA; Ausnahme: Vorexperiment Verträglichkeit, Punkt: 3.2.1, Angabe des Median, da die Anzahl der Tiere pro Gruppe nur 4 betrug). Im Werteanhang sind alle Messwerte von Parametern aufgeführt, die nicht beschrieben bzw. durch eine Tabelle oder Grafik im Punkt Ergebnisse dargestellt sind. Mittelwerte, Mediane, die Standardabweichungen (SA) und die Anzahl der Experimente/Tiere (n) ergänzen die Angaben. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant gewertet, wenn der p-Wert <

0,05 war. Zur Auswertung der in-vitro Untersuchungen wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt. Es handelt sich um einen nichtparametrischen Test für die Häufigkeitsverteilung gepaarter Stichproben. Für die Ergebnisse der Tierexperimente wurden für den Gruppenvergleich die ebenfalls nichtparametrischen Mann-Whitney-U- und Kruskal Wallis Tests verwendet, die für unabhängige Stichproben konzipiert sind. Vor dem Mann-Whitney-U-Test wurde als Vortest immer ein Kruskal Wallis Test durchgeführt. Nur bei dessen Angabe von möglicher statistischer Signifikanz wurde dann der U Test verwendet. Zur Erfassung von signifikanten Unterschieden in der Häufigkeitsverteilung von Symptomen der Versuchstiere zwischen den Gruppen wurde der Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Die Überlebenszeitanalyse wurde der Log-Rank-Test genutzt. Er ist ein nichtparametrisches Verfahren und wurde im Zwei-Gruppenvergleich verwendet.

Die statistischen Berechnungen wurden mittels des Computerprogrammes SPSS, Version 10.0 für Windows (SPSS Incorporation, Chicago, USA) durchgeführt.

3.2 In Vitro - Untersuchungen

3.2.1 Konzentrationskinetik von *E. coli* O7:K1

Die Bakteriensuspension wurde vor Gebrauch auf Eis gelagert. Da im Sepsis Nager Modell die Bakteriensuspension bis zu 24 Stunden auf Eis lagerte, wurde eine Bakterienkinetik über 48 Stunden aufgenommen, um sicher zu gehen, dass sich die Keimzahl unter diesem Procedere nicht wesentlich ändert.

Es wurden, wie in Punkt 3.1.2 beschrieben, vier 16 Stunden Kulturen angelegt. Die erste und zweite wurde nach dem Waschvorgang in 0,9 % NaCl Lsg. mit 10 % humanem EDTA-Plasma aufgenommen. Die dritte und vierte 16 Stunden Kultur wurde nach dem Waschen auch in NaCl Lsg. aufgenommen, dann aber noch 1:1 mit dem HL-60 Zell-Medium RPMI 1640 gemischt, genauso wie es später bei der Durchführung des Nager Sepsis Modells gemacht wurde (siehe Punkt 3.3.2). Zehn % humanes EDTA Plasma wurde ebenfalls hinzugesetzt. Danach wurden alle vier 16 Stunden Kulturen auf Eis gelagert und nach 24 und 48 Stunden erfolgte die Keimzahlbestimmung durch Ausplattieren (siehe Punkt 3.1.2).

3.2.2 Filtrierung von HL-60 Zellen und Bakteriensuspension

Um die quantitative Phagozytoseleistung der HL-60 Zellen bestimmen zu können, muß ein Filtermaterial gefunden werden, das erstens zuverlässig alle HL-60 Zellen zurückhält und zweitens, die verwendeten lebenden Bakterien nicht zurückhält sowie keinen schädigenden Einfluß auf die Keime ausübt.

Verwendete Filtermaterialien und Filtrierungsmethode

Es wurden drei Einmalfiltrationseinheiten unterschiedlicher Porenweite mit einem Filterdurchmesser von 30 mm der Firma Schleicher & Schuell GmbH, 37528 Dassel, Deutschland verwendet.

Die Filtermembran besteht bei dem 1,2 Mikrometer (μm) - Porenfilter (FP030/60) aus Celluloseacetat, einem hydrophilen Material mit einer Durchflussrate für Wasser von 400 bis 515 ml/min x bar. Der 5 μm - Porenfilter (FP030/10) hat eine Cellulosenitrat-Membran mit einer Wasser-Durchflussrate von 400 ml/min x bar. Ebenfalls eine Cellulosenitrat-Membran besitzt der 8 μm - Porenfilter (AE 99) mit einer Wasser-Durchflussrate von 800 ml/min x bar. Cellulosenitrat ist ebenso wie Celluloseacetat ein hydrophiles Filtermaterial.

Aufbau und Durchführung der Filtrationsexperimente

Je zwei ml einer HL-60 Zell-Suspension in RPMI 1640-Medium in unterschiedlichen Konzentrationen, differenziert bzw. undifferenziert wurden mittels eines geschlossenen Systems (Abb. 4) durch manuelle Push/ Pull-Technik durch den 1,2-; 5- und 8 μm Poren Filter filtriert. Die Zellzahl vor und nach der Filtration wurde durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer nach Trypanblau-Anfärbung ermittelt. Die Push/Pull-Technik (repetitive Veränderung der Flussrichtung) wurde in Hinblick auf eine spätere Anwendung in einem extrakorporalen Kreislauf angewandt. In der Literatur fanden sich Hinweise dafür, dass die Push/Pull-Technik wirksamer und effektiver als die konventionellen extrakorporalen Verfahren zur Organunterstützung und Detoxifikation sein könnte. Z.B. wurden mittels der Push/Pull-Hämodiafiltration Patienten mit Nierenversagen, Leberversagen und Sepsis mit Multiorganversagen behandelt (57, 98-100).

Unterschiedliche Konzentrationen von lebenden E. coli der Spezies O7:K1 und O111:B4 in 0,9 % NaCl-Lsg. wurden durch die 1,2 μm - und 5 μm Poren - Filter mittels der oben beschriebenen Technik mit einem Volumen von je zwei ml filtriert. Die

Konzentrationen der Bakterien wurden nach Erstellen einer entsprechenden Verdünnungsreihe in 1:10er Schritten durch Ausplattieren ermittelt (siehe 3.1.2).

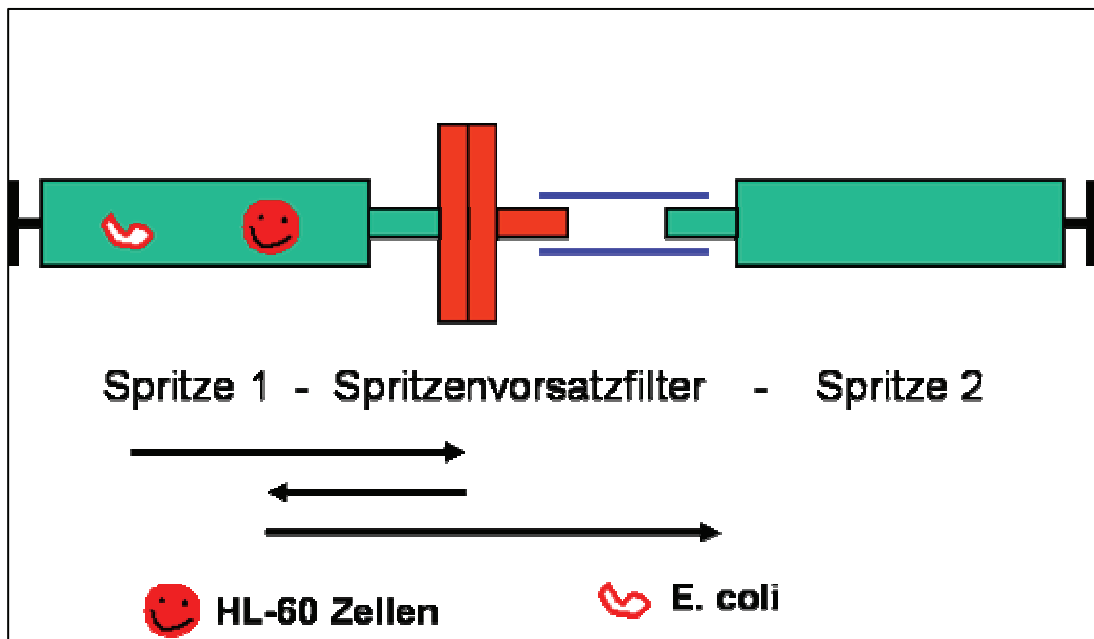


Abb. 4: Schema eines Filtrationsexperiments: geschlossenes System, Push/Pull -Technik (repetitive Veränderung der Flußrichtung bei extrakorporalen Verfahren)

Auswertung der Bakterienfiltration

Von jedem Versuch wurde eine Bakteriendurchlaßrate (Verhältnis der Endkonzentration der Bakterien zur Ausgangskonzentration in %) aus den Einzelansätzen ermittelt. Für jeden Versuchsansatz/-tag (definierte Filterporengröße und Bakterienkonzentration) wurde eine durchschnittliche Bakteriendurchlaßrate (Verhältnis der Endkonzentration der Bakterien zur Ausgangskonzentration für jeden Versuchsansatz in %) errechnet und das Minimum und Maximum (Spannbreite) angegeben.

Außerdem wurden die Ausgangs- und Endkonzentrationen der Bakterien $\pm$ SA vermerkt.

Auswertung der Zellfiltration

Von jedem Versuchsansatz/-tag wurde eine durchschnittliche Filterrückhaltungsrate (Verhältnis der Endkonzentration der Zellen zur Ausgangskonzentration in %) aus den Einzelansätzen ermittelt und das Minimum und Maximum (Spannbreite) angegeben.

Ferner wurden die Ausgangs- und Endkonzentrationen der Zellen vermerkt.

3.2.3 Bestimmung der quantitativen Phagozytoseleistung der HL-60 Zellen **im standardisiertem Phagozytoseexperiment**

Bei der Bestimmung der Phagozytoserate von lebenden Bakterien (E. coli) wurde der Versuchsaufbau so gestaltet, dass die Kontaktzeit der Bakterien mit den HL-60 Zellen und der Versuchsaufbau weitestgehend den späteren Bedingungen in einem komplexen Bioreaktor in einem Plasmaperfusionsmodell entsprechen.

Je ein ml differenzierte oder undifferenzierte HL-60 Zellen in Konzentrationen von 1×10^6 bzw. 1×10^7 Zellen/ml wurden über 20 Minuten bei 37°C mit ein ml lebender E. coli O7:K1 Bakterien-Lsg in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Auf eine ausreichende Oxygenierung wurde geachtet (Abb. 5). Die Bakterien wurden vor dem Experiment in 0,9% NaCl Lsg. mit 10 % humanem EDTA Plasma zur Opsonierung überführt. Die Kontaktzeit von 20 Minuten zwischen Zellen und Bakterien wurde unter der Vorstellung gewählt, dass zwei ml Patientenplasma, bezogen auf das Gesamtvolumen des Patientenplasmas, ca. 20 Minuten Kontakt mit den Zellen im späteren Bioreaktor im Plasmaperfusionsmodell bei einer sechs- bis achtstündigen Behandlungszeit haben würde.

Nach der Inkubation wurden die HL-60 Zellen von den Bakterien abfiltriert. Genutzt wurde dazu der Cellulosenitrat-Filter (FP 030/10) der Firma Schleicher&Schuell GmbH mit einer Porenweite von 5 µm (siehe Punkt 3.2.2). Eine entsprechende Kontrolle, bei der die Bakterien ohne Zellkontakt nur filtriert wurden, ist bei jedem Phagozytoseexperiment mitgeführt worden und ist in die Ergebnisse der Filtrationsexperimente mit eingeflossen. Die Zell-/Bakteriensuspensionen wurde mittels eines geschlossenen Systems durch manuelle Push/Pull-Technik filtriert, wie dies auch bei den Filtrierungsexperimenten durchgeführt wurde (siehe Punkt 3.2.2).

Die Ausgangs- und Endkonzentration der Bakterien wurde durch Ausplattieren ermittelt (siehe Punkt 3.1.2). Von jedem Versuchansatz/-tag wurde eine Phagozytoserate (Verhältnis der Endkonzentration der Bakterien zur Ausgangskonzentration in %) aus den Einzelansätzen ermittelt. Für jeden Versuchansatz/-tag (definierte Zell- und Bakterienkonzentration) wurde eine durchschnittliche Phagozytoserate (Verhältnis der Endkonzentration der Bakterien zur Ausgangskonzentration für jeden Versuchansatz in %) errechnet und das Minimum und Maximum (Spannbreite) vermerkt.

Außerdem wurden die Ausgangs- und Endkonzentrationen der Bakterien $\pm$ SA angegeben.

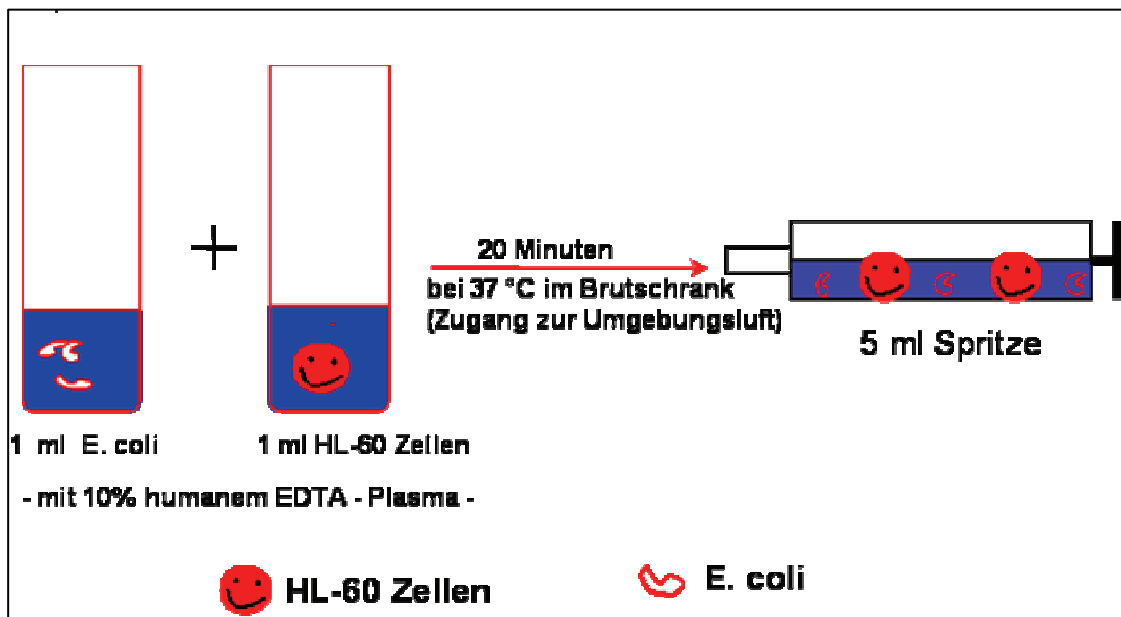


Abb. 5: Schema eines standardisierten Phagozytoseexperimentes

3.2.4 Freisetzung von TNF-alpha, IL-6 und IL-1 beta durch die HL-60 Zellen während des standardisierten Phagozytoseexperimentes

Von den HL 60 Zellen ist bekannt, dass sie Zytokine, insbesondere Tumornekrosefaktor (TNF) alpha, Interleukin (IL) 1 beta, IL 6, IL 8, IL-10 und Interferon (IFN) gamma freisetzen können (85, 91). Deshalb ist es notwendig, den Ausstoß von Zytokinen der HL-60 Zellen im standardisierten Phagozytoseexperiment zu bestimmen.

Je ein ml differenzierte bzw. undifferenzierte HL-60 Zellen in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml wurden über 20 Minuten bei 37°C mit ein ml lebender E. coli O7:K1 in einer Konzentration von 6×10^8 KBE/ml inkubiert. Die gemessenen Zytokinerggebnisse wurden mit zwei multipliziert, da eine 1:1 Verdünnung vorlag. Auf eine ausreichende Oxygenierung wurde geachtet (siehe Abb. 4 unter Punkt 3.2.3). Die Bakterien wurden vor dem Experiment in 0,9% ige NaCl Lsg. mit 10 % humanem EDTA Plasma zur Opsonierung überführt.

Nach der Inkubation wurden die HL-60 Zellen von den Bakterien wie unter Punkt 3.2.2 beschrieben abfiltriert. Der gewonnene Zellkulturüberstand wurde dann bis zur Messung bei 80 °C eingefroren.

Der gleiche Versuchsablauf wurde mit differenzierten oder undifferenzierten HL-60 Zellen ohne Bakterienzugabe zur Gewinnung von Vergleichswerten realisiert.

Mittels kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) wurden TNF alpha, IL-1-beta und IL-6 im Zellkulturüberstand gemessen (TNF alpha, IL 6: INNOTEST von INNOGENETICS N.V., Zwijndrecht, Belgien; IL 1 beta: DIACLONE Research, Besangon, Frankreich). Die vom Hersteller angegebene Sensitivität der ELISA-Kits lag bei der TNF alpha Messung bei 4 pg/ml, bei der IL-6 Messung bei 8 pg/ml und bei der IL-1 beta Messung bei 5 pg/ml als minimale detektierbare Konzentration. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt.

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern und immunchemischen Testverfahren können Proteine detektiert und quantifiziert werden (101). Bei dem verwendeten Typ von Sandwich-ELISA Tests sind polyklonale Antikörper an eine Matrix gebunden. Die Identifizierung der Proteine erfolgt über die spezifische Antigen-Antikörper-Reaktion (102). Wichtig ist hierbei, dass die Antikörper spezifisch nur das Protein erkennen und keine Bindung (Kreuzreaktion) mit anderen, aber strukturell sehr ähnlichen Proteinen (Peptidstrukturen) eingehen. Die Quantifizierung des primären Antigen-Antikörper-Komplexes wird gewährleistet über ein an den sekundären Antikörper gekoppeltes Enzym, das ein hinzu gegebenes Substrat umsetzt und zu einer Farbreaktion führt. Dabei ist die Intensität der Farbe proportional zur Konzentration des zu messenden Proteines. Die Messung der Absorption (OD-Wert) erfolgte mit einem Spektrophotometer (Anthos Reader 2001, Anthos Labtec Instruments, Wals/Salzburg, Österreich) bei einer Wellenlänge von 450 Nanometer (nm) (Referenzwellenlänge: 620 nm). Die Ermittlung der Werte erfolgte durch Abgleich mit der Standardkurve, die für jede ELISA-Platte erstellt wurde.

3.2.5 Nachweis der Phagozytose von lebenden Bakterien (*E. coli*) mittels der Elektronenmikroskopie

Ein geeignetes Verfahren, um die Phagozytose von Bakterien nachzuweisen, stellt die Elektronenmikroskopie dar.

Je ein ml differenzierte HL-60 Zellen in einer Konzentrationen von 1×10^7 Zellen/ml wurden bei 37°C mit ein ml lebender *E. coli* O7:K1 Bakteriensuspension (Konzentration: 3×10^8 KBE/ml) inkubiert. Auf eine ausreichende Oxygenierung wurde geachtet (siehe Abb. 4 unter Punkt 3.2.3). Die Bakterien wurden vor dem Experiment in 0,9% iger NaCl Lsg. mit 10 % humanem EDTA Plasma zur Opsonierung überführt. Die Kontaktzeiten zwischen Zellen und Bakterien waren 5, 15 und 45 Minuten.

Des Weiteren wurden Vergleichsproben von E. coli O7:K1, von differenzierten und undifferenzierten HL-60 Zellen ohne Bakterienkontakt angefertigt. Alle Proben wurden mindestens zwei Stunden in Glutaraldehyd (4% gepuffert in 0,1M Natriumphosphatpuffer) fixiert. Die weitere Bearbeitung der Proben wurde freundlicherweise vom Elektronenmikroskopischen Zentrum der Universität Rostock übernommen. Von jeder Probe wurden sowohl Schnitte für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) als auch für die Transmissions-elektronenmikroskopie (TEM) angefertigt. Für die TEM wurden die fixierten Proben in o.g. Puffer gewaschen und in 1% gepufferten Osmiumtetroxid OsO₄ nachfixiert. Nach mehrfachen Spülen in o.g. Puffer erfolgten die Entwässerung in aufsteigender Acetonreihe von 30-100% und die Anpassung an das Einbettungsmittel durch ein Gemisch aus Aceton und Einbettungsmittel (Epoxidharz „Araldit“, Firma FLUKA, Schweiz). Anschließend wurde die Polymerisation bei 58 °C im Brutschrank für zwei bis drei Tage durchgeführt. Die Semidünnschnitte wurden am Ultramikrotom (Ultratom, Firma LKB, Schweden) hergestellt und in einer Lösung mit Toluidinblau, Borax und Pyronin gefärbt. Die TEM erfolgte am EM 902 A der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland.

Für die REM wurden die fixierten Proben durch Kritische-Punkt-Trocknung (Critical Point Dryer K 850, Firma EMITECH, Grossbritannien) getrocknet und anschließend im Vakuum mit Hilfe des Sputer-Coaters SCD 004 der Firma BAL-TEC (Liechtenstein) mit Gold, Chrom oder Nickel bedampft. Die rasterelektronenmikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte am DSM 960 A der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland.

Geeignete Aufnahmen wurden sowohl digital (analoge Restlichtkamera, TIF-Dateien), als auch photochemisch auf Negativfilmen festgehalten.

3.3 Nager–Tier-Modell der Gram negativen Sepsis

Genehmigung des Tierexperiments

Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens: „Die extrakorporale Behandlung zur Prävention einer durch Bakterien induzierten Sepsis im Rattenmodell“ Aktenzeichen: 7221.31-1-041/94 erfolgte durch das Landwirtschaftsministerium Mecklenburg Vorpommern am 20.11.1997.

Tiere

Die Versuchstiere waren männliche, sechs bis acht Wochen alte CD-Ratten (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland). Die Versuchstiere wurden vier Tage vor dem Experiment durch den Züchter angeliefert und unter kontrollierten klimatischen Bedingungen mit normalem Hell- Dunkelrhythmus im Tierhaus des Experimentellen Forschungszentrums der Universität Rostock zu zweit in einem Käfig untergebracht. Jederzeit hatten die Ratten Zugang zu frischem Wasser und Futter.

Ort des Tierexperiments

Experimentelles Forschungszentrum der Medizinischen Fakultät Rostock, Kleintier-OP, Schillingallee 70

3.3.1 Vorexperiment Vertäglichkeit

In diesem Vorexperiment des Nager Sepsis Modells sollte gezeigt werden, dass nicht schon die alleinigen Gaben von humanem EDTA Plasma und HL 60 Medium RPMI 1640 zu Veränderungen klinischer Parameter (etwa im Sinne von Unverträglichkeitsreaktionen) bei den Versuchstieren führen können, da beide Substanzen im Haupttierexperiment i.v. gegeben werden.

Versuchsablauf

Nach einer gesundheitlichen Inspektion wurden 12 Ratten (Gewicht: 201-220 g) nach dem Zufallsprinzip in drei Versuchsgruppen eingeteilt, die nach der Zusammensetzung des Inokulums denen des Hauptexperimentes entsprechen (siehe unten und Punkt 3.3.2), mit dem Unterschied, dass keine Bakterien und HL 60 Zellen verwendet wurden. Die Beobachtungszeit betrug 168 Stunden.

Alle Eingriffe und Untersuchungen wurden unter Äther-Narkose durchgeführt.

Am ersten Versuchstag wurde nach Erfassung der Ausgangswerte (siehe Tabelle 3) die i.v. Gabe des Inokulums über die Schwanzvene durchgeführt. Dabei wurden drei Versuchsgruppen mit je vier Tieren gebildet, die sich in der Zusammensetzung des Inokulums in Anlehnung an das Sepsis-Tier-Modell folgendermaßen unterschieden:

- **Kontroll-Gruppe (KG):** 1 ml physiologische Kochsalzlösung

- **Unbehandelte Gruppe (UG):** 1 ml physiologische Kochsalzlösung mit 10 % humanem EDTA-Plasma

- **Behandelte Gruppe (BG):** 0,5 ml physiologische Kochsalzlösung und 0,5 ml RPMI Medium, beides mit 10% humanem EDTA Plasma versetzt

Im weiteren Verlauf wurden in regelmäßigen Abständen Puls, Blutgase und Temperatur bestimmt. Die Bestimmungen erfolgten nach dem in Tabelle 3 dargestellten Schema.

Am achten Versuchstag (nach 168 h) wurden die Endwerte (Tabelle 3) der Versuchstiere erfasst. Danach wurde unter Äthernarkose eine Herzpunktion durchgeführt. Sie diente zur Gewinnung von EDTA-Blut zur Anfertigung eines Blutbildes und Differentialblutbildes sowie zur Durchführung einer Blutgasbestimmung. Anschließend wurden die Tiere eingeschläfert.

Tabelle 3: Versuchsplan des Vorexperimentes Verträglichkeit des Sepsis-Tier Modells

Bestimmung von	Start: 0-Wert	1. Tag	2.–7. Tag	Endwert: 8. Tag
Gewicht	x			x
Blutbild				x
Puls	x	alle 2 h	alle 12 h	x
Blutgase	x	2. h, 12. h	alle 12 h	x
Temperatur	x	alle 2 h	alle 12 h	x

Blutgasbestimmung, Körpertemperatur- und Pulsmessung

Alle diese Untersuchungen erfolgten unter einer kurzzeitigen und flachen Äthernarkose. Die Pulsmessung erfolgte mittels eines Pulsoxymeters (Firma OHMEDA, Louisville, USA) am Schwanzansatz der Tiere. Die Körpertemperatur wurde rektal mittels eines herkömmlichen digitalen Thermometers (Hartmann Thermoal, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) gemessen. Eine retroorbitale Punktion erfolgte zur Gewinnung von Blut für die Blutgasanalyse. In eine zuvor heparinisierten Kapillare wurde das Blut aufgefangen. Anschließend wurden die Parameter mit einem Blutgas- und Notfallanalysesystem (Blutgas-Elektrolyt-HKT-System 348, Chiron Diagnostics GmbH, Fernwald, Deutschland) bestimmt.

Blutbild und Differentialblutbild

Die Anfertigung eines Blutbildes (Impedanz Signal Zählung; Gerät CD 3500 der Firma Abbott Deutschland, Wiesbaden, Deutschland) und eines luftgetrockneten Ausstriches

(panoptische Färbung nach Pappenheim mit May-Grünwald- und Giemsa Lösung) erfolgte freundlicherweise durch das Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Universität Rostock. Der Ausstrich für das Differentialblutbild wurde vom Promovenden mikroskopisch unter Ölimmersion differenziert. Pro Ausstrich wurden 100 Zellen ausgezählt und in die entsprechenden Arten von Blutzellen eingeteilt.

Die Daten der Blutbilder wurden einerseits dazu verwendet, um einen Vergleich der Mittelwerte (im Vorexperiment Verträglichkeit der Mediane) zwischen den Gruppen vornehmen zu können. Andererseits wurden die Anzahl der Tiere pro Gruppe (Fälle) mit einer Auslenkung in den pathologischen Bereich (z.B. Symptom Thrombopenie) bestimmt.

Dazu war es notwendig, *Normalwerte der CD-Rattenblutbilder* zu bilden, da aus der Literatur nur widersprüchliche, bzw. gar keine Angaben für die Altersgruppe der Ratten (sechs bis acht Wochen) zu gewinnen waren. Die Blutbilder von 12 Tieren des Vorversuches Verträglichkeit und 16 Ausgangsblutbilder der Tiere des Hauptversuches wurden zur Normalwertbildung herangezogen. Orientierend an den Literaturangaben (97, 103, 104) wurden folgende Einschlusskriterien für die Verwendung der Blutbilder zur Normalwertbildung definiert: im Differentialblutbild <10% stabkernige Granulozyten und >75 % Lymphozyten, Thrombozyten > 650000 / μl und Hämoglobin > 7 mmol / l.

Die Normalwerte wurden dann als Mittelwert $\pm$ doppelter Standardabweichung definiert und in den Tabellen der Blutbilder mit angegeben. Die Daten der Normalwertbildung sind im Anhang aufgeführt (Punkt 7.2).

Gewichtsbestimmung

Ein Ausgangs- und Endwert (nach 168 h) wurde von jedem Tier mit einer elektronischen Waage (S10-2720, Soehnle AG, Murrhardt, Deutschland) bestimmt.

3.3.2 Sepsis-Tier-Modell

In einem geeigneten Sepsis Tier Experiment sollte die Wirksamkeit und Verträglichkeit einer ex-vivo bioartifiziellen Phagozytoseunterstützung gezeigt werden. Das Nager Sepsis Modell wurde nach einem etablierten, der internationalen Literatur entnommenen Modell aufgebaut und für die speziellen Belange dieser Fragestellung modifiziert (96).

Herstellung der Behandlungssuspensionen (Inokulum)

Vor dem Beginn eines Tierexperiments mussten die Bakterien herangezüchtet und standardisierte Phagozytoseexperimente durchgeführt werden. Hierzu wurden zwei Tage vor dem Beginn eines Experimentes zwei 16 Stunden-Kulturen von *E. coli* O7:K1, a' fünf ml mit 10% humanem EDTA-Plasma angelegt. Am folgenden Tag wurde die exakte Ausgangskeimkonzentration durch Ausplattieren bestimmt und die Keime auf Eis gelegt. Mit einem Teil der Bakterien wurden zwei bis vier standardisierte Phagozytoseexperimente, wie unter Punkt 3.2.3 beschrieben, durchgeführt (Vorbehandlung mit 1×10^7 Zellen/ml und einer Zielbakterienkonzentration von 3×10^8 KBE/ml *E. coli* O7:K1). Anschließend wurden die Behandlungssuspensionen ebenfalls auf Eis gelegt.

Am ersten Versuchstag wurden dann die Keimkonzentrationen für die behandelte und unbehandelte Versuchsgruppe entsprechend den Ergebnissen des Ausplattierens der Bakterienausgangssuspension verdünnt oder konzentriert, um eine Ausgangskonzentration des standardisierten Phagozytoseexperiment von 3×10^8 KBE *E. coli* zu erreichen. Die Konzentration von 3×10^8 KBE *E. coli* war in dem Literaturmodell als zu 90% letale Dosis (LD-90 Dosis) angegeben worden.

Versuchsablauf

Nach einer gesundheitlichen Inspektion kamen die Tiere (25 CD-Ratten, Gewicht: 193-265 g) einen Tag vor Versuchsbeginn (Tag Null) einzeln in Polycarbonat Stoffwechselkäfige. 12 Stunden vor der Implantation eines Jugularis- und Karotiskatheters begann die Nahrungskarenz, die nach der Operation beendet wurde. Die Beobachtungszeit betrug 168 Stunden.

Zu Beginn des Experimentes wurde jeweils vier Versuchstieren ein Jugularis- und Karotiskatheter (Perfusorleitung) unter Äthernarkose implantiert. Danach wurden die Katheter alle sechs Stunden mit ca. 0,5 ml heparinisierter 0,9 % NaCl Lsg. angespült, um die Lumen offen zuhalten.

Danach erfolgte die Wiederaufwärmung aller Tiere für eine Stunde mit Rotlicht, da die Tiere durch die Äthernarkose leicht ausgekühlt waren.

Im Anschluss an die Wiedererwärmung erfolgte die Erfassung der Ausgangswerte (Null-Wert, siehe Tabelle 4) und die i.v. Gabe des Inokulums über den Jugulariskatheter. Dabei wurden drei Versuchsgruppen mit je acht bis neun Tieren

gebildet, die sich in der Zusammensetzung des Inokulums folgendermaßen unterscheiden:

- **Kontroll-Gruppe (KG, n 9):** 1 ml physiologische Kochsalzlösung
- **Unbehandelte Gruppe (UG, n 8):** 1 ml physiologische Kochsalzlösung mit 10% humanem EDTA-Plasma und 3×10^8 KBE E. coli O7:K1
- **Behandelte Gruppe (BG, n 8):** 1 ml der Behandlungssuspension vom standardisierten Phagozytoseexperiment (siehe oben)

Die Auswahl der Tiere für eine bestimmte Versuchsgruppe erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Im weiteren Verlauf wurden in regelmäßigen Abständen Puls, Blutgase, Elektrolyte, Blutdruck und Temperatur bestimmt. Ebenfalls wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben für die Bestimmungen von Zytokinen, Endotoxin und Bakterienzahl im Blut abgenommen. Die Bestimmungen erfolgten nach dem in Tabelle 4 dargestellten Schema.

Am achten Versuchstag (168 h) oder beim Versterben der Tiere (letzter Wert) wurden die Endwerte (Tabelle 4) der Versuchstiere erfasst. Anschließend wurden die noch lebenden Tiere mit 200 bis 400 mg Pentobarbital (Eutha 77, ESSEX Tierarzenei, München, Deutschland) i.v. eingeschläfert. Proben von Niere, Herz, Leber, Lunge, Milz und Pankreas wurden zur pathologischen Begutachtung entnommen und in Formalin fixiert.

Tabelle 4: Versuchsplan des Sepsis-Tier Modells

Bestimmung von	Start: 0-Wert	1. Tag	2.–7. Tag	Endwert: 8. Tag oder vor dem Ableben
Gewicht	x			x
Blutbild	x			x
Puls	x	2. h, dann alle 4 h	alle 6 h	x
MAB	x	alle 2 h	alle 6 h	x
Temperatur	x	2. h, dann alle 4 h	alle 6 h	x
Blutgase / Elektrolyte	x	2. h, 10. h, 20. h	alle 12 h	x
Bakterienkonzentration im Blut		24. h		
TNF - alpha		2. h, 6. h, 24. h		
IL-6		6. h		
Endotoxin		2. h, 24. h		
Histologische Probenentnahme				x

Puls und Gewichtsbestimmung, Anfertigung eines Blutbildes und Differentialblutbildes
siehe Punkt 3.3.1

Blutgas- und Elektrolytbestimmung, Körpertemperatur- und Blutdruckmessung
Die Körpertemperatur wurde mittels eines herkömmlichen digitalen Thermometers (in einer tiefen Hautfalte hinter dem Ohr; Hartmann Thermoal, Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland) gemessen. Der Karotiskatheter wurde für die direkte (blutige) Messung des mittleren-arteriellen-Blutdruckes (MAB; RFT Biomonitor, VEB Meßgerätewerk Zwönitz, Zwönitz, Deutschland) und zur Gewinnung von Blut für die Blutgasanalyse und Elektrolytbestimmung verwendet. In eine zuvor heparinisierte Kapillare wurde das Blut aufgefangen und anschließend wurden die Parameter mit einem Blutgas- und Notfallanalysesystem (Blutgas-Elektrolyt-HKT-System 348, Chiron Diagnostics GmbH, Fernwald, Deutschland) bestimmt.

Endotoxinbestimmung

Arteriell Blut (0,5 ml) wurde in pyrogenfreien, mit 20 IE Heparin versetzten Eppendorf Zentrifugenröhrchen aufgefangen und sofort auf Eis gelegt. Innerhalb von 20 Minuten wurden die Proben bei 2200 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand

(Plasma) wurde mit pyrogenfreiem Wasser 1:10 verdünnt und für 15 Minuten bei 75 °C im Wasserbad wärmebehandelt. Danach wurden die Plasmaproben bis zum Test bei 80 °C eingefroren.

Die Endotoxin Konzentration im Rattenplasma wurde mittels des Limulus Amebocyte Lysate (LAL)-Test ermittelt (Firma Chromogenix AB, Mölndal, Schweden). LAL ist ein Reagenz, dass aus den gewaschenen Blutzellen (Amebozyten) des Limulus polyphemus (Pfeilschwanzkrebs) gewonnen wird. Das LAL enthält ein Enzymsystem, dass durch die Anwesenheit von Endotoxin aktiviert wird. Dieses aktivierte Enzymsystem spaltet die farbbildende Substanz para Nitroanillin (pNA, Substrat: S-2423) unter Inkubation bei 37 °C auf, was zur Bildung einer gelben Farbe führt. Dabei ist die Intensität der Farbe proportional zur Konzentration des zu messenden Endotoxins. Die Messung der Absorption (OD-Wert) erfolgte als Endpunktmessung nach Abstopfung mit Essigsäure mit einem Spektrophotometer (Anthos Reader 2001, Anthos Labtec Instruments, Wals/Salzburg, Österreich) bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Ermittlung der Werte erfolgte durch Abgleich mit der Standardkurve, die für jede Endotoxin-Messreihe erstellt wurde. Das Endotoxin, das für die Standards verwendet wurde, stammt von E. coli O111:B4. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt (105-106).

Bestimmung von Ratten TNF alpha und IL-6

Arteriell Blut (0,5 ml) wurde in pyrogenfreien, mit 20 IE Heparin versetzten Eppendorf Zentrifugenröhrchen aufgefangen (Ausnahme: nach sechs Stunden TNF alpha und IL-6 Probe: 0,5 ml Serum Monovette) und die Proben bei 2200 g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurden die Plasma- und Serumproben bis zum Test bei 80 °C eingefroren. Mittels kommerziell erhältlichen ELISA-Kits (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) wurden TNF alpha und IL-6 gemessen (BioSource International, California, USA). Die vom Hersteller angegebene Sensitivität der ELISA-Kits lag bei der TNF alpha Messung bei 4 pg/ml und bei der IL-6 Messung bei < 31pg/ml als minimale detektierbare Konzentration. Das Testprinzip und weitere Prozedere ist unter Punkt 3.2.4 beschrieben.

Bestimmung der Bakterienzahl im Blut

EDTA Blut (0,5 ml) wurden den Tieren zur Bestimmung der Keimzahl im Blut abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei 4 7 °C gelagert, längstens für 60

Minuten. Die Konzentration der Bakterien wurde durch Ausplattieren auf Agarplatten ermittelt. Das unverdünnte Blut wurde mit einem Volumen von je 10 µl auf zwei Agarplatten ausplattiert, ebenso mit einem Volumen von je 100 µl. Gleichzeitig wurde eine Verdünnungsreihe in 1:5 er Schritten bis 1:15625 mit 0,9% iger NaCl Lsg. erstellt. Für jede Verdünnungsstufe wurden zwei Platten verwendet, die mit je 50 µl beimpft wurden. Die Agarplatten wurden dann bei 37 °C im Brutschrank für mindestens 16 Stunden bebrütet und anschließend die Anzahl der Bakterienkolonien manuell mit einem Zählgerät bestimmt (siehe Punkt 3.1.2).

Histologie

Allen während des Experimentes verstorbenen oder nach der Beobachtungszeit von 168 Stunden eingeschläferten Versuchstieren wurden nach Todeseintritt Gewebeproben von Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Pankreas für die lichtmikroskopische histopathologische Untersuchung entnommen und anschließend in 4 %igem gepufferten Formalin fixiert.

Die folgende Paraffineinbettung der fixierten Präparate, die Anfertigung der Schnittpräparate und die histopathologische Auswertung erfolgten freundlicherweise durch das Institut für Pathologie der Universität Rostock. Die histologischen Arbeitsschritte sind im Anhang (Punkt 7.4) aufgeführt.

Die histopathologische Untersuchung der Gewebeproben erfolgte ohne Kenntnis der klinisch bewerteten Krankheitsausprägung (blind), die Befunde wurden in einem modifizierten Untersuchungsprotokoll in Anlehnung an Woltmann und Mitarbeiter (107) erfasst. Eine zweite Bewertung der Befunde erfolgte durch semiquantitative Subsummierung der Einzelbefunde eines jeden Versuchstieres aller drei Testgruppen mit Einteilung in insgesamt geringe, mäßig starke und stärkere histopathologische Organveränderungen.

4. Ergebnisse

4.1 In vitro-Untersuchungen

4.1.1 Konzentrationskinetik von *E. coli* O7:K1

Im Sepsis Nager-Modell wurde die Bakteriensuspension bis zu 24 Stunden auf Eis gelagert, bevor sie genutzt wurde. Daher wurde eine Bakterienkinetik über 48 Stunden aufgenommen, um sicher zu gehen, dass sich die Keimzahl unter diesem Procedere nicht wesentlich ändert.

Es wurden vier 16 Stunden Bakterienkulturen angelegt, die für 48 Stunden auf Eis gelagert worden. Tabelle 5 zeigt, dass es zu keiner wesentlichen Änderung der Keimkonzentration während der 48 Stunden Beobachtungszeit und Lagerung von *E. coli* O7:K1 auf Eis kam.

Tabelle 5: Konzentrationskinetik von *E. coli* O7:K1

16–Stunden- Kultur–Nr.	Ausgangs- konzentration (KBE/ml)	Konzentration nach 24 Stunden (KBE/ml)	Konzentration nach 48 Stunden (KBE/ml)
1	$4,6 \times 10^8$	$4,5 \times 10^8$	$4,4 \times 10^8$
2	$4,1 \times 10^8$	$4,8 \times 10^8$	$3,7 \times 10^8$
3	$1,8 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
4	$1,6 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$

KBE: Kolonie bildende Einheiten

4.1.2 Filtrierung von HL-60 Zellen und Bakteriensuspension

Um die Phagozytose von lebenden Bakterien durch HL-60 Zellen bestimmen zu können, muß ein Filtermaterial gefunden werden, dass zuverlässig alle HL-60 Zellen zurückhält aber andererseits für die Bakterien vollkommen permeabel ist.

Bei der *Bakterienfiltration* (Tabellen 6 und 7) zeigte sich, daß sowohl *E. coli* O7:K1, als auch *E. coli* O111:B4 durch den verwendeten 5 µm Porenfilter nicht zurückgehalten werden. Zwischen Bakterienausgangs- und Bakterienendkonzentrationen ergaben sich bei allen drei Versuchsansätzen/-tage mit unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen keine statistischen Signifikanzen.

Anders verhielt es sich mit dem 1,2 µm Porenfilter. Dieser Filter hatte eine durchschnittliche Bakteriendurchlaßrate von 54% für E. coli O7:K1.

Tabelle 6: Ausgangs- und Endkonzentration von E.coli O7:K1 und O111:B4 bei Filtration durch einen 1,2- und 5 µm Porenfilter

E. coli Spezies	Porengröße der Filtermembran (µm)	n=	Bakterienausgangskonzentration ±SA (KBE/ml)	Bakterienendkonzentration ±SA (KBE/ml)	Statistische Signifikanz (Wilcoxon-Test)
K1:07	1,2	5	$4,6 \times 10^5$ ±0	$2,5 \times 10^5$ ± $4,92 \times 10^4$	p=0,043
K1:07	5	5	$1,2 \times 10^6$ ± $6,7 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$ ± $8,5 \times 10^5$	P=0,345
K1:07	5	23	$4,3 \times 10^8$ ± $2,5 \times 10^8$	$4,2 \times 10^8$ ± $2,5 \times 10^8$	p=0,913
O111:B4	5	7	$5,4 \times 10^8$ ± $3,4 \times 10^8$	$6,2 \times 10^8$ ± $3,6 \times 10^8$	p=0,398

KBE: Kolonie bildende Einheiten; SA: Standardabweichung

Tabelle 7: Bakteriendurchlaßrate (in %) von E.coli O7:K1 und O111:B4 unterschiedlicher Konzentrationen filtriert durch einen 1,2- und 5 µm Porenfilter

E. coli Spezies	Porengröße der Filtermembran (µm)	Bakterienausgangskonzentration ±SA (KBE/ml)	n= / Versuchstage=	Durchschnittliche Bakteriendurchlaßrate (%)	Bakteriendurchlaßrate (Minimum – Maximum) (%)
K1:07	1,2	$4,6 \times 10^5$ ±0	5 / 1	53,9	53,9 – 53,9
K1:07	5	$1,2 \times 10^6$ ± $6,7 \times 10^5$	5 / 5	80,1	31,1 – 118,6
K1:07	5	$4,3 \times 10^8$ ± $2,5 \times 10^8$	23 / 19	102,7	76,3 – 147,4
O111:B4	5	$5,4 \times 10^8$ ± $3,4 \times 10^8$	7 / 2	111,9	111,6 – 112,1

KBE: Kolonie bildende Einheiten; SA: Standardabweichung

Die Ergebnisse der *Zellfiltration* (Tabelle 8) zeigen, dass sowohl undifferenzierte, als auch differenzierte HL-60 Zellen zuverlässig (100%) durch den 1,2- und 5 µm Porenfilter zurückgehalten werden.

Dagegen hat der 8 µm Porenfilter eine durchschnittliche Filterrückhaltungsrate von nur 75 % bei undifferenzierten HL-60 Zellen.

Tabelle 8: Ausgangs- und Endkonzentration und Filterrückhaltungsrate (in %) von HL-60 Zellen unterschiedlicher Konzentrationen filtriert durch einen 1,2-, 5-, 8 µm Porenfilter

Undifferenzierte/ Differenzierte Zellen	Zellzahl (/ml)	n =	Porengröße der Filter- membran (µm)	Zellenend- konzentration (/ml) ± SA (Minimum Maximum)	Statistische Signifikanz (Wilcoxon-Test)	Durch- schnittliche Filterrück- haltungsrate (%)
Undifferenzierte HL 60	$0,9 \times 10^6$	6	8	$0,22 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^5$ ($0,1 \times 10^6 - 0,3 \times 10^6$)	p=0,026	75,4
Undifferenzierte HL 60	$0,9 \times 10^6$	6	1,2	0 (0 - 0)	nicht bestimmt	100
Undifferenzierte HL 60	$0,9 \times 10^6$	6	5	0 (0 - 0)	nicht bestimmt	100
Undifferenzierte HL 60	1×10^8	5	5	0 (0 - 0)	nicht bestimmt	100
Differenzierte HL 60	7×10^6	4	5	0 (0 - 0)	nicht bestimmt	100

SA: Standardabweichung

Für die weiteren Versuche wurde daher eine Filtration mit dem 5 µm Filter verwendet, wenn eine Abtrennung von HL-60 Zellen (Rückhaltung) und Bakterien (Durchfiltration) erreicht werden sollte.

4.1.3 Bestimmung der quantitativen Phagozytoseleistung der HL-60 im standardisierten Phagozytoseexperiment

Um einen Anhalt darüber zu erhalten, ob die HL-60 Zellen geeignet sind für den Einsatz in einem Phagozytosebioreaktor wurde ihre quantitative Phagozytoserate von lebenden Bakterien (E. coli) bestimmt. Die Kontaktzeit der Bakterien mit den HL-60 Zellen und der Versuchsaufbau müssen weitestgehend den späteren Bedingungen in einem komplexeren Bioreaktor in einem Plasmaperfusionsmodell entsprechen.

Bei allen gewählten Zell- und Bakterienkonzentrationen wurde eine statistisch signifikante Abreicherung der lebenden Bakterien im standardisierten

Phagozytoseexperiment erreicht (Tabellen 9 und 10). Auch die undifferenzierten HL-60 Zellen haben eine durchschnittliche Phagozytoserate (Verhältnis der Endkonzentration der Bakterien zur Ausgangskonzentration für jeden Versuchansatz/-tag in %) von 45 bzw. 54,7% gezeigt. Bei drei von 11 Versuchen reicherten die undifferenzierten HL-60 aber keine Bakterien ab. Anders verhielt es sich bei den differenzierten Zellen, die bei jedem Versuch zu einer deutlichen Bakterienabreicherung führten. Die zuverlässigste Reduktion der Bakterien wurde mit 1×10^7 differenzierten Zellen und einer durchschnittlichen Bakterienkonzentration von $7,0 \times 10^8 \pm 2,4 \times 10^8$ KBE/ml E. coli erreicht. Während der insgesamt 32 Einzelansätzen (an neun Versuchstagen) wurde eine durchschnittliche Phagozytoserate von 78,9 % erreicht. Das Phagozytoserate-Minimum lag bei 52,0 % und ist damit das höchste Minimum von allen fünf Versuchsansätzen. Die Bakterienabreicherung zeigte sich bei diesem Versuchsansatz mit einem $p < 0,001$ als höchst signifikant.

Tabelle 9: Bakterienabreicherung (E.coli O7:K1) im standardisiertem Phagozytoseexperiment durch HL-60 Zellen bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten mit unterschiedlichen Zell- und Bakterienkonzentrationen

Differenzierte/ Undifferenzierte Zellen	Zellzahl (/ml)	n=	Bakterienaus- gangs- konzentration $\pm$ SA (KBE/ml)	Bakterienend- konzentration $\pm$ SA (KBE/ml)	Statistische Signifikanz (Wilcoxon-Test)
Undifferenzierte HL 60	1×10^6	7	$1,4 \times 10^6$ $\pm 5,8 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5$ $\pm 6,0 \times 10^5$	$p < 0,05$
Undifferenzierte HL 60	1×10^7	14	$6,0 \times 10^8$ $\pm 3,1 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$ $\pm 1,3 \times 10^8$	$p < 0,01$
Differenzierte HL 60	1×10^6	16	$1,5 \times 10^6$ $\pm 5,5 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$ $\pm 2,5 \times 10^5$	$p < 0,001$
Differenzierte HL 60	1×10^6	8	$4,5 \times 10^8$ $\pm 3,0 \times 10^8$	$8,7 \times 10^7$ $\pm 1,0 \times 10^8$	$p = 0,05$
Differenzierte HL 60	1×10^7	32	$7,0 \times 10^8$ $\pm 2,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$ $\pm 9,9 \times 10^7$	$p < 0,001$

KBE: Kolonie bildende Einheiten; SA: Standardabweichung

Tabelle 10: Phagozytoseraten von E.coli O7:K1 im standardisiertem Phagozytoseexperiment durch HL-60 Zellen bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten mit unterschiedlichen Zell- und Bakterienkonzentrationen

Differenzierte/ Undifferenzierte Zellen	Zellzahl (/ml)	Bakterienaus- gangs- konzentration $\pm$ SA (KBE/ml)	n= / Versuchs- tage=	Durchschnittliche Phagozytoserate (%) / Versuche mit Phagozytoserate=0%	Phagozytoserate (Minimum Maximum) (%)
Undifferenzierte HL 60	1×10^6	$1,4 \times 10^6$ $\pm 5,8 \times 10^5$	7 / 4	45,0 / 1	0 – 99,5
Undifferenzierte HL 60	1×10^7	$6,0 \times 10^8$ $\pm 3,1 \times 10^8$	14 / 7	54,7 / 2	0 – 93,3
Differenzierte HL 60	1×10^6	$1,5 \times 10^6$ $\pm 5,5 \times 10^5$	16 / 4	70,6 / 0	39,7 – 99,9
Differenzierte HL 60	1×10^6	$4,5 \times 10^8$ $\pm 3,0 \times 10^8$	8 / 2	67,3 / 0	46,9 – 87,7
Differenzierte HL 60	1×10^7	$7,0 \times 10^8$ $\pm 2,4 \times 10^8$	32 / 9	78,9 / 0	52,0 – 95,0

KBE: Kolonie bildende Einheiten; SA: Standardabweichung

4.1.4 Freisetzung von TNF-alpha, IL-6 und IL-1 beta durch HL-60 Zellen im standardisierten Phagozytoseexperiment

Von den HL 60 Zellen ist bekannt, dass sie Zytokine, insbesondere TNF alpha, IL 1 beta, IL 6, IL 8, IL-10 und INF gamma freisetzen können (47, 74). Interessant sind vor allem die von Mikrophagen und Makrophagen freigesetzten proinflammatorischen Zytokine IL-1 beta, IL-6 und TNF-alpha, da die Kontaktzeit von nur 20 Minuten gewählt wurde und die spätere Anwendung in einem Plasmaperfusionsmodell über vier bis maximal acht Stunden erfolgen würde.

Die **IL-6** Werte waren bei allen vier Versuchsansätzen unter der Nachweisgrenze. Nur die undifferenzierten HL-60 Zellen ohne Bakterienkontakt zeigten eine geringe Freisetzung von **TNF-alpha** nach 20 Minuten Inkubationszeit. Dagegen wurde eine **IL-1 beta** Freisetzung bei allen vier Versuchsansätzen nachgewiesen. Nach einer 20-minütigen Inkubationszeit zeigten die differenzierten HL-60 Zellen mit Bakterienkontakt die höchste Freisetzung von IL-1 beta. Die undifferenzierten und differenzierten Zellen ohne Bakterienkontakt setzten wesentlich weniger IL-1 beta frei. Die niedrigsten IL-1 beta Werte hatten die undifferenzierten HL-60 Zellen mit Bakterienkontakt (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Freisetzung von IL-1 β , TNF- α und IL-6 von HL-60 Zellen mit und ohne Bakterienkontakt bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten. Werte unter der Nachweisgrenze wurden als 0 gewertet.

Zytokine	Differenzierte HL-60 + E. coli (n=8) (pg/ml)	Undifferenzierte HL-60 + E. coli (n=6) (pg/ml)	Differenzierte HL-60 ohne E. coli (n=6) (pg/ml)	Undifferenzierte HL-60 ohne E. coli (n=6) (pg/ml)
IL-1 β *	197,4 $\pm$ 83,7	22,0 $\pm$ 35,6	135,3 $\pm$ 24,5	141,2 $\pm$ 31,5
IL-6 *	0	0	0	0
TNF- α *	0	0	0	22,2 $\pm$ 35,0

* alle Angaben als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung

4.1.5 Nachweis der Phagozytose lebender Bakterien (E. coli) mittels der Elektronenmikroskopie

Ziel dieser Untersuchungen war es, die Phagozytose von lebenden Bakterien durch die HL-60 Zellen elektronenmikroskopisch nachzuweisen.

Abb. 6 zeigt E. coli O7:K1 als stäbchenförmiges Bakterium in einer rasterelektronenmikroskopischen (REM) Aufnahme. Die bildmorphologisch charakteristische Doppelmembran von E. coli Bakterien ist in Abb. 7 als transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme gut zu erkennen. Eine undifferenzierte HL-60 Zelle ist in der Abb. 8 (REM) zu sehen. Im Vergleich dazu ist eine differenzierte HL-60 Zelle in Abb. 10 (REM) dargestellt. Bildmorphologisch unterscheiden sich die beiden Aufnahmen nicht. Es ist eine kugelförmige Zelle mit ihren Fortsätzen zu erkennen. Anders verhält es sich bei der vergleichenden Darstellung mittels der TEM zwischen undifferenzierter und differenzierter Zelle (Abb. 9 und 11): Die differenzierte Zelle besitzt im Vergleich zur undifferenzierten Zelle mehr Mitochondrien, Vakuolen und Granula.

In den Abb. 12 bis 14 werden stimulierte HL-60 Zellen mit E.coli O7:K1 nach einer Kontaktzeit von 5, 15 und 45 Minuten gezeigt. Deutlich ist die Adhäsion der Bakterien an den HL-60 Zellen in diesen Bildern zu erkennen. In Abb. 14 ist gut die Ausbildung von Pseudopodien zu sehen.

Abb. 15 und 16 sind transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von differenzierten HL-60 Zelle, die für 5 bzw. 15 Minuten mit E. coli O7:K1 versetzt wurden. Nach 5 Minuten konnte die Adhäsion eines Bakteriums an die HL-60 Zelle

beobachtet werden (Abb. 15), nach 15 Minuten die Aufnahme des Bakteriums in die Zelle (Bildung eines Phagosomes, Abb. 16).

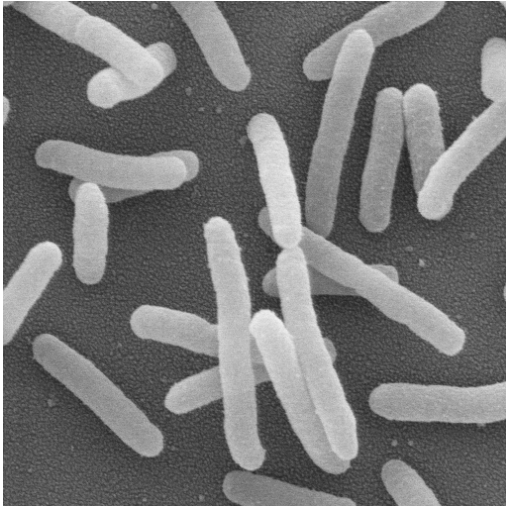


Abb. 6: E.coli O7:K1, REM, Vergrößerung: 10500x

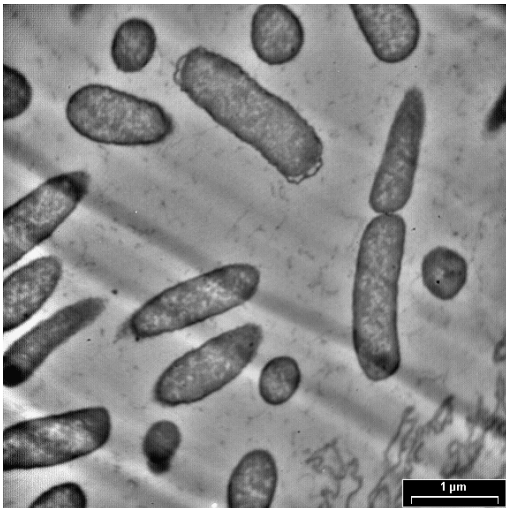


Abb. 7: E.coli O7:K1, TEM, Vergrößerung: 11000x

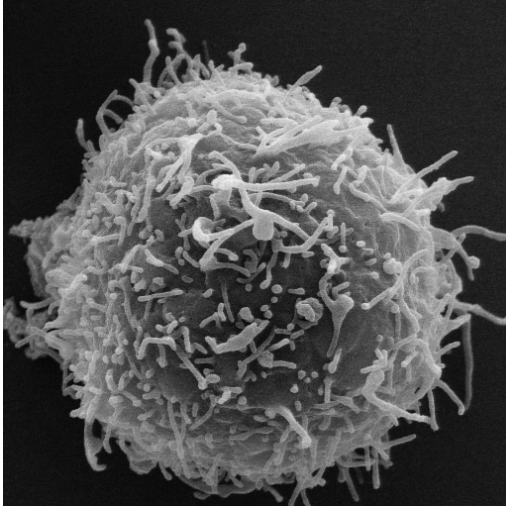


Abb. 8: Undifferenzierte HL-60 Zelle, REM, Vergrößerung: 8750x

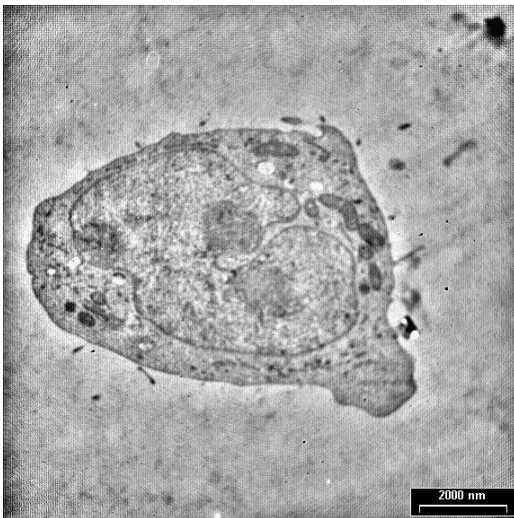


Abb. 9: Undifferenzierte HL-60 Zelle, TEM, Vergrößerung: 10100x

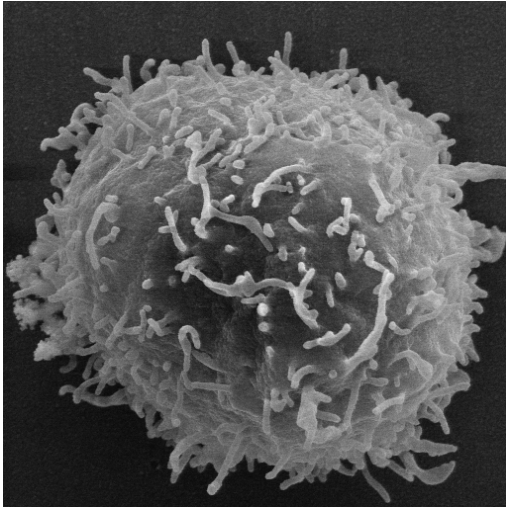


Abb. 10: Differenzierte HL-60 Zelle, REM, Vergrößerung: 11000x

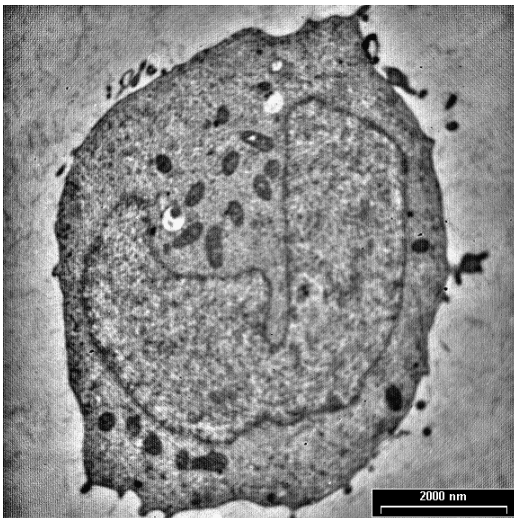


Abb. 11: Differenzierte HL-60 Zelle, TEM, Vergrößerung: 10600x

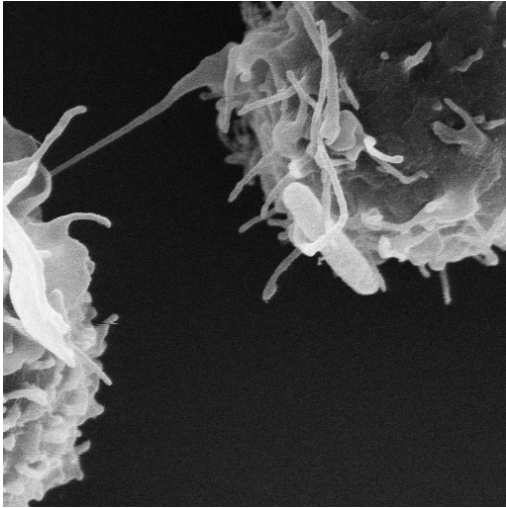


Abb. 12: Adhäsion von E.coli O7:K1 an differenzierte HL-60 Zellen - Kontaktzeit: 5 Min., REM, Vergrößerung: 9500x

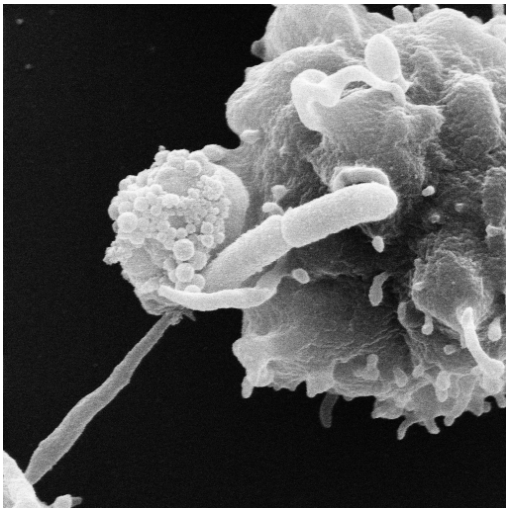


Abb. 13: Adhäsion von E.coli O7:K1 an differenzierte HL-60 Zelle - Kontaktzeit: 15 Min., REM, Vergrößerung: 11000x

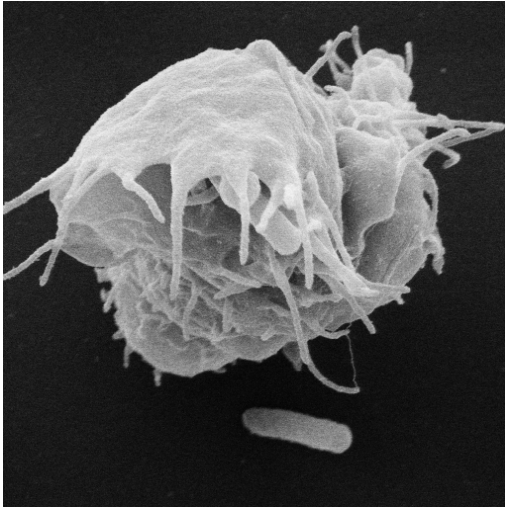


Abb. 14: Adhäsion von E.coli O7:K1 an differenzierte HL-60 Zelle, Ausbildung von Pseudopodien - Kontaktzeit: 45 Min., REM, Vergrößerung: 9500x

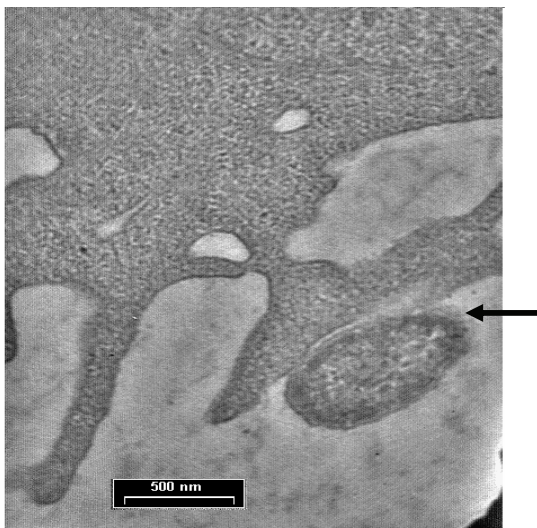


Abb. 15: Adhäsion von E.coli O7:K1 (Pfeil) an differenzierte HL-60 Zelle - Kontaktzeit: 5 Min., TEM, Vergrößerung: 36660x

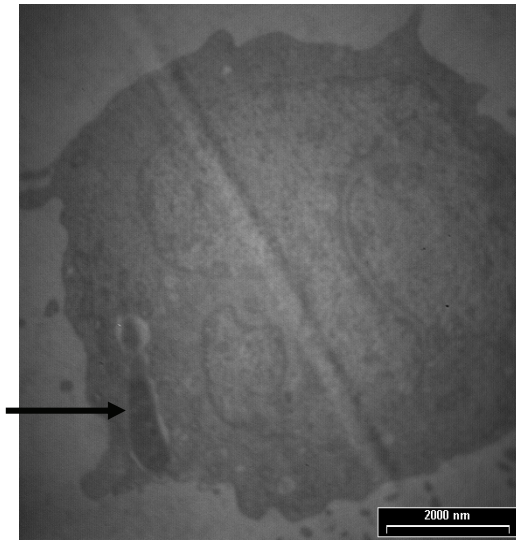


Abb. 16: Phagosombildung mit E.coli O7:K1 (Pfeil) durch differenzierte HL-60 Zelle - Kontaktzeit: 15 Min., TEM, Vergrößerung: 11110x

4.2 Nager–Tier-Modell der Gram–negativen Sepsis

Das Tierexperiment bestand aus einem Hauptexperiment und einem Vorexperiment
Verträglichkeit.

4.2.1 Vorexperiment Verträglichkeit

In diesem Vorexperiment sollte die Veränderung klinischer Parameter bei den Versuchstieren durch die alleinigen Gaben von humanem EDTA Plasma und HL 60 Medium RPMI 1640 untersucht werden. Beide Substanzen werden bei dem Hauptexperiment, gemeinsam mit den Bakterien verabreicht.

a) Überleben

Alle 12 Ratten überlebten die Beobachtungszeit von 168 Stunden.

b) Endblutbild

Das Endblutbild ergab keine markanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 12) und keine Auslenkungen in den pathologischen Bereich, mit Ausnahme eines Falles von Thrombozytopenie in der Unbehandelten-Gruppe (UG) und eines Falles von Thrombozytose in der Kontroll-Gruppe (KG). Bei allen Parametern zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Tabelle 12: Endblutbild – Ratten–Sepsis-Modell (Vorversuch)

	Normalwert (vergl. 7.2)	Kontroll- gruppe (n=4)	Behandelte Gruppe (n=4)	Unbehandelte Gruppe (n=4)
Erythrozyten (in $10^3/\mu\text{l}$)	5,43-7,59	6,41 $\pm 0,13$	6,28 $\pm 0,27$	6,08 $\pm 0,32$
Hämoglobin (in mmol/l)	7,1-10	8,4 $\pm 0,2$	8,1 $\pm 0,4$	7,8 $\pm 0,4$
Hämatokrit	0,335-0,455	0,396 $\pm 0,012$	0,371 $\pm 0,017$	0,379 $\pm 0,024$
MCH (in fmol)	1,22-1,41	1,32 $\pm 0,03$	1,31 $\pm 0,02$	1,30 $\pm 0,04$
Leukozyten (in $10^3/\mu\text{l}$)	2,1-15,4	8,2 $\pm 3,3$	7,0 $\pm 2,0$	8,0 $\pm 2,2$
Thrombozyten (in $10^3/\mu\text{l}$)	697-1349	999 ± 304	991 ± 162	1047 ± 234
* Neutrophile Granulozyten insgesamt in %	3-21	10 ± 3	11 ± 6	8 ± 3
* Segmenkernige Granulozyten in %	2-17	8 ± 3	10 ± 5	7 ± 3
* Stabkernige Granulozyten in %	0-6	1,0 $\pm 1,0$	1,0 $\pm 0,8$	1,0 $\pm 0,8$
* Lymphozyten in %	77-96	88 ± 3	87 ± 6	90 ± 3
* Monozyten in %	0-3	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
* Eosinophile Granulozyten in %	0-2	1 ± 0	1,0 $\pm 0,5$	1 ± 0
* Basophile Granulozyten in %	0-1	0 ± 0	0 $\pm 0,5$	0 $\pm 0,5$

Keine statistisch signifikanten Unterschiede bei allen Parametern zwischen den Versuchsgruppen.

*: im Differentialblutbild, SA: Standardabweichung; alle Angaben als Median $\pm$ SA

c) Körpergewichtsverlauf, Ausgangs- und Endgewicht

Die Ausgangsgewichte der drei Versuchsgruppen lagen zwischen 206 und 212 g (siehe Werteanhang, Punkt 7.1). Alle Tiere zeigten eine Gewichtszunahme im Verlauf der Beobachtungszeit (siehe Punkt 7.1). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den

Versuchsgruppen lagen beim Parameter Gewichtsverlauf und auch beim Parameter Endgewicht zu keinem Zeitpunkt vor.

d) Körpertemperatur

Die Ausgangswerte, die Verlaufs- und der Endwerte (nach 168 Stunden) unterschieden sich nicht statistisch signifikant zwischen den drei Versuchsgruppen (siehe Werteanhang, Punkt 7.1).

e) Herzfrequenz

Bei den Ausgangswerten (zwischen 229 und 231 /Min.), im Verlauf und bei den Endwerte hatten alle drei Versuchsgruppen höhere Werte als die Gruppen im Hauptexperiment. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden zu keinem Zeitpunkt. Im Verlauf zeigte die UG meist höhere Werte als die beiden anderen Versuchsgruppen. Auch beim Endwert (nach 168 Stunden) hatte die UG den höchsten Median mit 273 ± 32 /Min. (BG: 231 ± 11 /Min., KG: 213 ± 45 /Min.).

f) Blutgasanalysen

Bei den Parametern der Blutgasanalyse (pH Werte, Basenabweichung, Standardbikarbonat Werte, $p\text{CO}_2$ Kohlendioxidpartialdruck, $p\text{O}_2$ -Sauerstoffpartialdruck, SpO_2 - Sauerstoffsättigung) ergaben sich zu keinem Zeitpunkt des Experimentes signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

4.2.2 Sepsis – Tier – Modell

Im Hauptexperiment des Tiermodells erfolgte eine ex-vivo Phagozytoseunterstützung in einem geeigneten Sepsismodell.

a) Überleben

Bei einer Beobachtungszeit von 168 Stunden starben alle Tiere der UG bis zum Tag vier (n = 8). In der BG überlebten sechs von acht Tieren und in der KG acht von neun Tieren. Ein Tier der KG starb am Tag fünf an einer Lungenembolie. Die mittlere Überlebenszeit betrug in der UG 42 Stunden, in der BG 151,9 Stunden und in der KG 161,3 Stunden. Statistische Signifikanz war zwischen BG und UG und zwischen KG und UG nachweisbar. Als nicht statistisch signifikant erwies sich der Unterschied der Ratten Überlebenszeiten zwischen der KG und BG (Abb. 17).

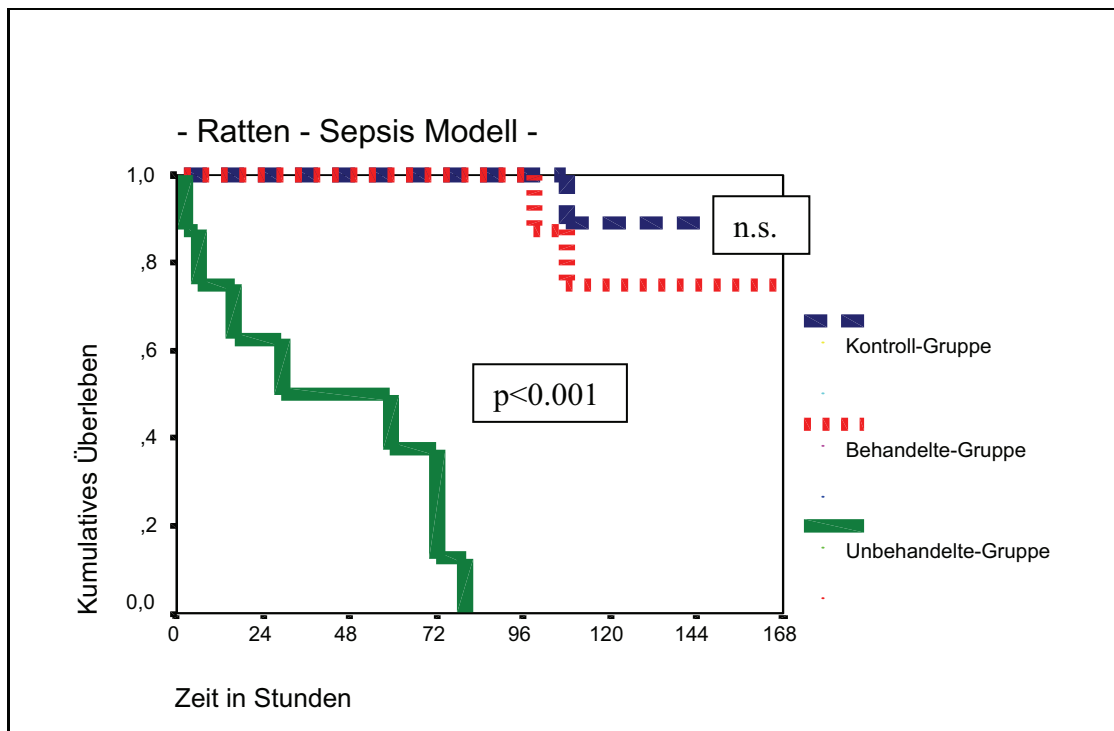


Abb. 17: Kumulatives Überleben im Ratten–Sepsis-Modell (Kaplan-Meier). Signifikanter Unterschied zwischen UG (n=8) und BG (n=8), auch zwischen UG und KG (n=9) ($p < 0,001$), aber kein signifikanter Unterschied zwischen BG und KG (n=9) ($p = 0,44$).

b) Bakterienzahl im Blut nach 24 Stunden

Die Bakterienzahl im Blut nach 24 Stunden war in der UG signifikant höher als in der BG (Abb. 18). In der KG wurden keine Bakterien nachgewiesen.

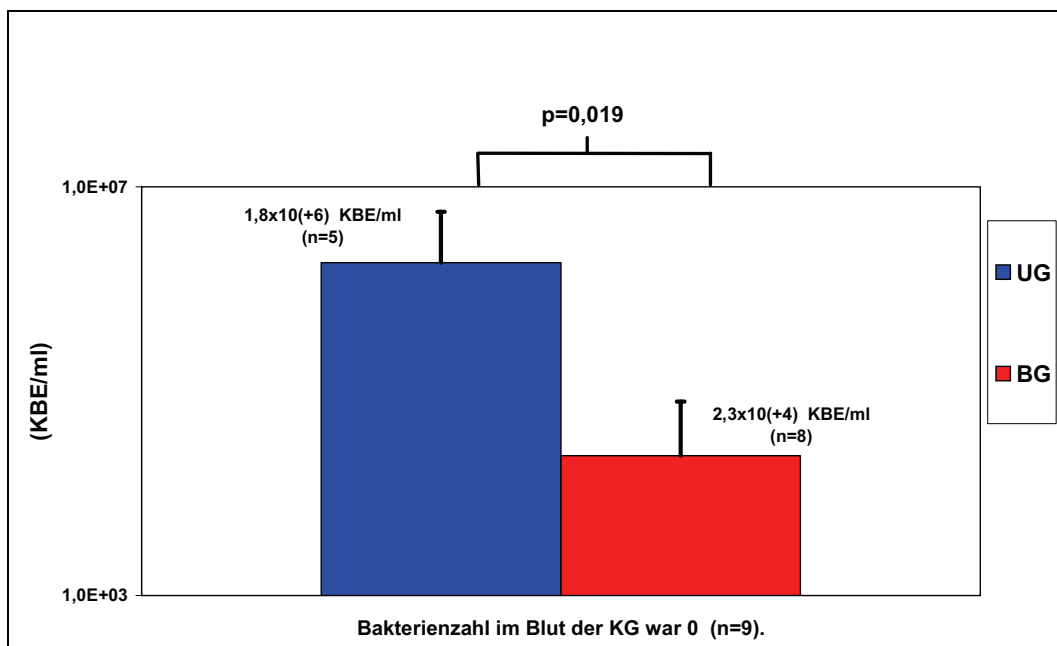


Abb. 18: Bakterienzahl im Blut nach 24 Stunden im Ratten–Sepsis-Modell. Signifikanter Unterschied zwischen UG (n=5) und BG (n=8) ($p < 0,019$).

c) Körpergewichtsverlauf, Ausgangs- und Endgewicht

Die Ausgangsgewichte der Tiere in den drei Versuchsgruppen unterschieden sich nicht signifikant. Anders verhielt es sich mit den Endgewichten und der mittleren Differenz der Ausgangs- und Endgewichte der einzelnen Gruppen (Abb. 19, Tab. 13). Beide Parameter zeigten signifikant schlechtere Werte der UG im Vergleich mit den beiden anderen Gruppen.

Gewichtsverlust konnte man bei allen Tieren der UG und einem Tier der BG verzeichnen. Alle anderen Ratten nahmen während der Beobachtungszeit an Gewicht zu. Statistisch signifikante Unterschiede gab es zwischen allen drei Gruppen in Bezug auf Symptom Gewichtsverlust bzw. Gewichtszunahme (Tabelle 13).

Tabelle 13: Gewichtsverlauf, Ausgangs- und Endgewicht im Ratten–Sepsis-Modell

	Kontroll-Gruppe (KG, n 9)	Behandelte-Gruppe (BG, n 8)	Unbehandelte-Gruppe (UG, n 8)
Körpergewicht (Anzahl der Tiere/Gesamtanzahl:) °	angestiegen (9/9) abgefallen (0/9)	angestiegen (7/8) abgefallen (1/8)	abgefallen (8/8) angestiegen (0/8)
*Ausgangsgewicht (in g) ^	210,0 ± 10,8	217,3 ± 10,7	221,4 ± 19,5
*Endgewicht (in g) +	255,8 ± 28,9	244,0 ± 26,7	213,5 ± 21,3

° - Statistisch signifikante Unterschiede zwischen allen drei Gruppen in Bezug auf Symptom Gewichtsverlust, als auch Gewichtszunahme ($p < 0,001$).

^ - Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

+ - Statistisch signifikante Unterschiede zwischen UG und BG ($p = 0,015$) und zwischen UG und KG ($p = 0,006$), keine Signifikanz zwischen BG und KG.

* - alle Angaben als Mittelwert $\pm$ SA

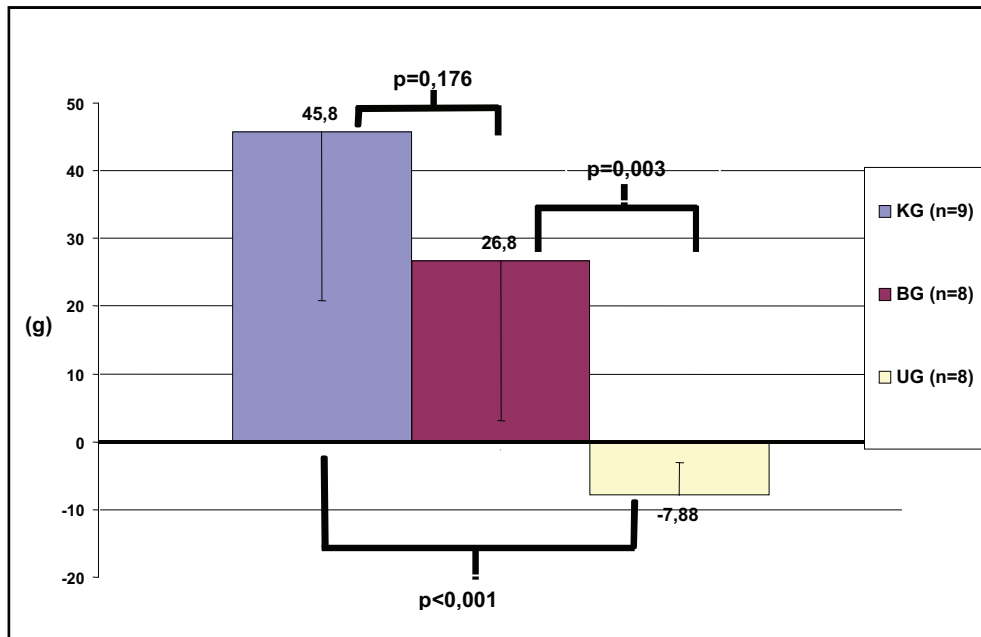


Abb. 19: Mittlere Gruppendifferenz zwischen Ausgangs- und Endgewicht im Ratten-Sepsis-Modell. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen UG und BG ($p=0,003$), zwischen UG und KG ($p<0,001$), keine Signifikanz zwischen BG und KG ($p=0,17$).

d) Ausgangs- und Endblutbild

Im Ausgangsblutbild (Tab. 14, 15) kann man erkennen, dass es keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen gab. Die signifikanten Unterschiede bei Hämoglobin, Hämatokrit und Thrombozyten zwischen der KG und BG blieben jeweils im Normbereich der Einzelparameter.

Beim Vergleich der Anzahl der Tiere pro Gruppe mit bestimmten Blutbildveränderungen außerhalb des Normbereiches (Tab. 15) fielen in jeder Gruppe ein bis vier Fälle mit Neutrophilie, mit Erhöhung der segmentkernigen und stabkernigen Granulozyten, mit MCH-Erhöhung und Lymphopenie auf.

Tabelle 14: Ausgangsblutbild – Ratten–Sepsis-Modell

	Normalwert (vergl. 7.2)	Kontroll Gruppe (n=9)	Behandelte Gruppe (n=8)	Unbehandelte Gruppe (n=8)
Erythrozyten (in 10 ³ /μl)	5,43-7,59	6,40 ±0,47	7,01 ±0,36	6,69 ±0,76
+ Hämoglobin (in mmol/l)	7,1-10	8,4 ±0,6	9,2 ±0,5	8,9 ±0,8
# Hämatokrit	0,335-0,455	0,384 ±0,024	0,419 ±0,019	0,406 ±0,041
MCH (in fmol)	1,22-1,41	1,32 ±0,04	1,32 ±0,05	1,34 ±0,06
Leukozyten (in 10 ³ /μl)	2,1-15,4	9,3 ±3,1	9,4 ±3,3	12,1 ±3,0
° Thrombozyten (in 10 ³ /μl)	697-1349	939 ±88	1085 ±67	1003 ±159
* Neutrophile Granulozyten in %	3-21	20 ±14	18 ±15	26 ± 17
* Segmentkernige Granulozyten in %	2-17	14 ±7	11 ±6	10 ±7
* Stabkernige Granulozyten in %	0-6	5,9 ±7,5	7,4 ±11,5	15,6 ±18,6
* Lymphozyten in %	77-96	79 ±14	80 ±16	72 ±17
* Monozyten in %	0-3	1,2 ±0,8	1,1 ±0,8	2 ±0,9
* Eosinophile Granulozyten in %	0-2	0,6 ±0,5	0,6 ±0,7	0,3 ±0,5
* Basophile Granulozyten in %	0-1	0	0,1 ±0,4	0

° - Signifikante Unterschiede zwischen BG und KG (p=0,003).

+ - Signifikante Unterschiede zwischen BG und KG (p=0,011).

- Signifikante Unterschiede zwischen BG und KG (p=0,006).

*: im Differentialblutbild

SA: Standardabweichung; MW: Mittelwert; alle Angaben als Mittelwert ± SA

Tabelle 15: Ausgangsblutbild - Ratten-Sepsis-Modell: pathologische Befunde

Veränderung	Kontrollgruppe (n=9) Anzahl der Tiere	Behandelte Gruppe (n=8) Anzahl der Tiere	Unbehandelte Gruppe (n=8) Anzahl der Tiere	Pearson Chi-Quadrat Signifikanz
Normochrome Anämie	0	0	1	n.s.
MCH erhöht	0	1	1	n.s.
Leukozytose	0	0	1	n.s.
* Neutrophilie	3	2	3	n.s.
* Segmentkernige Granulozyten erhöht	3	2	1	n.s.
* Stabkernige Granulozyten erhöht	3	2	4	n.s.
* Monozytose	0	0	1	n.s.
* Lymphopenie	3	2	3	n.s.

*: im Differentialblutbild; n.s.: nicht signifikant

Im Endblutbild (Tab. 16, 17) zeigte sich bei allen Tieren eine Anämie. Die Gesamtzahl der Thrombozyten zeigte sich nur in der UG erniedrigt, ebenfalls wies diese Gruppe die meisten Fälle von Thrombozytopenie (sieben von acht Tieren) auf im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen. Aber auch die KG hatte vier Fälle von Thrombozytopenie, die BG lediglich zwei. Im Differentialblutbild zeigte die UG die stärkste Tendenz zur Neutropenie, zur Erhöhung stabkerniger Granulozyten und zur Lymphopenie. Die BG ließ auch eine allerdings schwächere Auslenkung in diese Richtungen erkennen, die aber nicht so ausgeprägt war. Die Werte der KG waren nicht im oben genannten Sinne verändert. Nur in der UG kamen Fälle von Segmentkernigen-Erniedrigung vor. Je zwei Fälle von Monozytose konnte man in der BG und KG feststellen, aber kein Fall in der UG.

Tabelle 16: Endblutbild – Ratten–Sepsis-Modell

	Normalwert (vergl. 7.2)	Kontroll Gruppe (n=9)	Behandelte Gruppe (n=8)	Unbehandelte Gruppe (n=8)
Erythrozyten (in 10 ³ /μl)	5,43-7,59	4,46 ±0,79	4,41 ±0,96	4,24 ±1,79
Hämoglobin (in mmol/l)	7,1-10	5,8 ±1,0	5,5 ±1,1	5,5 ±2,2
Hämatokrit	0,335-0,455	0,271 ±0,047	0,255 ±0,052	0,253 ±0,103
MCH (in fmol)	1,22-1,41	1,29 ±0,06	1,26 ±0,05	1,31 ±0,05
Leukozyten (in 10 ³ /μl)	2,1-15,4	12,9 ±6,2	11,2 ±5,6	11,4 ±6,5
Thrombozyten (in 10 ³ /μl)	697-1349	711 ±449	818 ±562	374 ±283
*+ Neutrophile Granulozyten in %	3-21	11 ±3	31 ±18	42 ± 21
* Segmenkernige Granulozyten in %	2-17	8 ±2	8 ±6	6 ±9
*° Stabkernige Granulozyten in %	0-6	2,7 ±1,6	22,9 ±16,9	35,5 ±21,0
*# Lymphozyten in %	77-96	87 ±4	67 ±18	56 ±21
* Monozyten in %	0-3	1,9 ±1,6	2,5 ±1,9	2,1 ±1,0
* Eosinophile Granulozyten in %	0-2	0,6 ±0,7	0,3 ±0,5	0,3 ±0,5
* Basophile Granulozyten in %	0-1	0	0	0,1 ±0,3

° - Signifikante Unterschiede zwischen BG und KG (p=0,0371) und zwischen UG und KG (p=0,005).

+ - Signifikante Unterschiede zwischen UG und KG (p=0,0158).

- Signifikante Unterschiede zwischen UG und KG (p=0,0121).

*: im Differentialblutbild

SA: Standardabweichung; MW: Mittelwert; alle Angaben als Mittelwert ± SA

Tabelle 17: Endblutbild - Ratten-Sepsis-Modell: pathologische Befunde

Veränderung:	Kontrollgruppe (n=9) Anzahl der Tiere	Behandelte Gruppe (n=8) Anzahl der Tiere	Unbehandelte Gruppe (n=8) Anzahl der Tiere	Pearson Chi- Quadrat Signifikanz
Normochrome Anämie	8	7	7	n.s.
Hypochrome Anämie	1	1	0	n.s.
Leukozytose	2	2	1	n.s.
* Neutrozytose	0	6	6	0,002
* Segmentkernige Granulozyten erhöht	0	1	1	n.s.
* Segmentkernige Granulozyten erniedrigt	0	0	3	0,027
* Stabkernige Granulozyten	0	6	8	<0,001
* Monozytose	2	2	0	n.s.
* Lymphopenie	0	6	6	0,002
Thrombozytopenie	4	2	7	0,037
Thrombozytose	1	1	0	n.s.

*: im Differentialblutbild; n.s.: nicht signifikant

e) Endotoxinwerte

Endotoxin wurde nach zwei und 24 Stunden im Blut der Ratten bestimmt (Abb. 20). Die UG hatte im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen höhere und im Verlauf noch weiter ansteigende Werte. Die Endotoxinwerte der BG waren im Verlauf abfallend, die Werte der KG niedrig.

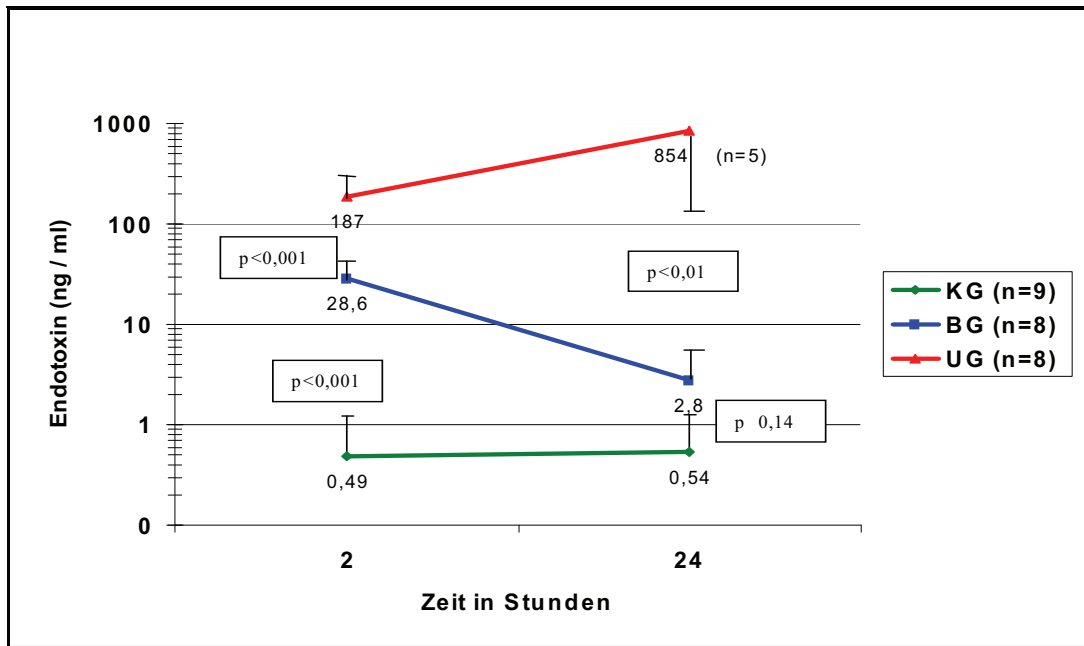


Abb. 20: Endotoxin-Werte im Blut nach zwei und 24 Stunden im Ratten-Sepsis-Modell.

Signifikante Unterschiede zwischen UG (n=8) und BG (n=8), zwischen UG und KG (n=9) und zwischen BG und KG nach zwei Stunden ($p<0,001$).

Nach 24 Stunden kein signifikanter Unterschied zwischen BG und KG ($p=0,14$), aber Signifikanz zwischen UG (n=5) und BG und zwischen UG und KG ($p<0,01$).

f) TNF alpha und IL -6 Werte

Die **IL-6** Werte im Blut nach sechs Stunden der Inokulation der lebenden Bakterien war bei allen drei Versuchsgruppen unter der Nachweisgrenze ($< 31\text{pg/ml}$).

TNF alpha wurde nach zwei, sechs und 24 Stunden im Blut der Ratten bestimmt (Abb.21). Nach zwei Stunden waren die Wert der UG ungefähr 35% höher als die der BG. Nach sechs Stunden konnte bei beiden Gruppen ein markanter Abfall der TNF-alpha Werte nachgewiesen werden. Während TNF-alpha nicht nach 24 Stunden bei der BG gefunden wurde, wurde bei der UG ca. 20% des Zwei Stunden Wertes gemessen. In der KG war kein TNF-alpha im Blut nachweisbar (Nachweisgrenze: $< 4\text{pg/ml}$).

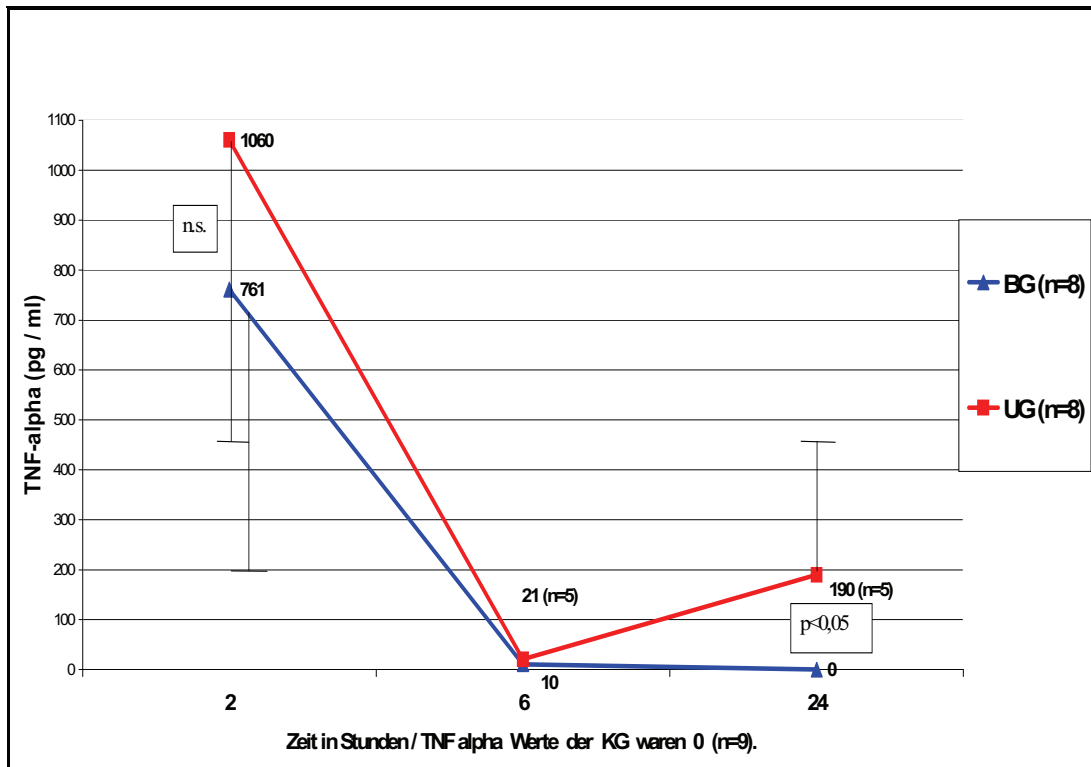


Abb. 21: TNF-alpha Werte im Blut nach zwei, sechs und 24 Stunden im Ratten-Sepsis-Modell.

Signifikante Unterschiede zwischen UG (n=5) und BG (n=8) und zwischen UG und KG (n=9) nach 24 Stunden ($p<0,05$). Nach 2 Stunden keine signifikanten Unterschiede zwischen BG und UG (n=8) ($p=0,21$), aber zwischen KG und BG und zwischen KG und UG ($p<0,001$). Keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen allen drei Gruppen nach sechs Stunden.

g) Körpertemperatur

Die Ausgangswerte der Ratten waren stets hypotherm, da sie kurz nach der Kathetereinlage in die A. carotis und Vena jugularis unter Äthernarkose gemessen wurden. Nach der Kathetereinlage wurden alle Tiere für eine Stunde mit Rotlicht erwärmt. Im Verlauf konnte man dann eine andauernde Hypothermie bei fast allen Tieren der UG bis zur zehnten Stunde feststellen. Sechs von acht Tieren der BG und acht von neun Tieren der KG waren nach bereits zwei Stunden wieder normotherm oder hypertherm und blieben in diesem Bereich auch bis zum Ende der Beobachtungszeit oder bis zum Todeseintritt. Anders verhielt es sich wiederum in der UG. Ab dem Zeitpunkt 60 Stunden (n 3) zeigte die Gruppe wesentlich niedrigere Werte als die beiden anderen Versuchsgruppen. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand zu keinem Zeitpunkt (siehe Werteanhang, Punkt 7.1).

h) Hämodynamische Parameter (MAB, Herzfrequenz)

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAB)

Bei den Ausgangswerten unterschieden sich die drei Versuchsgruppen nicht signifikant. Die BG hatte die niedrigsten Werte (Abb 22). Im Verlauf zeigte die UG aber einen niedrigeren MAB, als die beiden anderen Versuchsgruppen (Abb. 22). Die Werte nach 72 Stunden und die Endwerte sind zwischen der UG und BG und zwischen UG und KG statistisch signifikant.

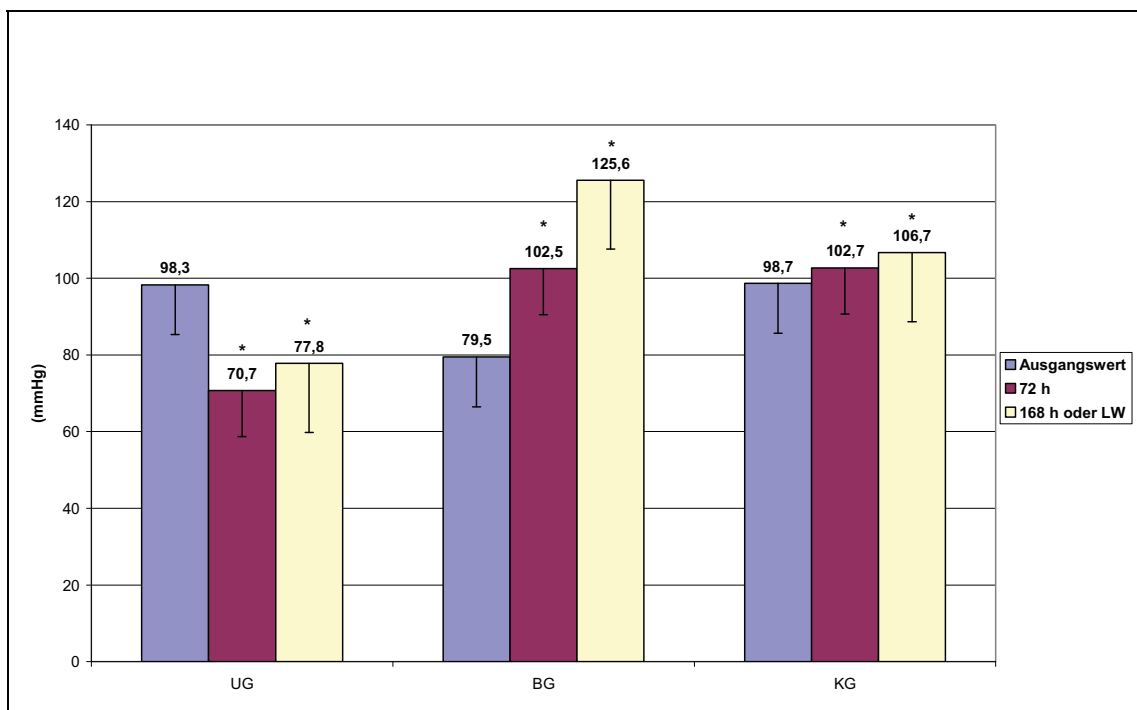


Abb. 22: Mittlere arterielle Blutdruckwerte: Ausgangswerte, nach 72 und nach 168 Stunden bzw. letzter Wert (LW) im Ratten-Sepsis-Modell.

*: Statistisch signifikante Unterschiede zwischen UG und BG und zwischen UG und KG, aber nicht zwischen KG und BG nach 72 und 168 Stunden bzw. LW ($p < 0,05$).

Herzfrequenz

Bei den Ausgangswerten hatte die KG mit 200 ± 13 /Min. den niedrigsten Wert (UG: 213 ± 50 /Min., BG: 212 ± 34 /Min.). Im Verlauf zeigte die UG eine niedrigere Herzfrequenz, als die beiden anderen Versuchsgruppen. Nach 24 Stunden hatte die UG (n 5) z.B. einen MW von 173 ± 4 /Min., die BG einen MW von 188 ± 13 /Min. und die KG einen MW von 187 ± 10 /Min. Die Werte nach 24 Stunden sind zwischen der UG und BG und UG und KG statistisch signifikant (UG-BG: $p = 0,045$, UG KG: $p = 0,012$,

BG KG: $p = 1,0$). Bei den Endwerten (nach 168h oder LW) hatte die UG die niedrigste Herzfrequenz mit 172 ± 15 /Min., die BG einen MW von 188 ± 14 /Min. und die KG eine mittlere Herzfrequenz von 189 ± 11 /Min. Bei den Endwerten liegen statistische Signifikanzen zwischen UG und BG und zwischen UG und KG vor (UG-BG $p = 0,021$; KG-BG $p = 0,673$; KG-UG $p = 0,011$).

i) Blutgasanalysen und Elektrolytbestimmungen

Die Ausgangswerte der Tiere wurden sofort nach der Kathetereinlage in die A. carotis und Vena jugularis unter Äthernarkose ohne Sauerstoffgabe und Beatmung arteriell abgenommen. Dadurch waren die Tiere etwas unterkühlt und die Ausgangswerte der Blutgasanalyse meist nicht im Normbereich. Besonders die BG zeigte auffällige Ausgangswerte.

pH–Werte

Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde nur bei den Ausgangswerten gesehen zwischen BG und UG ($p = 0,035$) und zwischen BG und KG ($p = 0,005$). Die BG zeigte eine Auslenkung in den sauren Bereich. Im Verlauf zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (siehe Werteanhang, Punkt 7.1).

Basenabweichung

Die Ausgangswerte liegen im Normbereich. Ein signifikanter Unterschied wurde nur bei den Ausgangswerten gesehen zwischen UG und KG ($p = 0,006$) und zwischen BG und KG ($p = 0,029$). Dabei zeigte nur die KG eine positive Basenabweichung. Im weiteren Verlauf gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen (siehe Werteanhang, Punkt 7.1).

Standardbikarbonat–Werte

Bei diesem Parameter gab es zu keinem Zeitpunkt der Messungen einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Sowohl bei den Ausgangswerten als auch bei den Endwerten (nach 168 Stunden oder LW) hatte nur die UG Werte unter 22 mmol/l, die beiden anderen Gruppen Werte über 23,8 mmol/l.

pCO₂

Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde nur beim Ausgangswert gesehen zwischen BG und UG ($p = 0,008$). Der pCO₂ der BG war über 7,5 kPa, die Werte der beiden anderen Versuchsgruppen lagen zwischen 4,4 und 5,4 kPa. Die Endwerte (nach 168 Stunden oder LW) aller drei Versuchsgruppen unterschied sich nicht signifikant (zwischen 4,5 und 5,0 kPa).

pO₂

Die BG hatte den niedrigsten pO₂ der Ausgangswerte ($11,06 \pm 5,52$ kPa), die beiden anderen Gruppen dagegen Werte über 12 kPa. Im Verlauf zeigte die BG jedoch meistens einen höheren pO₂. Nach 66 Stunden spiegelt sich dies auch durch einen statistisch signifikanten höheren pO₂ der BG im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen wieder (UG-BG $p = 0,012$; KG-BG $p = 0,016$; KG-UG $p = 0,63$). Bei den Endwerten (nach 168 Stunden oder LW) zeigte sich der höchste pO₂ bei der KG ($12,8 \pm 1,8$ kPa), den niedrigsten Wert bei der UG ($11,3 \pm 5,1$ kPa). Die BG lag im Mittelfeld mit $11,8 \pm 2,7$ kPa. Bei den Endwerten ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Sauerstoffsättigung

Zu keinem Messzeitpunkt gab es einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Ausgangswerte der BG waren am niedrigstem mit $85,5 \pm 17,2$ %. Die Werte der beiden anderen Gruppen lagen bei über 96 %. Bei den Endwerten (nach 168 Stunden oder LW) hatten die KG und BG Werte über 96%, die UG aber nur $86,6 \pm 19,5$ % Sauerstoffsättigung.

Natrium-Werte

Die Mittelwerte aller drei Versuchsgruppen zu allen Meßzeitpunkten unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander. Sie lagen stets im Normbereich.

Kalium-Werte

Sehr viele Tiere zeigten besonders bei den Ausgangswerten, aber auch im Verlauf, eine Hypokaliämie. Die Ausgangswerte waren mit $2,85 \pm 0,53$ mmol/l am niedrigsten in der UG. Die BG hatte einen Wert von $3,48 \pm 1,48$ mmol/l, die KG von $3,73 \pm 0,29$ mmol/l. Im Verlauf zeigte die UG meist höhere Werte, als die beiden anderen Versuchsgruppen. Dieser Trend bestätigte sich auch bei den Endwerten (nach 168 Stunden oder LW): $4,06 \pm 1,13$ mmol/l in der UG, $3,23 \pm 0,97$ mmol/l in der BG und $2,96 \pm 0,74$ mmol/l in der KG. Statistisch signifikante Unterschiede lagen zu allen Messzeitpunkten zwischen den Gruppen nicht vor.

Ionisierte Kalzium-Werte

Sehr viele Tiere hatten eine Hypokalziämie. Bei den Ausgangswerten lagen die UG und die BG bei $0,9 \pm 0,29$ mmol/l, die KG bei $1,12 \pm 0,14$ mmol/l. Im Verlauf hatte die UG meist höhere Werte (um 1,0 mmol/l), als die beiden anderen Versuchsgruppen. Nach 66 Stunden hatte die UG (n = 3) einen Wert von $1,23 \pm 0,11$ mmol/l, die BG einen Wert von $0,62 \pm 0,29$ mmol/l und die KG von $0,67 \pm 0,22$ mmol/l. Die Werte nach 66 Stunden sind zwischen der UG und BG und UG und KG statistisch signifikant (UG - BG: p 0,012, UG - KG: p 0,024, BG - KG: p 0,662). Bei den Endwerten (nach 168 oder LW) hatte die UG den höchsten Wert mit $1,09 \pm 0,20$ mmol/l, die BG einen Wert von $0,92 \pm 0,38$ mmol/l und die KG den niedrigsten Wert von $0,67 \pm 0,34$ mmol/l.

j) Histologie

Die Tabelle 18 zeigt die histopathologischen Untersuchungsbefunde an Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Pankreas von allen während des Experimentes verstorbenen oder nach der Beobachtungszeit von 168 Stunden eingeschlaferten Versuchstieren. In allen drei Testgruppen (KG, BG und UG) ließen sich teilweise erhebliche zirkulatorische, am ehesten schockassoziierte pathomorphologische Organveränderungen nachweisen (107-110), die in der Summe bei der KG und BG ausgeprägter waren als in der UG. Die Tabelle 19 unterstreicht dieses Ergebnis in einer semiquantitativen Subsummierung der Einzelbefunde eines jeden Versuchstieres aller drei Testgruppen mit Einteilung in insgesamt geringe, mäßig starke und stärkere histopathologische Organveränderungen

(Tabelle 19). Die wichtigsten histopathologischen Untersuchungsbefunde (Abb. 23-31) waren:

Lunge

Einzelne oder zahlreiche hyaline Mikrothromben als morphologisches Schockzeichen bei sieben Tieren aus der BG, sechs Tieren aus der KG und drei Tieren aus der UG (Abb. 30). Intraalveoläre Blutungen als Schockzeichen bei jeweils zwei Tieren jeder Testgruppe (Abb. 29).

Niere

Abszesse bei jeweils einem Tier aus der BG und UG. Anämische (septische) Rindeninfarkte als Schockzeichen bei jeweils fünf Tieren jeder Testgruppe (Abb. 27, 28). Venöse Thrombose bei jeweils zwei Tieren der KG und BG (Abb. 28).

Leber

Vermehrung Kupferscher Sternzellen als Zeichen immunologischer Stimulation bei sechs Tieren der BG, drei Tieren der UG und zwei Tieren der KG (Abb. 31). Zunahme mehrkerniger und polymorpher Zellformen als Zeichen der Regeneration bei allen acht Tieren der BG, sechs Tieren der UG und nur einem Tier aus der KG.

Milz

Ein vermehrtes Auftreten von Megakaryozyten in der roten Milzpulpa als morphologisches Stresskorrelat und Zeichen für immunologische Stimulation bei sechs Tieren der BG und jeweils drei Tieren der KG und UG (Abb. 24). Follikelhyperplasie mit Auftreten zahlreicher Sternhimmelmakrophagen als Zeichen immunologischer Stimulation/Streß bei sechs Tieren der BG, fünf Tieren der UG und drei Tieren der KG (Abb. 25). Infarkte bei je einem Tier der KG und BG (Abb. 23). Fälle von Follikelatrophie nur in der KG (drei Tiere). Mehrfache Sinushistiozytose als Zeichen für Stress/immunologische Stimulation bei vier Tieren der KG, drei Tieren der UG und 5 Tieren der BG (Abb. 26).

Tabelle 18: Histopathologische Untersuchungsbefunde; Ratten-Sepsis-Modell

Organ	Histologische Befunde	KG (n 8)	UG (n 8)	BG (n 8)
<u>Herz</u>	Akute Blutstauung	0	0	2
*	Hyaline Mikrothromben	0	0	1
*	Muskelfasernekrosen vereinzelt herdförmig	3 0	1 1	0 0
	Fibrose	1	0	1
	Muskelfaserhypertropie	1	2	1
	Leukostase	0	0	1
	Rundzellinfiltrate	0	0	2
<u>Pankreas</u>	Akute Blutstauung	0	0	1
	Azidophile Acinusschwellung gering ausgeprägt	5 1	6 0	6 1
*	Epithelnekrosen vereinzelt herdförmig	2 0	0 0	0 1
	Interstitielle eosinophile Granulozyteninfiltrate schütter massenhaft	2 0	0 0	0 1
<u>Lunge</u> +	Akute Blutstauung	8	7	7
*	Hyaline Thromben vereinzelt viele	6 0	3 0	6 1
*	Interstitielles Ödem	0	2	2
+	Herdförmige Dystelektase	7	5	7
	Leukostase	5	6	5
	Leukozyteninfiltrat	2	1	2
*	Intraalveoläre Blutung	2	2	2
<u>Niere</u>	Abszess	0	1	1
	Akute Blutstauung	8	6	8
	Hyaline Thromben	0	0	0
*	Anämische Rindeninfarkte	5	5	5
+	Schwellung der Tubulus Epithelien	8	8	8
*	Nekrose der Tubulus Epithelien	2	2	2
	Venöse Thrombose	2	0	2
*	Dilatierte Tubuli mit Epithelabflachung und Proteinanlagerung	2	2	4
	(nur) Proteinablagerung im Tubulus	3	1	2
	Leukostase	0	1	2
<u>Leber</u> +	Akute Blutstauung	8	7	6
	Portale Rundzellinfiltration	2	3	0
*	Hepatozyten mit mikrovesikulärer Leberepithelverfettung	7	4	7
*	Einzelzellnekrosen	5	3	4
*	Gruppenzellnekrosen	1	0	1
	Leukostase	0	0	1
°	Vermehrung der Kupferschen Sternzellen	2	3	6
°	Zunahme mehrkerniger Formen	1	4	5
°	Anisokaryose	0	2	3
<u>Milz</u>	Sinushyperämie	6	4	6
	Infarkt	1	0	1
	Sinusektasie	7	7	8
	Hämosiderophagen	0	1	0
	Follikelatrophie	3	0	0
°	Mehrkernige Riesenzellen nach Art der Mega karyocyten in der roten Pulpa vereinzelt viele	4 3	5 3	2 6
°	Sinushistiozytose vereinzelt mehrfach	4 4	5 3	3 5
°	Follikelhyperplasie mit wenigen Sternhimmelmakrophagen mit vielen Sternhimmelmakrophagen	3 3	3 5	2 6

+: Hinweis für Agonie

°: Hinweis für Stress und verstärkte immunologische Abwehr

*: Hinweis für Schock / Zirkulationsstörung

Tabelle 19: Gesamtstärke der Organveränderungen; Ratten-Sepsis-Modell

Stärke der Organ- veränderungen	Kontrollgruppe (n=8) Anzahl der Tiere	Unbehandelte – Gruppe (n=8) Anzahl der Tiere	Behandelte - Gruppe (n=8) Anzahl der Tiere
I	1	6	0
I-II	1	0	0
II	4	0	4
II-III	1	2	4
III	1	0	0

I - Geringe Organveränderungen

II - Mäßig starke Organveränderungen

III - Starke Organveränderungen

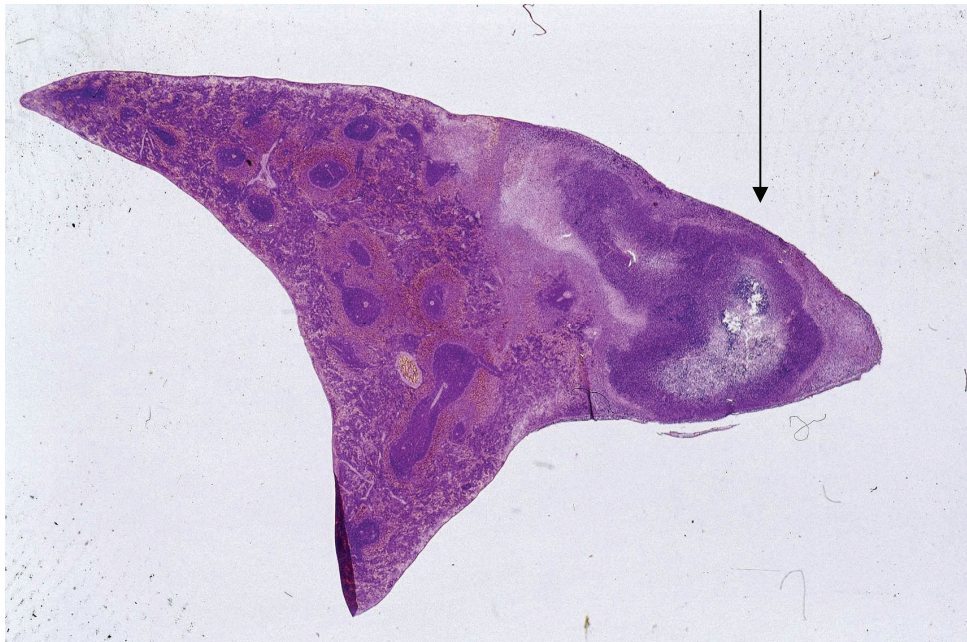


Abb. 23: Keilförmiger Milzinfarkt (Pfeil); HE; Vergrößerung: 10x; Ratte 12-BG

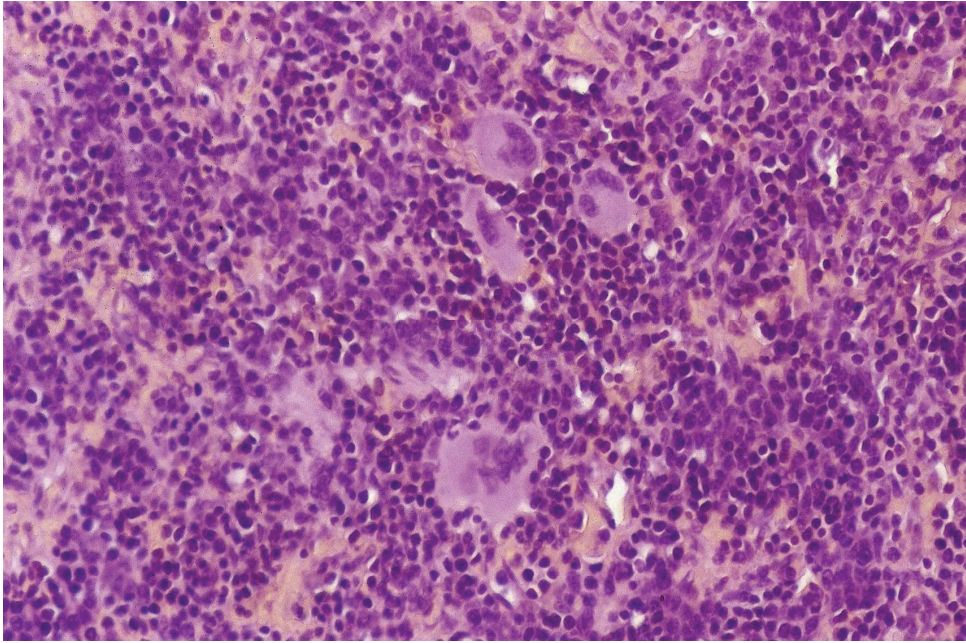


Abb. 24: Mehrkernige Riesenzellen (Mégakaryozyten) in der roten Milzpulpa, HE; Vergrößerung: 300x;
Ratte 12-BG

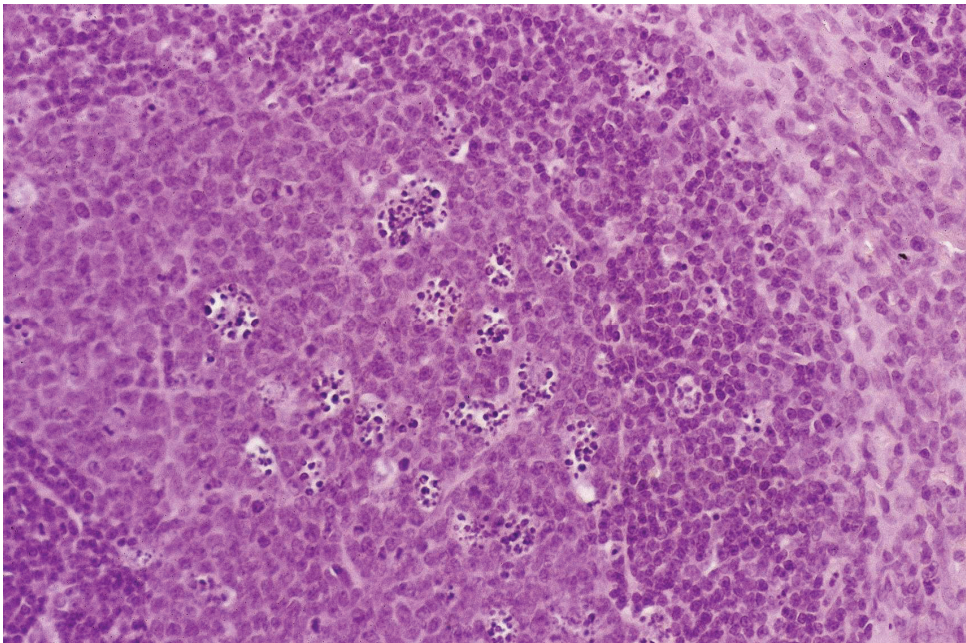


Abb. 25: Milzfollikelhyperplasie mit zahlreichen Sternhimmelmakrophagen; HE; Vergrößerung: 240x;
Ratte 6-BG

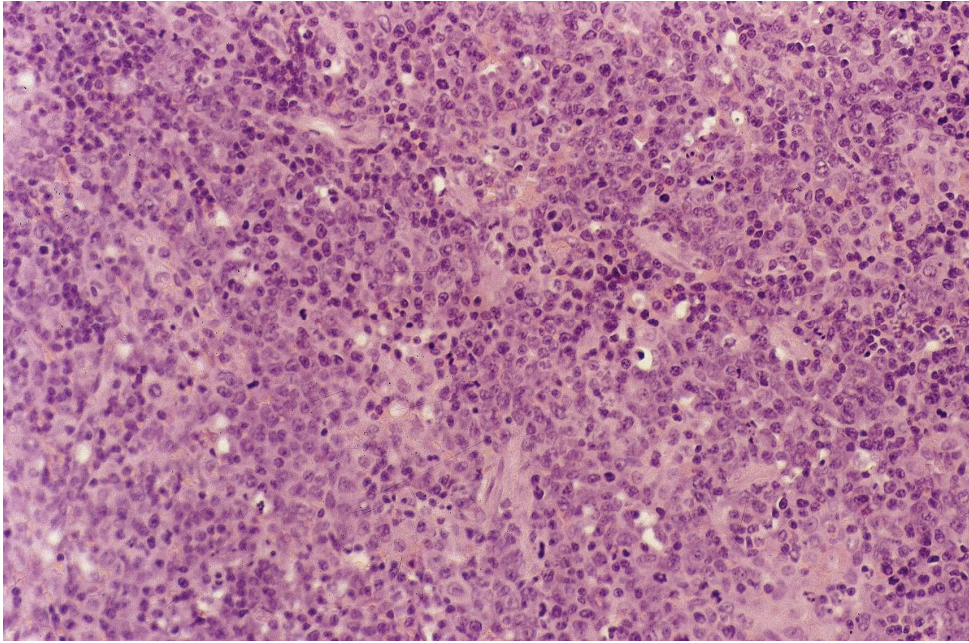


Abb. 26: Milzsinushistiozytose, HE; Vergrößerung: 200x; Ratte 13-UG



Abb. 27: Septischer Niereninfarkt (Pfeil); HE; Vergrößerung: 10x; Ratte 5-BG

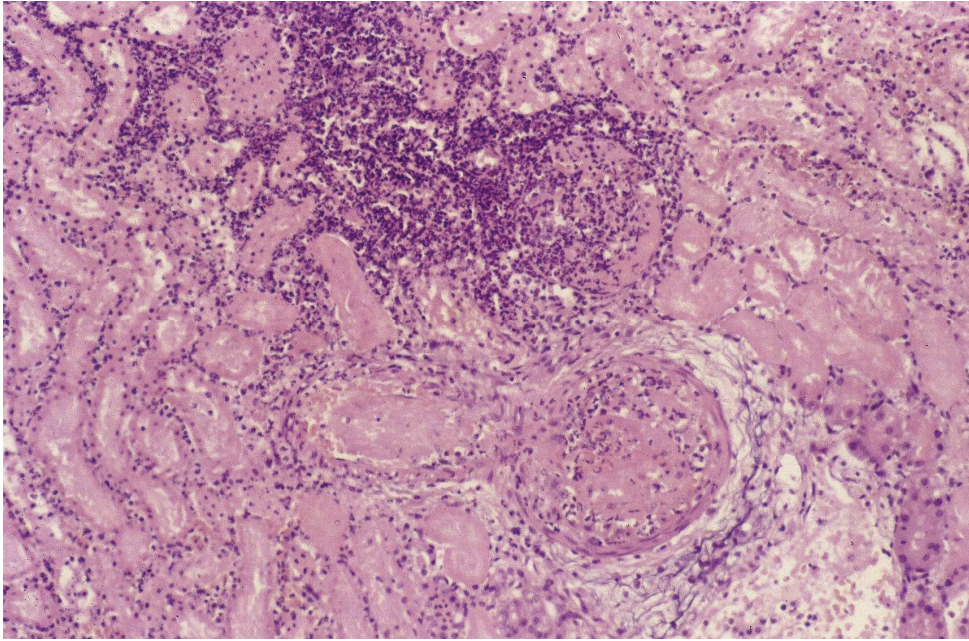


Abb. 28: Septischer Niereninfarkt mit Phlebitis und Phlebothrombose; HE; Vergrößerung: 120x; Ratte 5-BG

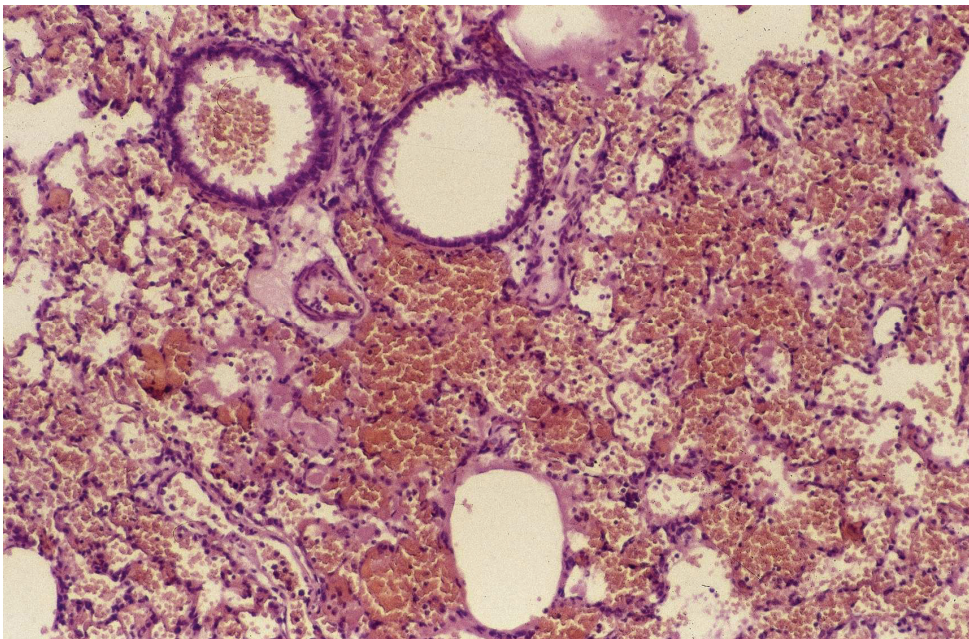


Abb. 29: Lunge: intraalveoläre Hämorrhagien und Fibrinexsudation (Schocklunge); HE; Vergrößerung: 150x; Ratte 3-UG

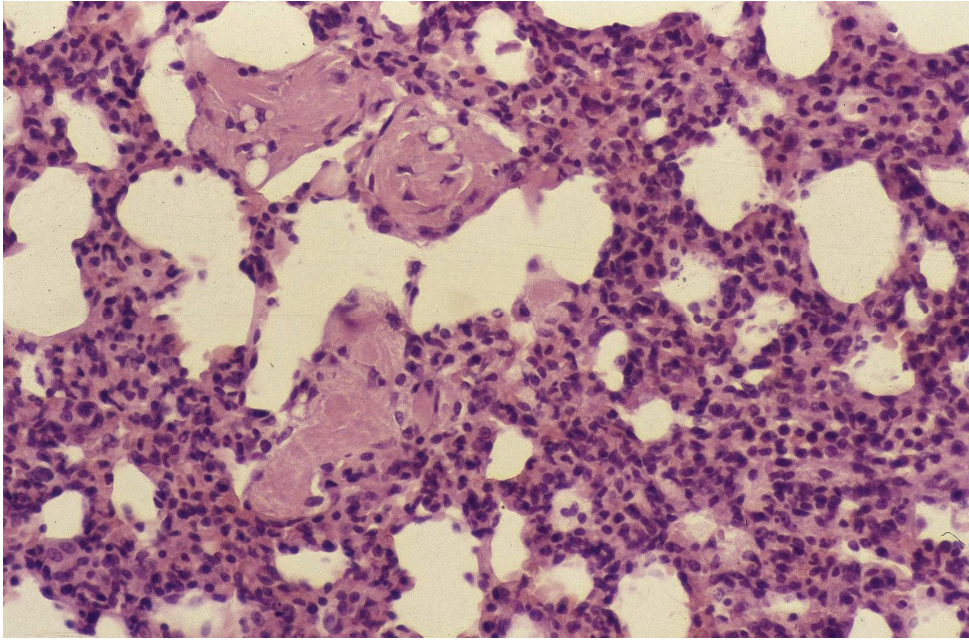


Abb. 30: Lunge: hyaline Mikrothromben; HE; Vergrößerung: 240; Ratte 5-BG

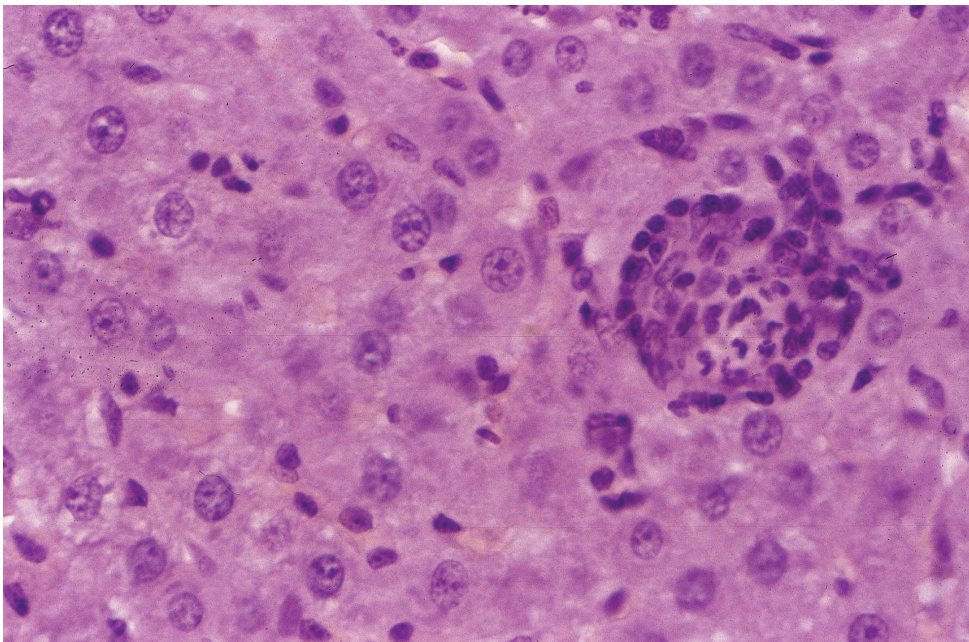


Abb. 31: Leber: Kupfersche Sternzellknötchen; HE; Vergrößerung: 390x; Ratte 11-BG

5. Diskussion

Trotz aller intensivmedizinischer Innovationen und Verbesserungen der Therapien von Sepsispatienten in den letzten zwei Jahrzehnten (17, 18, 27) versterben doch ca. 30% dieser Patienten im Verlauf der Erkrankung (13, 14).

Ein extrakorporales bioartifizielles Immununterstützungssystem durch einen Phagozytenbioreaktor könnte hilfreich für die Behandlung von Patienten mit einer schweren Sepsis bzw. einem septischen Schock sein, da bei diesen Patienten teilweise eine schwere Unter- bzw. Dysfunktion der Mikro- und Makrophagen vorliegt (4-10).

In den zurückliegenden Jahren gab es viele immunmodulatorische Therapieansätze, die selektiv einen Sepsismediator (z.B. TNF-alpha, Endotoxin) als „Hauptschuldigen“ blockieren, bzw. entfernen wollten. Spätestens in der Phase III-Studie erwiesen sich aber alle Ansätze als nicht geeignet, die Überlebenschancen von Sepsispatienten zu verbessern (58-61, 111-118). Ein etwaiger Vorteil eines extrakorporalen Immununterstützungssystems durch einen Phagozytenbioreaktor besteht in der nichtselektive Entfernung von Sepsismediatoren und phagozytosepflichtigem Material und der ganzheitlichen immunmodulatorischen Beeinflussung des Immunsystems des Patienten durch die Zellen im Phagozytosebioreaktor. Dass eine nichtselektive Eliminierung von Sepsismediatoren hoffnungsvolle Resultate erbringen kann, zeigen u.a. die beiden größten Studien über Therapeutischen Plasmaaustausch bei Patienten im septischen Schock oder mit einer schweren Sepsis von Stegmayr und Busund (62, 63). Busund wies z.B. eine absolute Risikoreduktion von 20,5% bei der 28-Tage Mortalität in der Plasmapheresegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nach.

Immunstimulierende Therapien, die die Phagozytosefähigkeit des Sepsispatienten verbessern sollten, erschienen als hoffnungsvolle Therapieansätze. So wurden den Patienten z.B. granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF), granulocyte-monocyte colony stimulating factor und Interferon-gamma verabreicht (119-121). Unter diesen Therapien kam es zwar zu einer Reduktion von Infektionen, aber nicht zu einer verbesserten Mortalität und Letalität der Patienten (122, 123). Diese Ergebnisse wurden zumindest zum Teil durch eine Immunzellaktivierung in-vivo verursacht, die zu Lungenversagen (124), zu Leber- und Nierendysfunktion (125) und Einschränkung der Blut-Hirn-Schranke führen können (126). Die Transfusion von Spendergranulozyten

erbrachte eine reduzierte Mortalität bei neutropenischen Patienten (127), hatte aber auch einige pulmonale Komplikationen zur Folge (128). Zusätzlich führen Bluttransfusionen zu einem erhöhten Risiko für nosokomiale Infektionen und sind assoziiert mit einem längeren Krankenhausaufenthalt und erhöhter Mortalität bei kritisch kranken Patienten (129). Ausgehend von der oben beschriebenen Erkenntnislage erscheint die Behandlung mit einem Phagozytenbioreaktor in einem extrakorporalen System als hoffnungsvoll, da man einerseits die Kapazitäten der Granulozyten für den Patienten nutzen kann, aber andererseits kein direkter Zellkontakt der Behandlungsgranulozyten mit dem Patienten stattfindet. Damit könnte eventuell eine Minimierung der bekannten Komplikationen erreicht werden.

Auf dem Gebiet der extrakorporalen bioartifiziellen Phagozytoseunterstützungssysteme gibt es derzeit nur unserem Ansatz (85, Punkt 1.6). Hoffungsvolle zellbasierte Therapien für Leberversagen (64-79) bzw. und für Nierenversagen bei Multiorganversagen wurden von anderen Arbeitsgruppen etabliert.

Die Arbeitsgruppe um Humes (Ann Arbor, USA) hat einen Nierentubuluszellbioreaktor entwickelt, der zur Behandlung des septischen Schocks mit Multiorganversagen dienen soll. Bei dem so genannten RAD-System (Renal Tubule Assist Device) wachsen ca. 1×10^9 Tubuluszellen als Monolayer in einem normalen Hämofilter. In einem Schweinemodell der Gram-negativen Sepsis konnte eine verlängerte Überlebenszeit, eine kardiovaskuläre Stabilisierung und geringere Zytokinespiegel bei den mit Zellen behandelten Tieren, im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden (80). Eine erste größere klinische Studie bei Patienten mit septischen Schock und Multiorganversagen läuft derzeit (81, 82).

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, Erkenntnisse zur Leistungsfähigkeit und zur Sicherheit einer phagozytenbasierten Sepsistherapie zu gewinnen.

In den in-vitro Versuchen wurde zunächst ein geeignetes Filtermaterial zur sicheren Zurückhaltung der HL-60 Zellen, u.a. auch zur Sicherheit bei einer späteren Anwendung am Menschen, aber auch zur Quantifizierung der Phagozytoseleistung der verwendeten Zellen gefunden. Die Ergebnisse der Zell- und Bakterienfiltration ergaben eindeutig, dass der 5 µm Porenfilter, als einziger der drei getesteten Filter mit unterschiedlichen Porengrößen, zuverlässig die HL-60 Zellen zurückhält, aber gleichzeitig für die

Bakterien vollkommen permeabel ist (Tabellen 6-8). In der Literatur wird die Länge von *E. coli* mit 1 bis 3 μm und die Breite mit 0,5 μm (95) angegeben. Der Durchmesser von Granulozyten beträgt 10 bis 17 μm (1-3). Da die Granulozyten aber gerade im aktivierten Zustand eine gewisse Verformungsarbeit leisten können (2), ist erklärlich, warum ca. 25% der HL-60 Zellen durch den 8 μm Porenfilter in unseren Experimenten durch die Filtermembran durchlässig waren.

In einem weiteren Schritt wurde die Phagozytosefähigkeit der HL-60 Zellen, die in die granulozytäre Richtung differenziert worden, überprüft. Sie müssen funktional sein, um sinnvoll in einem Phagozytosebioreaktor eingesetzt werden zu können. Die differenzierten HL-60 Zellen zeigten im standardisierten Phagozytoseexperiment eine konstante und gute Abreicherung von lebenden *E. coli* O7:K1 (Tabellen 9-10). Damit scheinen die verwendeten Zellen, zumindestens teilweise die Funktionalität reifer Granulozyten zu besitzen. In Voruntersuchungen und im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnten wir nachweisen, dass in die granulozytäre Richtung differenzierte HL-60 Zellen lebende/tote *E. coli*, *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* phagozytieren können (85).

Für die Funktionalität der differenzierten HL-60 Zellen sprechen auch die Befunde der Elektronenmikroskopie und die Zytokinfreisetzung der HL-60 Zellen. Durch die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) konnte die Fähigkeit der differenzierten HL-60 zur Phagozytose von *E. coli* O7:K1 bis zum Stadium der Bildung eines Phagosomes nachgewiesen werden (Abb. 16). Die differenzierte Zelle besitzt im Vergleich zur undifferenzierten Zelle mehr Mitochondrien, Vakuolen und Granula (TEM; Abb. 9, 11), als Ausdruck einer Aktivitätssteigerung der in die granulozytäre Richtung differenzierten Zellen. In der Literatur ist hinreichend beschrieben, dass HL-60 Zytokine, insbesondere TNF- α , IL 1 β , IL 6, IL 8, IL-10 und INF- γ freisetzen können (85, 91). Bei unseren Untersuchungen mit den HL-60 Zellen konnte eine Freisetzung von IL-1 β und wenig TNF α nachgewiesen werden. Bei der Beurteilung der Ergebnisse (Tabelle 11) muss man bedenken, dass die Kontaktzeit zwischen Zellen und Bakterien nur 20 Minuten war. Diese Kontaktzeit zwischen Zellen und Bakterien wurde unter der Vorstellung gewählt, dass zwei ml Patientenplasma, bezogen auf das Gesamtvolumen des Patientenplasmas, ca. 20 Minuten Kontakt mit den Zellen im späteren Bioreaktor im Plasmaperfusionsmodell bei einer sechs bis achtstündigen Behandlungszeit haben würden. Aus diesem Grund sind hier nur die frühzeitig freigesetzten und proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF α und

IL-6 bestimmt worden. Dabei können natürlich solche Single-Pass Experimente nur einen Anhalt für die Zytokine Freisetzung der HL 60 Zellen bei einem späteren Einsatz in einem Bioreaktor als extrakorporale Anwendung (Rezirkulationsmodell) geben. Falls sich diese Resultate im Rezirkulationsmodell bestätigen, könnte die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine sowohl schädliche als auch nützliche Effekte bei denen mit diesen Zellen behandelten Patienten bewirken. Die Wirkung hängt wahrscheinlich davon ab, in welchem Immunstatus der Patient sich zum Zeitpunkt der Behandlung befindet, d.h. im Stadium der Immunparalyse oder der Hyperinflammation.

Ziel des Sepsis-Tiermodells war der Nachweis der Verträglichkeit einer ex-vivo Phagozytoseunterstützung durch die HL-60 Zellen in einem geeigneten Tiermodell. Dabei sollte auch gezeigt werden, dass die verwendeten Zellen in der Lage sind, die Bakterien in einer Rate reduzieren zu können, die die Letalität im Sepsis-Tier Modell signifikant senkt.

In dem verwendeten Ratten Modell der Gram-negativen Sepsis konnte eindeutig die Verträglichkeit der ex-vivo Phagozytoseunterstützung gezeigt werden, da die mit den HL-60 Zellen vorbehandelten Inokulums beimpften Tiere (Behandelte Gruppe) einen Überlebensvorteil (Abb. 17) und einen besseren Krankheitsverlauf im Vergleich zu den Tieren der unbehandelten septischen Gruppe (UG) hatten. Der Kontrollgruppe (KG) wurden keine Bakterien injiziert. Das gesamte aufwendige experimentelle Procedere (z.B. permanenter arterieller und venöser Katheter, häufige Blutentnahmen) wurde aber durchgeführt. Diese Versuchsgruppe zeigte eine für dieses sehr invasive Experiment gute Verträglichkeit des Experimentes an sich an.

Bei den Parametern Bakterienzahl im Blut nach 24 Stunden (Abb. 18) und Gewichtsverlauf (Abb.19, Tabelle 13) hatten die BG und die KG statistisch signifikante besserer Werte als die UG. Bei keinem Tier aus der KG waren Bakterien im Blut nach 24 Stunden nachweisbar, was als ein guter Marker zur Qualitätskontrolle des Experimentes an sich angesehen werden kann. Bei der Interpretation der Bakterienergebnisse muss bedacht werden, dass die UG eine höhere Bakterienkonzentration am Beginn des Experimentes erhalten hat, da die LD-90 Dosis von lebenden E. coli nicht mit den differenzierten HL-60 Zellen vorbehandelt wurde, wie es in der BG geschehen ist.

Bei den Endblutbildern (Tab. 16, 17) zeigte sich bei allen Versuchstieren eine Anämie, die durch die häufigen Blutentnahmen zustande gekommen ist. Nur die UG hatte einen markant erniedrigten Gruppenthrombozytenwert. Die beiden anderen Versuchsgruppen hatten einen Mittelwert im Normbereich der Thrombozyten, bei diesem wichtigen Parameter der disseminierten intravasalen Gerinnung. Im Differentialblutbild hatte die UG die stärkste Tendenz zur Neutropenie, zur Linksverschiebung und zur Lymphopenie. Die BG ließ auch eine Auslenkung bei diesen wichtigen Infektionsparametern in diese Richtungen erkennen, die aber nicht so ausgeprägt war. Zusammenfassend kann man feststellen, dass auch beim Parameter Blutbild, die BG einen besseren Krankheitsverlauf aufwies, als die UG. Die Werte der KG zeigten eine relativ gute Verträglichkeit des experimentellen Protokolls an sich, wobei der Gesundheitszustand der Tiere doch durch die häufigen Messungen und Blutabnahmen in einem geringen Maße beeinträchtigt wurde.

Die Endotoxinwerte im Blut nach zwei und 24 Stunden (Abb. 20) waren in der UG höher als in der BG. Aber genauso wie bei den Bakterien, muss bei den Zwei-Stunden Endotoxinwerten bedacht werden, dass die UG eine höhere Bakterienkonzentration am Beginn des Experimentes erhalten hat, da die LD-90 Dosis von lebenden *E. coli* nicht mit den differenzierten HL-60 Zellen vorbehandelt wurde, wie es in der BG geschehen ist. Der weitere Verlauf der Endotoxinwerte deutet aber markant auf eine bessere immunologische Abwehr und besseren Krankheitsverlauf der BG, im Vergleich zur UG hin. Die Endotoxinwerte der KG waren zu allen Zeitpunkten unter 0,6 ng/ml (MW), was als guter Marker zur Qualitätskontrolle des Experimentes an sich angesehen werden kann.

TNF alpha und IL-6 als wichtige proinflammatorische Zytokine wurden bei den Ratten bestimmt. Bei allen drei Versuchsgruppen waren nach sechs Stunden die IL-6 Werte unter der Nachweisgrenze. Dies war erstaunlich, da in vielen anderen Sepsis-Rattenmodellen IL-6 nachgewiesen werden konnte (96). Hätte die Bestimmung zu einem anderen Zeitpunkt stattgefunden, so wäre wahrscheinlich IL-6 nachweisbar gewesen. Die TNF alpha-Werte (Abb. 21) der UG waren nach zwei, sechs und 24 Stunden höher als die Werte der BG. Bei den beiden Versuchsgruppen kam es zum Zeitpunkt Sechs-Stunden zu einem deutlichen Abfall der TNF alpha-Spiegel im Blut, eventuell als Ausdruck einer antiinflammatorischen Reaktion. Nur bei der UG kam es nach 24 Stunden zu einem deutlichen Anstieg der TNF alpha-Werte. Gemeinsam mit den Werten der Endotoxinmessung mit ebenfalls steigender Tendenz nur in der UG

kann dies als Second-Hit Reaktion einzig in dieser Versuchsgruppe interpretiert werden. Nach 24 Stunden waren die TNF alpha-Werte im Blut auch statistisch signifikant niedriger in der BG als in der UG. In der KG blieben alle Tiere zu allen Zeitpunkten unter der Nachweisgrenze für TNF alpha, was für eine gute Verträglichkeit des Experimentes spricht.

Alle Tiere waren am Versuchsbeginn hypotherm, da die Katheteranlage unter Äthernarkose durchgeführt wurde. Nach dem Eingriff wurden die Tiere für eine Stunde mit Rotlicht behandelt. Die meisten Tiere der UG benötigten viel längere Zeit zum Erreichen einer Normothermie als die Tiere der BG und KG. Auch ab dem Zeitpunkt 60 Stunden und bei den Endwerten hatte nur die UG deutlich hypotherme Werte. Auch dieser Parameter, als einer der SIRS Parameter (16, 22), zeigt einen besseren Krankheitsverlauf der BG im Vergleich zur UG an (siehe Werteanhang, Punkt 7.1).

Bei den hämodynamischen Parametern mittlerer arterieller Blutdruck (Abb. 22) und Herzfrequenz (siehe Werteanhang, Punkt 7.1) hatte die UG im Verlauf signifikant niedrigere Werte als die beiden anderen Versuchsgruppen. Die Tiere der KG und BG sind folglich hämodynamisch stabiler gewesen als die Tiere der UG, die wahrscheinlich eine stärkere Ausprägung der Sepsis hatten.

Bei den Ausgangswerten der Blutgasanalyse, die sofort arteriell nach Katheteranlage in die A. carotis und V. jugularis bei Versuchsbeginn unter Äthernarkose abgenommen wurden, zeigte sich bei allen Tieren die Folgen von Auskühlung und leichtgradiger Dämpfung des Atemzentrums. Insbesondere die BG zeigte dabei die stärksten Auslenkungen in den pathologischen Bereich (saurer pH-Wert, erhöhter pCO₂, niedriger pO₂, niedriger SpO₂). Im Verlauf, aber besonders bei den letzten Werten, hatten dann aber die Tiere der BG und KG die besseren Werte, was als Ausdruck besser funktionierender respiratorischer und metabolischer Regulation dieser beiden Gruppen im Vergleich zur UG gewertet werden kann. Die UG hatten bei den letzten Werten als einzige Gruppe eine Auslenkung in den sauren Bereich mit einem erniedrigten pH-Wert, einem BE unter 3 mmol/l und einem HCO₃ unter 22 mmol/l. Auch der pO₂ und die SpO₂ waren beim letzten Wert als Gruppenmittelwert bei der UG am niedrigsten.

Bei den Elektrolytwerten zeigten fast alle Tiere zu den meisten Messzeitpunkten eine Hypokaliämie und Hypokalziämie. Diese Befunde sind eventuell durch die sehr häufigen Blutentnahmen und Katheterspülungen mit hepainisiertem 0,9%igen NaCl-Lsg. zu erklären, wobei die UG die geringste Tendenz in den pathologischen Bereich zeigte, wahrscheinlich durch die kürzeren Überlebenszeiten.

Die histopathologische Untersuchung von Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Pankreas aller während des Experimentes verstorbenen bzw. nach der Beobachtungszeit von 168 Stunden eingeschläferter Versuchstiere aus den drei Testgruppen, zeigte teilweise erhebliche zirkulatorisch bedingte, am ehesten schockassoziierte pathomorphologische Organveränderungen, die in der Summierung der Einzelbefunde in der KG und BG ausgeprägter waren als in der UG (Tab. 18, 19; Abb. 23-31). Die Schwere der histopathologischen Organveränderungen ist in erster Linie assoziiert mit einer längeren Überlebensdauer der BG und der KG. Dies ist wahrscheinlich durch die protokollgemäßen Belastungen für die Tiere zu erklären (Katheterlegen, Bakteriämie, häufige Blutentnahmen und Messungen). Die Überlebenszeiten der UG waren wesentlich geringer, als die Überlebenszeiten der beiden anderen Gruppen. Das heißt, dass die Tiere der UG oftmals gar keine Zeit hatten, schwere Organveränderungen auszubilden, da sie frühzeitig gestorben sind. Die Tiere aus der BG zeigten dabei häufiger als die anderen Versuchsgruppen Zeichen der Regeneration und Immunstimulation in Leber und Milz.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in dem vorliegenden Sepsis-Tier-Experiment die ex-vivo Phagozytoseunterstützung durch differenzierte HL-60 Zellen verträglich war. Dabei waren die verwendeten Zellen in der Lage, die Bakterien in einer Rate zu reduzieren, die die Letalität der behandelten Tiere senkte und den Krankheitsverlauf günstig beeinflusst hat. Die in die granulozytäre Richtung differenzierte permanente Promyelozytenzelllinie HL-60 zeigte eine Erhöhung der Zellaktivität, die wir in unserem Labor nachweisen konnten (Promotionen von Tilo Kleinfeldt, Sybille Schmitz an der Universität Rostock zum Dr. med., vorliegende Arbeit, 85), andererseits ist sie vielfach in der internationalen Literatur beschrieben (86-93). Damit eignet sich HL-60 als Modellzelllinie für ein bioartifizielles extrakorporales Phagozytoseunterstützungssystem. Das in der vorliegenden Promotion beschriebene Modell zum Verträglichkeitsnachweis einer zellbasierten Immununterstützung hat nur einen praktischen Wert, wenn auch die Wirksamkeit solch einer Behandlung nachgewiesen wird. In einem Folgeprojekt dieses Rattenmodells wurden drei Versuchsgruppen (je n 8) von unreifen Schweinen eine LD-90 Dosis von lebenden *Staphylococcus aureus* i.v. verabreicht. Eine Gruppe wurde mit den differenzierten HL-60 Zellen in einem Plasmaperfusionsmodell direkt behandelt. Die beiden anderen Gruppen wurden ohne Zellen durchgeführt, sowohl eine Gruppe ohne extrakorporalen

Kreislauf, als auch eine mit Kreislauf. In diesem Schweine-Sepsis-Modell gelang der Wirksamkeitsnachweis, da die zellbehandelten Tiere signifikant länger überlebten, als die Tiere der beiden anderen Versuchsgruppen (130).

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertationsarbeit geht es um die prinzipielle Möglichkeit und Verträglichkeit einer bioartifiziellen Immununterstützung im Hinblick auf den Aufbau eines extrakorporalen Immununterstützungssystems (Phagozytosebioreaktor).

Für diese Aufgabenstellung wurde die permanente Promyelozytenzelllinie HL-60 gewählt, die durch Vitamin A-Säure angeregt werden kann, in die granulozytäre Richtung zu differenzieren. Die Differenzierung in die granulozytäre Richtung und eine damit verbundene Erhöhung der Zellaktivität konnte dabei in unserem Labor nachgewiesen werden, andererseits ist sie vielfach in der internationalen Literatur beschrieben.

Die entsprechend differenzierten HL-60 Zellen zeigten in den in-vitro Versuchen, dass sie zu einer starken Abreicherung von lebenden E.coli in der Lage sind. Durch die Rasterelektronenmikroskopie konnte die Adhäsion der Bakterien an die Zellen nachgewiesen werden. Der Beweis der intrazellulären Aufnahme der Bakterien durch die Zellen konnte mittels der Transmissionselektronenmikroskopie erbracht werden, so dass von einer Phagozytosefähigkeit der differenzierten HL-60 Zellen ausgegangen werden kann.

Im Ratten-Modell der Gram-negativen Sepsis wurde gezeigt, dass eine ex-vivo Phagozytoseunterstützung durch die HL-60 Zellen verträglich war. Weiterhin waren die verwendeten Zellen in der Lage, die Bakterien in einer Rate zu reduzieren, die den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst und die Letalität der behandelten Tiere gesenkt hat.

Ein extrakorporales bioartifiziell Immununterstützungssystem durch einen Phagozytenbioreaktor könnte hilfreich für die Behandlung von Patienten mit einer schweren Sepsis und septischen Schock sein, da bei diesen Patienten teilweise eine schwere Dysfunktion der Mikro- und Makrophagen vorliegt.

Das Sepsissyndrom ist auch nach erheblichen Fortschritten bei der Therapie mit einer Letalität von durchschnittlich 30% vergesellschaftet.

In den letzten zwei Jahrzehnten gab es viele immunmodulatorische Therapieansätze, die selektiv einzelne Sepsismediatoren (z.B. TNF-alpha, Endotoxin) als „Hauptschuldige“ blockieren, bzw. entfernen wollten. Spätestens in der Phase III-Studie erwiesen sich aber alle Ansätze als nicht geeignet, die Überlebenschancen von Sepsispatienten zu

verbessern. Ein etwaiger Vorteil eines extrakorporalen Immununterstützungssystems durch einen Phagozytenbioreaktor besteht durch die nichtselektive Entfernung von Sepsismediatoren und phagozytosepflichtigen Material und die komplexe immunmodulatorische Beeinflussung des Immunsystems des Patienten durch die Zellen im Phagozytosebioreaktor. Dass eine nichtselektive Eliminierung von Sepsismediatoren hoffnungsvolle Resultate erbringen kann, zeigen u.a. die beiden größten Studien über Therapeutischen Plasmaaustausch bei Patienten im septischen Schock oder mit einer schweren Sepsis von Stegmayr und Busund. Busund wies z.B. eine absolute Risikoreduktion von 20,5% bei der 28-Tage Mortalität in der Plasmapheresegruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe nach.

Zellbasierte Therapien für Leberversagen und Nierenversagen im Rahmen eines Multiorganversagens wurden von anderen Arbeitsgruppen etabliert und zeigten hoffnungsvolle präklinische und klinische Ergebnisse.

Auf dem Gebiet der extrakorporalen bioartifiziellen Immununterstützungssysteme, gibt es derzeit nur den hier vorgestellten Ansatz. In einem Nachfolgeprojekt dieser Promotionsarbeit wurde in einem Schweine-Sepsis-Modell die prinzipielle Wirksamkeit einer zellbasierten Immununterstützung in einem Plasmaperfusionsmodell nachgewiesen.

7. Anhang

7.1 Messwerte ausgewählter Parameter

Vorexperiment Verträglichkeit (Punkt 4.2.1)

Gewichtsverlauf im Vorexperiment (Ratten): Vergleich Ausgangs- Endgewicht nach 168 h (in g)			
	KG (n=4)	BG (n=4)	UG (n=4)
	26	33	41
	39	32	53
	46	30	39
	33	38	33
MW:	36	33,25	41,5
Median:	36	32,5	40
Stabw.:	8,52	3,40	8,39
n	4	4	4
Ausgangsgewicht (in g):			
	209	215	208
	205	209	217
	216	220	204
	214	204	201
MW:	211	212	207,5
Median:	211,5	212	206
Stabw.:	4,97	6,98	6,95
n	4	4	4
Endgewicht (nach 168 h in g):			
	235	248	249
	244	241	270
	262	250	243
	247	242	234
MW:	247	245,25	249
Median:	245,5	245	246
Stabw.:	11,22	4,43	15,30
n	4	4	4

Vorexperiment Verträglichkeit (Punkt 4.2.1)

Temperaturverlauf		Zeit in h																					
		0	2	4	6	8	10	12	14	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	156	168	
UG	Mittelwert	36,62	36,45	37,08	37,05	36,95	36,99	36,69	37,07	36,61	36,89	36,72	36,72	36,39	36,39	36,61	36,46	36,21	36,40	36,41	36,39	36,57	
	Median	36,64	36,44	37,11	37,09	36,93	37,16	36,71	37,26	36,47	36,85	36,76	36,78	36,42	36,37	36,83	36,79	36,19	36,39	36,48	36,27	36,43	
	Stabw.	0,25	0,28	0,13	0,23	0,23	0,56	0,38	0,53	0,34	0,44	0,47	0,31	0,27	0,36	0,65	0,68	0,63	0,04	0,58	0,38	0,80	
	n=	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	3,00	4,00	4,00	4,00	4,00	
BG	Mittelwert	36,65	36,94	37,24	36,61	36,81	37,52	37,23	37,51	36,69	36,96	36,94	36,66	36,67	36,30	36,49	36,76	37,07	36,71	36,51	36,43	36,10	
	Median	36,68	37,13	37,42	36,53	36,87	37,63	37,25	37,68	36,65	36,90	37,00	36,56	36,76	36,16	36,52	36,52	37,15	36,66	36,07	36,38	36,15	
	Stabw.	0,45	0,41	0,46	0,45	0,62	0,37	0,21	0,45	0,34	0,39	0,32	0,27	0,55	0,38	0,31	0,82	0,29	0,20	1,01	0,28	0,12	
	n=	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	
KG	Mittelwert	36,39	36,67	36,91	36,89	37,34	37,31	36,95	37,08	37,02	37,04	36,61	36,77	36,52	36,49	36,81	36,17	36,97	36,26	36,18	36,42	36,44	
	Median	36,37	36,60	37,02	36,91	37,43	37,40	36,98	37,13	37,01	37,03	36,68	36,91	36,38	36,61	37,02	36,05	36,93	36,39	36,03	36,42	36,53	
	Stabw.	0,45	0,15	0,36	0,21	0,39	0,28	0,27	0,81	0,17	0,43	0,38	0,53	0,42	0,35	0,61	0,36	0,33	0,74	0,51	0,42	0,24	
	n=	4,00	4,00	3,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	

Sepsis-Tier-Modell (Punkt 4.2.2)

Temperaturverlauf		Zeit in h																															
		0	2	6	10	16	20	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90	96	102	108	114	120	126	132	138	144	150	156	162	168	
UG	Mittelwert	35,48	35,78	35,56	34,97	36,52	36,26	36,21	37,46	37,05	37,07	37,34	37,49	36,58	36,67	35,48	37,47	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
	Median	35,44	36,49	35,48	34,88	36,37	36,24	36,11	37,36	37,13	37,05	37,41	37,74	36,88	37,03	36,39	37,47	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
	Stabw.	0,43	1,94	2,70	1,70	0,47	0,84	0,70	0,28	0,46	0,28	0,55	0,83	1,36	1,15	2,88	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
	n=	8,00	8,00	7,00	6,00	5,00	5,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00	3,00	3,00	3,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
BG	Mittelwert	35,37	36,72	37,91	36,51	36,77	37,08	37,07	37,04	37,25	37,11	37,24	37,24	37,04	37,33	37,18	36,76	36,97	36,63	36,81	36,88	36,83	36,38	37,38	37,24	37,16	37,29	37,10	36,97	37,42	37,35	37,33	
	Median	35,38	36,53	38,03	36,88	36,79	37,23	37,10	37,23	37,30	37,21	37,09	37,19	37,16	37,44	37,40	37,05	36,99	36,94	37,08	36,94	37,08	36,86	37,12	37,22	37,08	37,13	37,05	36,98	37,37	37,42	37,37	
	Stabw.	0,19	1,30	1,36	0,73	0,58	0,69	0,54	0,82	0,55	0,83	0,49	0,96	0,49	0,48	0,72	0,95	0,51	1,19	0,91	0,70	1,00	0,57	0,68	0,49	0,52	0,47	0,28	0,65	0,31	0,43	0,42	
	n=	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	7,00	7,00	5,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	
KG	Mittelwert	35,60	37,39	36,94	36,99	36,95	37,13	37,05	37,17	37,11	37,30	37,61	37,36	36,97	37,49	37,02	37,18	36,99	37,27	36,79	36,80	37,14	37,23	37,11	37,24	36,95	37,36	36,81	37,28	37,03	37,26	37,27	
	Median	35,59	37,62	37,30	37,11	37,03	37,28	37,30	37,42	37,36	37,28	37,65	37,48	37,08	37,24	37,21	37,19	37,03	37,21	37,03	37,26	37,25	37,17	37,23	37,27	37,02	37,24	37,16	37,34	37,08	37,28	37,28	
	Stabw.	0,13	1,78	0,97	0,57	0,34	0,57	0,67	0,87	0,66	0,16	0,57	0,47	0,37	0,45	1,07	0,38	0,77	0,21	0,81	1,64	0,54	0,32	0,46	0,42	0,25	0,39	0,95	0,21	0,38	0,35	0,32	
	n=	9,00	9,00	9,00	9,00	8,00	8,00	9,00	8,00	9,00	8,00	9,00	8,00	9,00	8,00	9,00	8,00	9,00	8,00	9,00	8,00	8,00	7,00	8,00	7,00	8,00	7,00	8,00	8,00	7,00	8,00	8,00	8,00

Sepsis-Tier-Modell (Punkt 4.2.2)

		Zeit in h																	
		0	2	10	20	30	42	54	66	78	90	102	114	126	138	150	162	168	
UG	Mittelwert	7,42	7,47	7,48	7,48	7,45	7,47	7,45	7,51	7,44	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	
	Median	7,44	7,46	7,47	7,48	7,45	7,48	7,47	7,51	7,44	#ZAHL	#ZAHL	#ZAHL	#ZAHL	#ZAHL	#ZAHL	#ZAHL	#ZAHL	
	Stabw.	0,06	0,03	0,05	0,01	0,05	0,02	0,08	0,01	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	
	n=	7,00	8,00	6,00	4,00	5,00	4,00	4,00	3,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
BG	Mittelwert	7,29	7,38	7,46	7,47	7,46	7,48	7,47	7,49	7,44	7,46	7,42	7,44	7,44	7,47	7,52	7,48	7,46	
	Median	7,32	7,41	7,46	7,47	7,47	7,48	7,47	7,50	7,45	7,46	7,45	7,44	7,44	7,47	7,52	7,48	7,46	
	Stabw.	0,12	0,13	0,03	0,03	0,03	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,06	0,05	#DIV/0	0,02	#DIV/0	0,02	0,05	
	n=	6,00	8,00	7,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	5,00	5,00	1,00	2,00	1,00	2,00	2,00	
KG	Mittelwert	7,45	7,48	7,45	7,47	7,47	7,48	7,47	7,47	7,46	7,48	7,48	7,48	7,45	7,46	7,47	7,41	7,41	
	Median	7,46	7,47	7,46	7,47	7,47	7,48	7,47	7,47	7,47	7,48	7,48	7,48	7,46	7,47	7,47	7,39	7,39	
	Stabw.	0,04	0,02	0,03	0,01	0,03	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02	0,03	0,02	0,02	0,02	0,07	0,06	
	n=	7,00	8,00	8,00	8,00	9,00	9,00	8,00	7,00	7,00	7,00	7,00	3,00	6,00	5,00	3,00	4,00	4,00	

		Zeit in h																	
		0	2	10	20	30	42	54	66	78	90	102	114	126	138	150	162	168	
UG	Mittelwert	-2,03	-4,05	-1,43	0,45	-3,86	-3,10	-1,10	3,47	1,20	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	
	Median	-2,50	-4,40	0,65	0,00	-1,40	-1,95	0,10	3,20	1,20	#Zahl	#Zahl	#Zahl	#Zahl	#Zahl	#Zahl	#Zahl	#Zahl	
	Stabw.	3,17	3,28	5,82	2,75	5,15	5,84	5,28	6,70	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	#DIV/0	
	n=	7,00	8,00	6,00	4,00	5,00	4,00	4,00	3,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
BG	Mittelwert	-1,53	-2,70	-3,16	-3,28	-6,08	-2,28	0,21	-3,21	-5,78	-4,44	-1,54	-2,15	-0,30	-0,80	7,70	-3,90	-1,58	
	Median	-2,40	-0,85	-3,80	-3,55	-6,50	-1,25	1,70	-4,95	-4,80	-5,70	2,50	-2,15	-0,30	-0,80	7,70	-3,95	0,05	
	Stabw.	3,83	5,94	6,39	4,81	3,48	4,70	6,42	5,75	3,40	4,80	6,53	6,43	#DIV/0	5,37	#DIV/0	5,66	6,84	
	n=	6,00	6,00	7,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00	5,00	2,00	1,00	2,00	1,00	4,00	4,00	
KG	Mittelwert	1,80	2,25	0,38	-1,39	-2,40	-3,14	1,63	-3,35	-0,73	-2,67	-2,06	2,08	0,82	-2,08	3,07	-0,65	-0,65	
	Median	3,20	4,65	-0,05	-0,70	-1,80	-2,20	1,80	-3,30	-1,50	-2,70	-1,50	2,55	1,50	-2,60	0,90	-1,65	-1,65	
	Stabw.	5,95	6,59	6,23	5,88	7,29	7,10	5,00	2,61	4,17	3,99	5,62	3,33	2,62	5,25	6,33	6,93	6,93	
	n=	8,00	8,00	8,00	8,00	5,00	5,00	4,00	4,00	7,00	7,00	7,00	4,00	5,00	6,00	3,00	6,00	6,00	

7.2 Daten der Normalwertbildung - Blutbild Ratten

(siehe Punkt 3.3.1)

Tier-Nr.:		Erythroz.	Hb	HK	MCH	Leukozyten	Thrombozyt.	% Segm.	% Stabk.	% Neutroph.	% Lymphoz.	% Monoz.	% Eosinoph.	% Basoph.
1	Vorversuch	6,49	8,2	0,384	1,26	2,5	795	13	1	14	84	1	1	0
2	Vorversuch	6,53	8,6	0,411	1,31	8	999	7	1	8	90	1	1	0
3	Vorversuch	6,27	8,3	0,397	1,32	10,2	1196	8	1	9	89	1	1	0
4	Vorversuch	6,32	8,4	0,4	1,33	8,4	1393	8	3	11	87	1	1	0
5	Vorversuch	5,89	7,8	0,395	1,32	8,1	1234	5	2	7	91	1	1	0
6	Vorversuch	5,92	7,7	0,363	1,3	7,9	1025	10	1	11	87	1	1	0
7	Vorversuch	6,57	8,6	0,398	1,3	11,5	1068	8	1	9	89	1	1	0
8	Vorversuch	6,24	7,7	0,349	1,23	6,4	677	4	0	4	93	1	1	1
9	Vorversuch	6,59	8,7	0,403	1,32	7,2	900	10	1	11	87	1	1	0
10	Vorversuch	6,39	8,1	0,37	1,27	3	1068	10	1	11	87	1	0	1
11	Vorversuch	6,16	8	0,372	1,3	6,7	914	4	0	4	94	1	1	0
12	Vorversuch	5,97	7,8	0,367	1,32	7,2	1246	17	2	19	79	1	1	0
25		6,02	8,1	0,367	1,35	8,3	969	9	0	9	90	1	0	0
23		6,54	8,3	0,376	1,27	6,5		17	3	20	77	2	1	0
22		5,92	7,6	0,363	1,27	5,3	905	6	0	6	92	1	1	0
21		6,45	8,7	0,392	1,35	9,2	952	10	0	10	88	2	0	0
19		6,5	9	0,404	1,38	14	1136	8	1	9	91	0	0	0
2		6,51	8,4	0,384	1,29	6,9	882	10	3	13	84	2	1	0
11		6,72	9,6	0,428	1,43	14,4	1067	8	2	10	89	1	0	0
10		7,25	9,6	0,429	1,32	7	1005	9	1	10	88	1	1	0
9		7,43	9,7	0,437	1,32	6	1148	10	3	13	84	2	1	0
7		6,34	8,4	0,392	1,33	8,7	1107	10	2	12	88	0	0	0
6		7,09	9	0,407	1,27	10,2	983	12	2	13	85	0	0	1
5		7,15	9,6	0,445	1,34	6,4	1063	18	4	22	76	2	0	0
18		6,28	9,1	0,397	1,45	12	1228	6	9	15	83	2	0	0
15		7,41	9,4	0,438	1,27	16,8	1111	7	1	8	91	2	0	0
14		6,8	9,1	0,43	1,34	12,6	1028	12	4	16	82	2	0	0
4		7,82	10,1	0,454	1,28	13,6	700	11	2	13	85	1	1	0
3		5,34	7,3	0,322	1,36	8,9	869	16	4	20	79	1	0	0
	Mittelwert	6,514137931	8,582758621	0,395448276	1,317241379	8,755172414	1023,857143	9,75862069	1,896551724	11,62068966	86,51724138	1,172413793	0,586206897	0,103448276
	Median	6,49	8,4	0,395	1,32	8,1	1026,5	9,5	1	11	87	1	1	0
	Stabw.	0,540360443	0,728044821	0,030760116	0,048099343	3,329584509	163,8551109	3,689953401	1,838959869	4,546892621	4,66461367	0,601721688	0,501230014	0,309934047
	n=	28	28	28	28	28	27	28	28	28	28	28	28	28
2SA-MW+2SA=Normalwert:		5,43-7,59	7,1-10	0,335-0,455	1,22-1,41	2,1-15,4	687-1349	2-17	0-6	3-21	77-96	0-3	0-2	0-1

7.3 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<u>Abbildungen</u>	Seite
1: Schematische Darstellung der Sepsispathogenese	8
2: Schema des EISS-Therapieverfahrens	16
3: Gram Färbung und Tusche Kapselfärbung (rechter, unterer Bildausschnitt) von E. coli O7:K1; Vergrößerung: 1:960-1000, Ölimmersion	20
4: Schema eines Filtrationsexperimentes	24
5: Schema eines standardisierten Phagozytoseexperimentes	26
6: E.coli O7:K1, REM, Vergrößerung: 10500x	43
7: E.coli O7:K1, TEM, Vergrößerung: 11000x	43
8: Undifferenzierte HL-60 Zelle, REM, Vergrößerung: 8750x	44
9: Undifferenzierte HL-60 Zelle, TEM, Vergrößerung: 10100x	44
10: Differenzierte HL-60 Zelle, REM, Vergrößerung: 11000x	45
11: Differenzierte HL-60 Zelle, TEM, Vergrößerung: 10600x	45
12: Adhäsion von E.coli O7:K1 an differenzierte HL-60 Zellen-Kontaktzeit: 5 Min., REM, Vergrößerung: 9500x	46
13: Adhäsion von E.coli O7:K1 an differenzierte HL-60 Zelle-Kontaktzeit: 15 Min., REM, Vergrößerung: 11000x	46
14: Adhäsion von E.coli O7:K1 an differenzierte HL-60 Zelle, Ausbildung von Pseudopodien-Kontaktzeit: 45 Min., REM, Vergrößerung: 9500x	47
15: Adhäsion von E.coli O7:K1 (Pfeil) an differenzierte HL-60 Zelle-Kontaktzeit: 5 Min., TEM, Vergrößerung: 36660x	47
16: Phagosombbildung mit E.coli O7:K1 (Pfeil) durch differenzierte HL-60 Zelle-Kontaktzeit: 15 Min., TEM, Vergrößerung: 11110x	48
17: Kumulatives Überleben im Ratten Sepsis-Modell (Kaplan-Meier)	51
18: Bakterienzahl im Blut nach 24 Stunden im Ratten Sepsis-Modell	51

19: Mittlere Gruppendifferenz zwischen Ausgangs- und Endgewicht im Ratten Sepsis-Modell	53
20: Endotoxin-Werte im Blut nach 2 und 24 Stunden im Ratten Sepsis-Modell	58
21: TNF-alpha Werte im Blut nach 2, 6 und 24 Stunden im Ratten-Sepsis-Modell	59
22: Mittlere arterielle Blutdruckwerte: Ausgangswerte, nach 72 und nach 168 Stunden bzw. letzter Wert (LW) im Ratten Sepsis-Modell	60
23: Keilförmiger Milzinfarkt; HE; Vergrößerung: 10x; Ratte 12-BG	66
24: Mehrkernige Riesenzellen (Megakaryozyten) in der roten Milzpulpa, HE; Vergrößerung: 300x; Ratte 12-BG	67
25: Milzfollikelhyperplasie mit zahlreichen Sternhimmelmakrophagen; HE; Vergrößerung: 240x; Ratte 6-BG	67
26: Milzsinushistiozytose, HE; Vergrößerung: 200x; Ratte 13-UG	68
27: Septischer Niereninfarkt; HE; Vergrößerung: 10x; Ratte 5-BG	68
28: Septischer Niereninfarkt mit Phlebitis und Phlebothrombose; HE; Vergrößerung: 120x; Ratte 5-BG	69
29: Lunge: intraalveoläre Hämorrhagien und Fibrinexsudation (Schocklunge); HE; Vergrößerung: 150x; Ratte 3-UG	69
30: Lunge: hyaline Mikrothromben; HE; Vergrößerung: 240; Ratte 5-BG	70
31: Leber: Kupfersche Sternzellknötchen; HE; Vergrößerung: 390x; Ratte 11-BG	70

Tabellen

1: Mediatoren von antimikrobieller und zytoxischer Aktivität, die von Phagozyten gebildet werden und im Lysosom vorhanden sind	2
2: Erkrankungen, die mit einem primären Phagozytosedefekt einhergehen	3
3: Versuchsplan des Vorexperimentes Verträglichkeit des Sepsis-Tier Modells	30
4: Versuchsplan des Sepsis-Tier Modells	34

5: Konzentrationskinetik von E. coli O7:K1	37
6: Ausgangs- und Endkonzentration von E.coli O7:K1 und O111:B4 bei Filtration durch einen 1,2- und 5 µm Porenfilter	38
7: Bakteriendurchlaßrate (in %) von E.coli O7:K1 und O111:B4 unterschiedlicher Konzentrationen filtriert durch einen 1,2- und 5 µm Porenfilter	38
8: Ausgangs- und Endkonzentration und Filtrerrückhaltungsrate (in %) von HL-60 Zellen unterschiedlicher Konzentrationen filtriert durch einen 1,2-, 5-, 8 µm Porenfilter	39
9: Bakterienabreicherung (E.coli O7:K1) im standardisiertem Phagozytoseexperiment durch HL-60 Zellen bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten mit unterschiedlichen Zell- und Bakterienkonzentrationen	40
10: Phagozytoseraten von E.coli O7:K1 im standardisiertem Phagozytoseexperiment durch HL-60 Zellen bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten mit unterschiedlichen Zell- und Bakterienkonzentrationen	41
11: Freisetzung von IL-1 β , TNF- α und IL-6 von HL-60 Zellen mit und ohne Bakterienkontakt bei einer Inkubationszeit von 20 Minuten	42
12: Endblutbild Ratten Sepsis-Modell (Vorversuch)	49
13: Gewichtsverlauf, Ausgangs- und Endgewicht im Ratten Sepsis-Modell	52
14: Ausgangsblutbild Ratten Sepsis-Modell	54
15: Ausgangsblutbild - Ratten Sepsis-Modell: pathologische Befunde	55
16: Endblutbild Ratten Sepsis-Modell	56
17: Endblutbild - Ratten Sepsis-Modell: pathologische Befunde	57
18: Histopathologische Untersuchungsbefunde; Ratten-Sepsis-Modell	65
19: Gesamtstärke der Organveränderungen; Ratten-Sepsis-Modell	66

7.4 Histologische Arbeitsschritte

Allen während des Experimentes verstorbenen oder nach der Beobachtungszeit von 168 Stunden eingeschläferten Versuchstieren wurden nach Todeseintritt Gewebeproben von Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Pankreas für die lichtmikroskopische histopathologische Untersuchung entnommen und anschließend in 4 %igem gepufferten Formalin fixiert.

Die folgende Paraffineinbettung der fixierten Präparate, die Anfertigung der Schnittpräparate und die histopathologische Auswertung erfolgten durch das Institut für Pathologie der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. H. Nizze).

Histologische Arbeitsschritte

Einbettung

- 1) Auswaschen des Fixiermittels Formalin („Wässerung“)
- 2) Entwässern der Präparate mit einer Alkoholreihe in aufsteigender Konzentration
- 3) Entspritung (sog. Alkoholverdrängung) mit Xylol
- 4) Durchtränken des Gewebes zunächst in Xylol-Paraffingemisch, später in flüssigem Paraffin in heißem Paraffinbad bei ca. 60° C über mehrere Stunden

Ausgießen und Aufblocken der Präparate

- die Ausbettung erfolgte halb automatisch mit Hilfe eines Paraffinausgießsystems (Shandon Histocentre 2)

Schneiden der Präparate am Mikrotom

- mit dem Mikrotommesser Anfertigung von 3-5 µm dicken Schnitten

Aufziehen/ Aufkleben von Paraffinschnitten (Methode mit Wasser

Entparaffinieren

- Entfernung des Einbettungsmittels nach völligem Trocknen des Paraffinschnittes in Xylol und anschließend Übertragung in Wasser durch absteigende Alkoholreihe

Hämalaun-Eosin-Färbung

- voll automatisch in geschlossenem Färbeautomaten (Shandon Varistain 24.4)
- die Zellkerne werden durch das Hämalaun blau, das Zytoplasma und Bindegewebe durch das Eosin in verschiedenen Rottönen gefärbt

Eindecken der Präparate und anschließende histologische Untersuchung

8. Literaturverzeichnis

1. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA: Kuby Immunology. 4. Auflage, W.H. Freeman and Company New York, 2000 (ISBN 0-7167-3331-5)
2. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD: Immunobiology. 4. Auflage, Elsevier Science Ltd/Garland Publishing London, 1999 (ISBN 0-81533217-3)
3. Gerns D, Kalden JR, Resch K: Immunologie. 4. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York, 1997 (ISBN 3-13-534804-0)
4. Kaufmann I, Hoelzl A, Schliephake F, Hummel T, Chouker A, Peter K, Thiel M: Polymorphonuclear leukocyte dysfunction syndrome in patients with increasing sepsis severity. Shock 2006; 26: 254-61
5. Pachot A, Monneret G, Brion A, Venet F, Bohe J, Bienvenu J, Mougin B, Lepape Alain: Messenger RNA expression of major histocompatibility complex class II genes in whole blood from septic shock patients. Crit Care Med 2005; 33 (1): 31-8
6. Tavares-Murta BM, Zaparoli M, Ferreira RB, Silva-Vergara ML, Oliveira CHB, Murta EFC, Ferreira SH, Cunha FQ: Failure of neutrophil chemotactic function in septic patients. Crit Care Med 2002; 30: 1056-61
7. Keel M, Ungethüm U, Steckholzer U, Niederer E, Hartung T, Trentz O, Ertel W: IL-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe infection. Blood 1997; 90 (9): 3356-63
8. Egger G, Aigner R, Glasner A, Hofer HP, Mitterhammer H, Zelzer S: Blood polymorphonuclear leukocyte migration as a predictive marker for infections in severe trauma: comparison with various inflammation parameters. Intensive Care Medicine 2004; 30: 331-4
9. Lehmann LE, Novender U, Schroeder S, Pietsch T, Spiegel T, Putensen C, Hoeft A, Stüber F: Plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are elevated in patients with severe sepsis. Intensive Care Medicine 2001; 27: 1412-5
10. Wenisch C, Parschalk P, Hasenhündl M, Griesmacher A, Graninger W: Polymorphonuclear leukocyte dysregulation in patients with gram-negative septicemia assessed by flow cytometry. European Journal of Clinical Investigation 1995; 25: 418-24
11. Eichacker PO, Pugin J: Evolving concepts in sepsis and septic shock. 1. Auflage, Kluwer Academic Publisher Boston Dordrecht London, 2001 (ISBN 0-7923-7235-2)

12. Faist E, Baue AE, Schildberg FW: The Immune Consequences of Trauma, Shock and Sepsis-Mechanisms and Therapeutic Approches, Volume 1 (ISBN 3-928057-75-8), Volume 2/1 (ISBN 3-928057-76-6), Volume 2/2 (ISBN 3-931660-14-1) Pabst Science Publishers, Lengerich-Berlin-Düsseldorf, Riga, Scotland (USA), Wien, Zagreb, 1996
13. Rangel-Frausto MS: The Epidemiology of Bacterial Sepsis. Infectious Disease Clinics of North Amerika 1999; 13 (2): 299-312
14. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome and associated costs of care. Crit Care Med 2001; 29 (7): 1303-9
15. Schmid A, Burchardi H, Clouth J, Schneider H: Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. Eur Health Econom 2002; 3: 77-82
16. Members of the American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee. Definitions of sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med 1992; 20: 864-74
17. Sprung CL, Bernard GR, Dellinger RP: Guidelines for the Management of Severe Sepsis and Septic Shock (International Sepsis Forum). Intensive Care Medicine 2001; 27 (1): 1-134
18. S2-Leitlinie der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin: Diagnose und Therapie der Sepsis. Anästhesiologie und Intensivtherapie 2006; 47 (6): 157-79
19. Trzeciak S, Zanotti-Cavazzoni S, Parrillo JE, Dellinger P: Inclusion Criteria for Clinical Trials in Sepsis: Did the American College of Chest Physicans / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Definitions of Sepsis Have an Impact? CHEST 2005; 127: 242-5
20. Vincent JL: Dear SIRS, I'm sorry to say that I dont like you... Crit Care Med 1997; 25: 372-4
21. Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vincent JL, Cohen J, Opal S, Glauser M, Parson P, Fisher CJ Jr, Repine JE: Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: Time for a reevaluation. Crit Care Med 2000; 28: 232-5
22. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, For the International Sepsis Definitions Conference: 2001 SCCM/ESCM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med 2003; 31: 1250-6

23. Opal SM, Cohen J: Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* 1999; 27 (8): 1608-16
24. Li H, Llera A, Malchiodi EL, Mariuzza RA: The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 435-66
25. Symeonides S, Balk RA: Nitric oxide in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13 (2): 449-63
26. van der Poll T, van Deventer SJ: Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13 (2): 413-26
27. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM; for the Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee: Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2004; 32 (3): 858-73
28. Garnacho-Montero J, Garcia-Garmendia JL, Barrero-Almodovar A, Jimenez-Jimenez FJ, Perez-Paredes C, Ortiz-Leyba C: Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *Crit Care Med* 2003; 31 (12): 2742-51
29. Bochud PY, Bonten M, Marchetti O, Calandra T: Antimicrobial therapy for patients with severe sepsis and septic shock: an evidence-based review. *Crit Care Med* 2004; 32 (11): 495-512
30. Meier-Hellmann A: Hämodynamische Stabilisierung in der Sepsis. *Anästh Intensivmed* 2000; 41: 601-13
31. Martin C, Viviani X, Leone M, Thirion X: Effect of norepinephrine on the outcome of septic shock. *Crit Care Med* 2000; 28 (8): 2758-65
32. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M: Early goal directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Eng J Med* 2001; 345 (19): 1368-77
33. Kortgen A, Niederprüm P, Bauer M: Implantation of an evidence-based "standard operating procedure" and outcome in septic shock. *Crit Care Med* 34 (4), 943-950, 2006
34. Kellum JA, Angus DC, Johnson JP, Leblanc M, Griffin M, Ramakrishnan N, Linde-Zwirble WT: Continuous versus intermittent renal replacement therapy: a meta-analysis. *Intensive Care Med* 2002; 28 (1): 29-37

35. Mathieu D, Neviere R, Billard V, Fleyfel M, Wattel F: Effects of bicarbonate therapy on hemodynamics and tissue oxygenation in patients with lactic acidosis: a prospective, controlled clinical study. *Crit Care Med* 1991; 19 (11): 1352-6
36. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrom Network. *N Engl J Med* 2000; 342: 1301-8
37. Martin GS, Bernard GR: Airway and lung in sepsis. *Intensive Care Med* 2001; 27 (1): 63-79
38. Gattinoni L, Tognoni G, Pesenti A, Taccone P, Mascheroni D, Labarta V, Malacrida R, Di Giulio P, Fumagalli R, Pelosi P, Brazzi L, Latini R: Effect of prone positioning on the survival of patients with acute respiratory failure. *N Eng J Med* 2001; 345 (8): 568-73
39. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troche G, Chaumet-Riffaut P, Bellissant E: Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002; 288 (7): 862-71
40. van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R.: Intensive insulin therapy in critical ill patients. *N Eng J Med* 2001; 345 (19): 1359-66
41. Artinian V, Krayem H, DiGiovine B: Effects of early feeding on the outcome of critically ill mechanically ventilated medical patients. *Chest* 2006; 129: 960-7
42. Heyland DK, Dhaliwal R, Suchner U, Berger MM: Antioxidant nutrients: a systematic review of trace elements and vitamins in the critically ill patients. *Intensive Care Med* 2005; 31 (3): 327-37
43. Angstwurm MVA, Engelmann L, Zimmermann T, Lehmann C, Spes CH, Abel P, Strauß R, Meier-Hellmann A, Insel R, Rradke J, Schüttler J, Gärtner R: Selenium in Intensive Care (SIC): Results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrom, sepsis, and septic shock. *Crit Care Med* 2007; 35 (1): 118-26
44. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, Chalupa P, Atherstone A, Péntes I, Kübler A, Knaub S, Keinecke HO, Heinrichs H, Schindel F, Juers M, Bone RC, Opal SM: High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 286: 1869-78

45. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ Jr.: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344: 699-709
46. Angus DC, Laterre PF, Helterbrand J, Ely EW, Ball DE, Garg R, Weissfeld LA, Bernard GR; for the PROWESS Investigators: The effect of drotrecogin alfa (activated) on long-term survival after severe sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32 (11): 2199-206
47. Tetta C, Bellomo R, Ronco C: Artificial Organ Treatment for Multiple Organ Failure, Acute Renal Failure and Sepsis. *Artificial Organs* 2003; 27 (3): 202-13
48. Tetta C, Bellomo R, D'Intini V, De Nitti C, Inguaggiato P, Brendolan A, Ronco C: Do circulating cytokines really matter in sepsis. *Kidney International* 2003; 63 (84): 69-71
49. Grooteman MPC, Groeneveld ABJ: A role for plasma removal during sepsis? *Intensive Care Med* 2000; 26: 493-5
50. Honore PM, Joannes-Boyau O: High volume hemofiltration (HVHF) in sepsis: A comprehensive review of rationale, clinical applicability, potential indications and recommendations for future research. *International Journal of Artificial Organs* 2004; 27 (12): 1077-82
51. Ronco C, Bellomo R, Homel P, Brendolan A, Dan M, Piccinni P, La-Greca G: Effects of different doses in continuous veno-venous haemofiltration on outcomes of acute renal failure: a prospective randomised trial. *Lancet* 2000; 356 (9223): 26-30
52. Bouman CS, Oudemans-Van Straaten HM, Tijssen JG, Zandstra DF, Kesecioglu J: Effects of early high-volume continuous venovenous hemofiltration on survival and recovery of renal function in intensive care patients with acute renal failure: a prospective, randomized trial. *Crit Care Med* 2002; 30 (10): 2205-11
53. Lameire NH, De Vriese AS: Adsorption techniques and the use of sorbents. *Contrib Nephrol* 2001; 133: 140-53
54. Ronco C, Bordon V, Levin NW: Adsorbents: from basic structure to clinical application. *Contrib Nephrol* 2002; 137: 158-64
55. De Nitti C, Giordano R, Gervasio R, Castellano G, Podio V, Sereni L, Ghezzi PM, Ronco C, Brendolan A, Inguaggiato P, Tonelli M, La Greca G, Tetta C: Choosing new adsorbents for endogenous ultrapure infusion fluid: performance, safety and flow distribution. *Int J Artif Organs* 2001; 24 (11): 765-76

56. Winchester JF, Ronco C, Salzberg J, Yousha F, Brady JA, Cowgill LD, Choquette M, Albright R, Clemmer J, Davankov V, Tsyurupa M, Pavloava L, Pavlov M, Cohen G, Hoerl W, Gotch F, Levin NW: Sorbent augmented dialysis systems. *Contrib Nephrol* 2002; 137: 170-80
57. Ash SR, Steczko J, Levy H, Blake DE, Carr DJ: Treatment of systemic inflammatory response syndrome by push-pull powered sorbent pheresis: a Phase 1 clinical trial. *Ther Apher* 2001; 5 (6): 497-505
58. Hanasawa K: Extracorporeal treatment for septic patients: new adsoption technologies and their clinical application. *Ther Apher* 2002; 6 (4): 290-5
59. Reinhart K, Meier-Hellmann A, Beale R, Forst H, Boehm D, Willatts S, Rothe KF, Adolph M, Hoffmann JE, Boehme M, Bredle DL; EASy-Study Group: Open randomized phase II trial of an extracorporeal endotoxin adsorber in suspected Gram-negative sepsis. *Crit Care Med* 2004; 32 (8): 1662-8
60. Vincent JL, Laterre PF, Cohen J, Burchardi H, Bruining H, Lerma FA, Wittebole X, DeBacker D, Brett S, Marzo D, Nakamura H, John S: A pilot-controlled study of a polymyxin B-immobilized hemoperfusion cartridge in patients with severe sepsis secondary to intra-abdominal infection. *Shock* 2005; 23 (5): 400-5
61. Zimmermann M, Busch K, Kuhn S, Zeppezauer M: Endotoxin adsorbent based on immobilized human serum albumin. *Clin Chem Lab Med* 1999; 37 (3): 373-8
62. Stegmayr BG, Banga R, Berggreen L, Norda R, Rydvall A, Vikersfors T: Plasma exchange as rescue therapy in multiple organ failure including acute renal failure. *Crit Care Med* 2003; 31: 1730-6
63. Busund R, Koukline V, Utrobin U, Nedashkovsky E: Plasmapheresis in severe sepsis and septic shock: a prospective, randomised, controlled trial. *Intensive Care Med* 2002; 28: 1434-9
64. Jauregui HO: The Technology of Biological Extracorporeal Liver Assist Devices: From Infancy to Adolescence. *Artif Organs* 1997; 21 (11): 1163-8
65. Sussman NL, Kelly JH: Improved liver function following treatment with an extracorporeal liver assist device. *Artif Organs* 1993; 17 (1): 27-9
66. Sussman NL, Kelly JH: Extracorporeal liver assist in the treatment of fulminant hepatic failure. *Blood Purif* 1993; 11 (3): 170-4
67. Sussman NL, Gislason GT, Kelly JH: Extracorporeal liver support. Application to fulminant hepatic failure. *J Clin Gastroenterol* 1994; 18 (4): 320-4

68. Kelly JH, Koussayer T, He D, Chong MG, Shang TA, Whisennand HH, Sussman NL: Assessment of an extracorporeal liver assist device in anhepatic dogs. *Artif Organs* 1992; 16 (4): 418-21
69. Millis JM, Cronin DC, Johnson R, Conjeevaram H, Brady L, Trevino S, Conlin C, Brotherton J, Traglia D, Dane G, Maguire P.: Improvement of hemodynamic parameters in fulminant hepatic failure patients with extracorporeal liver assist device (ELAD) treatment (Abstract). *Hepatology* 2000; 32 (4): 613
70. Ellis AJ, Hughes RD, Wendon JA, et al: Pilot-controlled trial of the extracorporeal liver assist device in acute liver failure. *Hepatology* 1996; 24: 1446-51
71. Sussman NL, Gislason GT, Conlin CA, Kelly JH: The hepatic extracorporeal liver assist device: initial clinical experience. *Artif Organs* 1994; 18 (5): 390-6
72. Gerlach JC: Development of a hybrid liver support system: a review. *Int J Artif Organs* 1996; 19 (11): 645-54
73. Sauer IM, Zeilinger K, Obermayer N, Pless G, Grunwald A, Pascher A, Mieder T, Roth S, Goetz M, Kardassis D, Mas A, Neuhaus P, Gerlach JC: Primary human liver cells as source for modular extracorporeal liver support-a preliminary report. *Int J Artif Organs* 2002; 25 (10): 1001-5
74. Sauer IM, Zeilinger K, Pless G, Kardassis D, Theruvath T, Pascher A, Goetz M, Neuhaus P, Gerlach JC: Extracorporeal liver support based on primary human liver cells and albumin dialysis treatment of a patient with primary graft non-function. *J Hepatology* 2003; 39: 649-53
75. Demetriou AA, Reisner A, Sanchez J, Levenson SM: Transplantation of microcarrier-attached hepatocytes into 90% partial hepatectomized rats. *Hepatology* 1988; 8: 1006-9
76. Rozga J, Williams F, Ro MS, Neuzil DF, Giorgio TD, Backfisch G, Moscioni AD, Hakim R, Demetriou AA: Development of a bioartificial liver: properties and function of a hollow-fiber module inoculated with liver cells. *Hepatology* 1993; 17 (2): 258-265
77. Rozga J, Podesta L, Le Page E, Morsiani E, Moscioni AD, Hoffman A, Sher L, Villamil F, Woolf G, McGrath M et al: A bioartificial liver to treat severe acute liver failure. *Ann Surg* 1994; 219 (5): 538-46
78. Watanabe FD, Mullon CJ, Hewitt WR, Arkadopoulos N, Kahaku E, Eguchi S, Khalili T, Arnaout W, Shackleton CR, Rozga J, Solomon B, Demetriou AA: Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure. *Ann Surg* 1997; 225 (5): 484-94

79. Stevens AC, Busuttil R, Han S: An interim analysis of a phase II/III prospective, randomized, multicenter, controlled trial of the Hepatassist bioartificial liver support system for the treatment of fulminant hepatic failure (Abstract). *Hepatology* 2001; 34 (4): 299A
80. HD Humes, DA Buffington, L Lou, S Abrishami, M Wang, J Xia, WH Fissel: Cell therapy with a tissue-engineered kidney reduces the multiple-organ consequences of septic shock. *Crit Care Med* 2003; 31(10): 2421-28
81. Humes HD, Fissel WH, Weitzel WH: Renal cell therapy in the treatment of patients with acute and chronic renal failure. *Blood Purif* 2004; 22 (1): 60-72
82. Weitzel WH, Fissel WH, Humes HD: Initial clinical experience with a human proximal tubule cell renal assist device (Abstract). *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 279A
83. Humes HD, Fissel WH, Weitzel WH: The bioartificial kidney in the treatment of acute renal failure. *Kidney Int* 2002; 61 (80): 121-5
84. Humes HD, Weitzel WF, Fissell WH: Renal cell therapy in the treatment of patients with acute and chronic renal failure. *Blood Purif* 2004; 22 (1): 60-72
85. Mitzner SR, Freytag J, Sauer M, Kleinfeldt T, Altrichter J, Klöhr S, Koball S, Stange J, Ringel B, Nebe B, Schmidt H, Podbielski A, Noeldge-Schomburg G, Schmidt R: Use of human preconditioned phagocytes for extracorporeal immune support: introduction of a concept. *Ther Apher* 2001; 5 (5): 423-32
86. Umemiya H, Kawachi E, Kagechika H, Fukasawa H, Hashimoto Y, Shudo K: Synergists retinoid in cellular differentiation of human promyelocytic leukemia cells HL-60. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1995; 43 (10): 1827-9
87. Makishima M, Umesono K, Shudo K, Naoe T, Kishi K, Honma Y: Induction of differentiation in acute promyelocytic leukemia cells by cis retinoic acid alpha-tocopherol ester (9-cis tretinoin tocoferil). *Blood* 1998; 91 (12): 4715-26
88. Biesalski HK, Schaffer M: Comparative assesment of the activity of beta-carotene, retinoyl-beta-D-glucuronide and retinoic acid on growth and differentiation of a human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Int J Vitam Nutr Res* 1997; 67 (5): 357-63
89. Kizaki K, Naito S, Horie S, Ishii H, Kazama M: Different Thrombomodulin Induction in Monocytic, Macrophagic and Neutrophilic Cells Differentiated From HL-60 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1993; 193 (1): 175-81
90. Turley JM, Sanders BG, Kline K: RRR-alpha-tocopheryl succinate modulation of human promyelocytic leukemia (HL-60) cell proliferation and differentiation. *Nutr Cancer* 1992; 18 (3): 201-13

91. Laouar A, Wietzerbin J, Bauvois B: Divergent Regulation of Cell Surface Protease Expression in HL-60 Cells Differentiated into Macrophages with Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor or Neutrophils with Retinoic Acid. *International Immunology* 1993; 5 (8): 965-973
92. Brackman D, Lund-Johansen F, Aarshog D: Expression of Cell Surface Antigens During the Differentiation of HL-60 Cells induced by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃, Retinoic Acid and DMSO. *Leukemia Research* 1995; 19: 57-64
93. Russo J, Barnes A, Berger K, Desgrosellier J, Henderson J, Kanters A, Merkov L: 4-(N,N-dipropylamino) benzaldehyde inhibits the oxidation of all-trans retinal to all-trans retinoic acid by ALDH1A1, but not the differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells exposed to all-trans-retinal. *BMC Pharmacology* 2002; 2: 4-6
94. Seeliger HPR: Taschenbuch der medizinischen Bakteriologie. Johann Ambrosius Barth Verlag Leipzig, 1978
95. Brandis H, Köhler W, Eggers HJ, Pulverer G: Medizinische Mikrobiologie. 7. Auflage. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York, 1994 (ISBN: 3-437-00743-2)
96. Ammons WS, Kohn FR, Kung AH: Protective effects of a N-terminal fragment of bactericidal/permeability-increasing protein in rodent model of gram-negative sepsis: role of bactericidal properties. *J Infect Dis* 1994; 170 (6): 1473-82
97. Cross AS, Opal SM, Sadoff JC, Gemski P: Choice of Bacteria in Animal Models of Sepsis. *Infection and Immunity* 1993; 61 (7): 2741-47
98. Ash SR: Extracorporeal blood detoxification by sorbents in treatment of hepatic encephalopathy. *Adv Ren Replace Ther* 2002; 9 (1): 3-18
99. Miwa M, Shinzato T: Push/pull hemodiafiltration: technical aspects and clinical effectiveness. *Artif Organs* 1999; 23 (12): 1123-6
100. Kawabata K, Nakai S, Miwa M, Sugiura T, Otsuka Y, Shinzato T, Hiki Y, Tomina I, Ushida Y, Hosono F, Maeda K: Changes in Mac-1 and CD14 expression on monocytes and serum soluble CD14 level during push/pull hemodiafiltration. *Nephron* 2002; 90 (3): 273-81
101. Aigner A, Neumann S: Immunchemie: Grundlagen, Anwendungen, Perspektiven. Fischer Verlag, 1997 (ISBN: 3-437-25220-8)
102. Mills EN, Plumb GW, Morgan MR: ELISA Detection of Foreign Proteins. *Meth Mol Biol* 1995; 49: 439-51
103. Leonard R, Ruben Z: Hematology Reference Values for Peripheral Blood of Laboratory Rats. *Laboratory Animal Science* 1986; 36 (3): 277-81

104. Wolford ST, Schroer RA, Gohs FX, Gallo PP, Brodeck M, Falk HB, Ruhren R: Reference data base from serum chemistry and haematology values in laboratory animals. *J Toxicol Environ Health* 1986; 18: 161-88
105. Thomas LLM et al: Quantitative chromogenic endotoxin determination in cerebrospinal fluid. *Clin Chim Acta* 1983; 127: 137
106. Dune`r K: A new kinetic single stage Limulus amebocyte lysate method for the detection of endotoxin in water and plasma. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 1993; 26: 131-42
107. Woltmann A, Lebeau A, Staubach KH, Schade FU, Arnholdt H, Bruch HP: Histomorphological Changes of Organs, in Particular the Liver, in a Study of Endotoxin Tolerance in an Animal Model. *Eur Surg Res* 1994; 26: 353-61
108. Greaves P and Faccini JM: Rat Histopathology. ELSEVIER Verlag Amsterdam London New York Tokyo, 2. Auflage, 1992 (ISBN: 0-444-88361-4)
109. Kroes R, Garbis-Berkvens JM, de Vries T, van Nesselrooy JHJ: Histopathological Profile of a Wistar Rat Stock Including a Survey of the Literature. *Journal of Gerontology* 1981; 36 (3): 259-79
110. Fritz H, Grauwlir J, Hummler H, Lindt S, Schon H: Collection of control data from teratological experiments on mice, rats and rabbits. *Drug Research* 1978; 28: 1410-13
111. Abraham E: Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Medicine* 1999; 25: 556-66
112. Teplick R, Rubin R: Therapy of sepsis: why have we made such little progress? *Crit Care Med* 1999; 27 (8): 1682-3
113. Kellum JA: Immunomodulation in sepsis: the role of hemofiltration. *Minerva Anesthesiol* 1999; 65 (6): 410-8
114. Dellinger RP: Severe sepsis trials: why have they failed? *Minerva Anesthesiol* 1999; 65 (6): 340-5
115. Dellinger RP: Current therapy for sepsis. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 13 (2): 495-509
116. Opal SM, Cross AS: Clinical trials for severe sepsis. Past failures, and future hopes. *Infect Dis Clin North Am* 1999; 3 (2): 285-97
117. Nasraway SA: Sepsis research: we must change course. *Crit Care Med* 1999; 27 (2): 427-30

118. Nasraway SA: The problems and challenges of immunotherapy in sepsis. *Chest* 2003; 123 (5): 451-9
119. Döcke WD, Randow F, Syrbe U, Krausch D, Asadullah K, Reinke P, Volk HD, Kox W: Monocyte deactivation in septic patients: restoration by IFN-gamma treatment. *Nat Med* 1997; 3 (6): 678-81
120. Liles WC: Immunomodulatory approaches to augment phagocyte-mediated host defense for treatment of infectious diseases. *Semin Respir Infect* 2001; 16: 11-7
121. Flohé S, Lendemans S, Selbach C, Waydhas C, Ackermann M, Schade FU, Kreuzfelder E: Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the immune response of circulating monocytes after severe trauma. *Crit Care Med* 2003; 31: 2462-9
122. Carr R, Modi N, Dore C: G-CSF and GM-CSF for treating or preventing neonatal infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 3: CD003066
123. Napolitano LM: Immune stimulation in sepsis: to be or not to be? *Chest* 2005; 127: 1882-5
124. Moraes TJ, Zurawska JH, Downey GP: Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr Opin Hematol* 2006; 13: 21-7
125. Hoesel LM, Neff TA, Neff SB, Younger JG, Olle EW, Gao H, Pianko MJ, Bernacki KD, Sarma JV, Ward PA: Harmful and protective roles of neutrophils in sepsis. *Shock* 2005; 24: 40-7
126. Scholz M, Cinatl J, Schadel-Hopfner M, Windolf J: Neutrophils and the blood-brain barrier dysfunction after trauma. *Med Res Rev* 2007; 27: 401-16
127. Stanworth SJ, Massey E, Hyde C, Brunskill S, Lucas G, Navarrete C, Marks DI: Granulocyte transfusions for treating infections in patients with neutropenia or neutrophil dysfunction. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; 3: CD005339
128. Mohan P, Brocklehurst P: Granulocyte transfusions for neonates with confirmed or suspected sepsis and neutropaenia. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; 4: CD003956
129. Taylor RW, O'Brien J, Trottier SJ, Manganaro L, Cytron M, Lesko MF, Arnzen K, Cappadoro C, Fu M, Plisco MS, Sadaka FG, Veremakis C: Red blood cell transfusions and nosocomial infections in critically ill patients. *Crit Care Med* 2006; 34: 2302-8
130. Sauer M, Altrichter J, Kreutzer HD, Nöldge-Schomburg G, Schmidt R, Mitzner SR: Extracorporeal cell therapy with granulocytes in a pig model of Gram-positive sepsis. *Crit Care Med* 2008; eingereicht

9. Thesen

Die Phagozytose, eine Endozytose von Antigen, ist ein grundlegender Faktor für die körpereigene Abwehr.

Einschränkungen der Phagozytose führen zu einem erhöhten Risiko für Infektionen und zu schweren Verläufen von Infektionskrankheiten.

Bei Sepsiskranken kommt es zu einer Dysregulation des Immunsystems mit konsekutiver Einschränkung der Phagozytose.

Die Sepsis zählt zu den Haupttodesursachen der westlichen Welt mit ansteigender Inzidenz. Die Letalität der Sepsis liegt zwischen 29 und 35%, im septischen Schock sogar bei 60%.

Das Sozialwesen der Bundesrepublik Deutschland wird durch sehr hohe direkte und indirekte Kosten in Höhe von 3,6 bis 7,9 Milliarden Euro jährlich durch Sepsiskranke belastet.

Bei der Sepsis kommt es zu einer generalisierten inflammatorischen Antwort des Organismus auf eine zunächst lokal nur begrenzte Infektion, die bis zum Multiorganversagen führen kann. Dysregulationen des Immunsystems, Hypoperfusion von Organen, Ausbreitung der Keime und Beeinträchtigung der Endothelzellfunktion sind wesentliche pathophysiologische Kennzeichen der Sepsis.

Die Therapie der Sepsis erbringt trotz wesentlicher Fortschritte, vor allem im Bereich der symptomatischen Therapie, unbefriedigende Ergebnisse.

Hoffnungsvolle neue Therapieansätze sind einerseits Agentien, die der Verbrauchskoagulopathie bei Sepsiskranken entgegenwirken und antiinflammatorisch wirken (z.B. aktiviertes Protein C) und andererseits extrakorporale Verfahren, die phagozytosepflichtiges Material (Antigen) und Sepsismediatoren abreichern wie z.B. der Plasmaaustausch.

In der vorliegenden Promotion wird die prinzipielle Eignung einer Promyelozytenzelllinie (HL-60) für den Einsatz in einem bioartifiziellen extrakorporalen Immununterstützungssystem untersucht.

Die mit Vitamin-A-Säure in die granulozytäre Richtung differenzierte Zellen sollen in einem späteren Plasmaperfusionsmodell einerseits phagozytosepflichtiges Material bei Sepsispatienten abreichern und andererseits durch selektive Abreicherung oder Freisetzung von Zytokinen und Sepsismediatoren der Dysregulation des Patientenimmunsystems entgegenwirken.

Dazu wurde in der vorliegenden Promotionsarbeit geprüft, ob die granulozytären Zellen zur Abreicherung von lebenden Bakterien (*E. coli*) in der Lage sind und ob und in welcher Größenordnung sie Zytokine freisetzen. Weiterhin sollte ein elektronenmikroskopischer Nachweis der Bakterienphagozytose durch die Zellen erbracht werden.

Im zweiten Teil der Dissertationsarbeit sollte die prinzipielle Verträglichkeit und Wirksamkeit einer extrakorporalen Phagozytoseunterstützung mit den granulozytären Zellen in einem ex vivo Nager-Modell der Gram negativen Sepsis nachgewiesen werden.

Die mit Vitamin-A-Säure in die granulozytäre Richtung differenzierte Promyelozytenzelllinie (HL-60) reicherte zuverlässig *E. coli* O7:K1 in einem standardisiertem Phagozytoseexperiment ab. Dabei wurden die Bakterien opsoniert und die Bakterien Zell Kontaktzeit betrug 20 Minuten. Die Phagozytoseraten lagen dabei zwischen 40 und 99%.

Um Bakterien und Zellen zuverlässig nach 20 Minuten Kontaktzeit von einander zu trennen, mussten sie nach dem Phagozytoseexperiment filtriert werden. Dabei erwies sich ein 5-Mikrometer-Porenfilter aus Cellulosenitrat als Einmalfiltrationseinheit als geeignet, um zuverlässig die Zellen zurückzuhalten, aber für die Bakterien vollständig permeabel zu sein.

Die Freisetzung von IL-1 β , TNF- α und IL-6 wurde im Überstand vom standardisiertem Phagozytoseexperiment mit einer Bakterien Zell Kontaktzeit von 20 Minuten durch ELISA-Technik mit polyklonalen Antikörpern bestimmt. Dabei wurde nur IL-1 β von den stimulierten Zellen freigesetzt (197 pg/ml). Nach Literaturangaben wären bei längerer Kontaktzeit sicherlich auch IL-6 und TNF- α freigesetzt worden.

Die Freisetzung von Zytokinen durch die HL-60 Zellen kann bei einer späteren extrakorporalen Behandlung am Menschen sowohl schädliche als auch nützliche Effekte bewirken, je nachdem in welchem Immunstatus der Patient sich gerade befindet.

Die Kontaktzeit von 20 Minuten zwischen Zellen und Bakterien wurde unter der Vorstellung gewählt, dass zwei ml Patientenplasma, bezogen auf das Gesamtvolumen des Patientenplasmas, ca. 20 Minuten Kontakt mit den Zellen im späteren Bioreaktor im Plasmaperfusionsmodell bei einer sechs bis acht-stündigen Behandlungszeit haben würde. Im standardisierten Phagozytoseexperiment betrug das Probenvolumen stets zwei ml.

E. coli O7:K1 und die granulozytären Zellen wurden für 5, 15 und 45 Minuten inkubiert und danach Proben für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitet. Dabei konnte sowohl rasterelektronenmikroskopisch als auch transmissionselektronenmikroskopisch der Nachweis der Adhäsion der Bakterien an die Zellen erbracht werden. Nach 15 Minuten Kontaktzeit gelang die intrazellulären Aufnahme von E. coli in die Zelle (Bildung eines Phagosomes) durch eine transmissionselektronenmikroskopisches Bild zu zeigen.

In einem ex vivo Ratten-Modell der Gram negativen Sepsis sollte die prinzipielle Verträglichkeit und Wirksamkeit einer extrakorporalen Phagozytoseunterstützung mit den granulozytären Zellen nachgewiesen werden.

Dazu erhielten acht Ratten eine LD-90 Dosis von lebenden E. coli O7:K1 i.v. (Unbehandelte Gruppe). Weiteren acht Tieren wurden die Bakterien gemeinsam mit Zellkulturüberstand nach einer Vorbehandlung, die dem standardisierten Phagozytosexperiment entsprach, injiziert (Behandelte Gruppe). Den Tieren der Kontrollgruppe (n 9) wurde isotonische Kochsalzlösung i.v. gegeben. Die Beobachtungszeit betrug sieben Tage.

Im Ratten Sepsis Modell konnte die Verträglichkeit dieser zellbasierten Immununterstützung gezeigt werden. Die mit den granulozytären Zellen vorbehandelten Inokulums beimften Tiere (Behandelte Gruppe) hatte im Vergleich zu den nicht mit Zellen vorbehandelten Tieren (Unbehandelte Gruppe) einen signifikanten Überlebensvorteil.

Die Kontrollgruppe, der keine Bakterien injiziert wurde, die aber das gesamte experimentelle Procedere ertragen musste, zeigte eine für dieses sehr invasive Experiment (z.B. häufige Blutentnahmen, dauerhafter arterieller und venöser Katheter) eine gute Verträglichkeit des Experimentes an sich an.

Hauptparameter des Tierexperimentes war das Überleben. Die Tiere der Behandelten Gruppe überlebten statistisch signifikant länger als die Tiere der Unbehandelten Gruppe ($p < 0.001$, Log-Rank-Test). In der Kontrollgruppe verstarb ein Tier am Tag fünf an einer klinisch wie histologisch diagnostizierten Lungenembolie, in der Behandelten Gruppe verstarben nur zwei Tiere und in der Unbehandelten Gruppe alle Tiere.

Die Bakterienzahl im Blut nach 24 Stunden war statistisch signifikant niedriger in der Behandelten Gruppe, als in der Unbehandelten Gruppe. Im Blut der Kontrolltiere waren keine Bakterien nachweisbar.

Die Endotoxinwerte im Blut der Versuchstiere nach zwei und 24 Stunden waren bei der Behandelten Gruppe statistisch signifikant niedriger als in der Unbehandelten Gruppe. Dabei zeigte die Behandelte Gruppe eine fallende Tendenz, die Unbehandelte Gruppe aber eine deutlich steigende Tendenz der Gruppenmittelwerte. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe lagen zu beiden Messzeitpunkten um die 0,5 ng/ml in einem sehr niedrigen Bereich.

IL-6 war im Blut der Ratten nach sechs Stunden der Inokulation der lebenden Bakterien bei allen drei Versuchsgruppen nicht nachweisbar. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu Literaturangaben, bei denen nach sechs Stunden IL-6 im Blut von Ratten zu finden war.

Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurde nach zwei, sechs und 24 Stunden kein TNF- α gefunden. Die Gruppenmittelwerte waren zu den Zeitpunkten zwei und sechs Stunden in der Behandelten Gruppe deutlich niedriger, als in der Unbehandelten Gruppe.

Zum Messzeitpunkt 24 Stunden war bei den Ratten der Behandelten Gruppe kein TNF- α mehr nachweisbar. In der Unbehandelten Gruppe kam es aber im Vergleich zum sechs Stunden-Wert zu einem ca. zehnfachen Anstieg, der gemeinsam mit den Werten der Endotoxinmessung mit ebenfalls steigender Tendenz nur in dieser Gruppe als eine Second-Hit Reaktion einzig in der Unbehandelten Gruppe interpretiert werden könnte.

Bei den Parametern Gewichtsverlauf, Temperatur, Blutbild und Differentialblutbild, hämodynamischen Parametern wie Herzfrequenz und mittlerer arterieller Druck und den Blutgasparametern hatten die Behandelte Gruppe und Kontrollgruppe bessere Werte im Verlauf als die Unbehandelte Gruppe und zeigten damit eine bessere Krankheitsbewältigung bzw. Verträglichkeit im Experiment.

Nach sieben Tagen Beobachtungszeit oder Ableben der Tiere wurden Proben von Herz, Pankreas, Lunge, Niere, Leber und Milz zur histologischen Aufarbeitung entnommen, Schnitte angefertigt und diese mit Hämalaun-Eosin gefärbt.

In allen drei Testgruppen ließen sich teilweise erhebliche zirkulatorische, am ehesten schockassoziierte pathomorphologische Organveränderungen nachweisen, die in der Summe bei der Kontrollgruppe und Behandelten Gruppe ausgeprägter waren als in der Unbehandelten Gruppe. Diese Befunde sind in erster Linie assoziiert zu einer längeren Überlebensdauer der Behandelten Gruppe und Kontrollgruppe.

Die Tiere der Behandelten Gruppe zeigten dabei häufiger als die Tiere anderer Versuchsgruppen Zeichen der Regeneration und Immunstimulation in Leber und Milz.

Ein extrakorporales bioartifizielles Immununterstützungssystem durch einen Phagozytenbioreaktor könnte hilfreich für die Behandlung von Patienten mit einer schweren Sepsis und septischen Schock sein, da bei diesen Patienten eine teilweise schwere Unter- bzw. Dysfunktion der Mikro- und Makrophagen vorliegt.

In den zurückliegenden Jahren gab es viele immunmodulatorische Therapieansätze, die selektiv einen Sepsismediator (z.B. TNF-alpha, Endotoxin) als „Hauptschuldigen“ blockieren, bzw. entfernen wollten. Spätestens in der Phase III-Studie erwiesen sich aber alle Ansätze als nicht geeignet, die Überlebenschancen von Sepsispatienten zu verbessern.

Ein Vorteil eines extrakorporalen Immununterstützungssystems durch einen Phagozytenbioreaktor besteht durch die nichtselektive Entfernung von Sepsismediatoren wie phagozytosepflichtiges Material und die ganzheitliche immunmodulatorische Beeinflussung des Immunsystems des Patienten durch die Zellen im Phagozytosebioreaktor.

Dass eine nichtselektive Eliminierung von Sepsismediatoren hoffnungsvolle Resultate erbringen kann, zeigen u.a. die beiden größten Studien über Therapeutischen Plasmaaustausch bei Patienten im septischen Schock oder mit einer schweren Sepsis von Stegmayr und Busund (2003 und 2002).

Auf dem Gebiet der extrakorporalen bioartifiziellen (zellbasierte) Immununterstützungssysteme, gibt es nur unserem Ansatz. Die Therapien von Leberversagen und Nierenversagen (im Rahmen eines Multiorganversagens) durch zellbasierte Systeme sind durch andere Arbeitsgruppen etabliert.

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe sowie nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der genannten Fakultät zur Eröffnung des Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

Rostock, im Februar 2008

Martin Sauer

11. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. Steffen Mitzner möchte ich für die Vergabe des Dissertationsthemas danken.

Als Betreuer stand mir Herr Professor S. Mitzner, als Leiter des Forschungslabores Detoxikation hilfreich zur Seite. Frau Christa Grewe und Frau Rottraut Krause haben mir als MTA's immer zuverlässig zugearbeitet und mich bei der Durchführung der Experimente tatkräftig unterstützt.

Von seitens der Mikrobiologie erhielt ich Hilfestellungen und Rat von Frau Professor Dr. Schmidt, Herrn Dr. R. Fislage und den MTA's Frau Humboldt, Frau Wendt, Frau Becziczka, Frau Rehbock, Frau Schumann und vielen anderen.

Zu besonderen Dank bin ich Frau Kathrin Sievert vom Experimentellen Forschungszentrum / Tierhaus verpflichtet. An der Durchführung der Tierexperimente hatte sie einen maßgeblichen Anteil.

Die histologischen Aufarbeitung und Befundung von Gewebeproben der Tierexperimente oblag Herrn Dr. H. Kreutzer vom Institut für Pathologie (Direktor: Herr Prof. Dr. Nitze).

Ebenfalls zu Dank bin ich dem Elektronenmikroskopischen Zentrum der Medizinischen Fakultät Rostock zur Vorbereitung und Hilfe bei der Durchführung der elektronenmikroskopisch Untersuchungen verpflichtet (Leiter: Herr Prof. Dr. Jonas).

Zuletzt, aber nicht weniger wichtig, möchte ich meiner Familie und Frau Kathrin Chinnow für Ihre Unterstützung in vielerlei Hinsicht danken.

12. Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Martin Sauer
Geburtstag und ort: 21.08.1972, Nauen
Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung

- 1979 bis 1989 Besuch der Polytechnischen Oberschule in Magdeburg, die letzten 6 Jahre in Wernigerode/Harz mit erfolgreicher Absolvierung der Abschlußprüfung
- 1989 bis 1991 Besuch der Erweiterten Polytechnischen Oberschule in Wernigerode/Harz mit Erlangung der Hochschulreife (Abitur)

Zivildienst und Arbeit als Krankenpflegehelfer

- 09/1991 11/1992 Zivildienst in einer Nachsorgeeinrichtung für Suchtkranke in Elbingerode/Harz
- 12/1992 09/1993 Arbeit als Krankenpflegehelfer im Krankenhaus Elbingerode, Innere Abteilung

Studium und Arbeit

- 1993-2000: Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
- Oktober 2000: Absolvierung des 3. Staatsexamen
- 11/2000 04/2001: drittmittelfinanzierte Arzt im Praktikum Stelle im Forschungslabor Detoxikation der Abteilung für Nephrologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der Universität Rostock
- 05/2001 04/2002: Arzt im Praktikum an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der Universität Rostock, Abteilung für Kardiologie
- seit 07/2002 Assistenzarzt an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universität Rostock

Forschungsaktivitäten

- 1989–1991 im Rahmen der „Wissenschaftlich-Praktischen Arbeit“ in der 11./12. Klasse am ehemaligen Institut für Experimentelle Epidemiologie Wernigerode, jetzt Robert-Koch-Institut Berlin, Außenstelle Wernigerode Anfertigung einer Abschlusssarbeit über das Thema „Vorhersagewert der bakteriologischen Diagnostik bei Osteosyntheseinfektionen“
- seit 1994 als Doktorand und seit 1998 als Mitarbeiter im Forschungslabor Detoxikation der Abteilung für Nephrologie der Klinik für Innere Medizin der Universität Rostock tätig
- Themen der wissenschaftlichen Beschäftigung sind der Aufbau, die Erprobung in Tiermodellen und Durchführung von klinischen Studien eines extrakorporalen bioartifiziellen Phagozytoseunterstützungssystems und die Entwicklung von Biosensoren zur Therapie und Diagnostik bei Sepsiskranken
- seit 1998 Veröffentlichungen, Vorträge, Preise, Patente zu den oben genannten Themen

Rostock, im Februar 2008

Martin Sauer