

Die Rolle von Interleukin-12 und Interleukin-18 bei bakterieller  
Peritonitis in dem Mausmodell „Colon-ascendens-Stent-Peritonitis“  
(CASP)

**Markus Jörg Michael Entleutner**

Chirurgische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. J.R. Siewert)

Die Rolle von Interleukin-12 und Interleukin-18 bei bakterieller  
Peritonitis in dem Mausmodell „Colon-ascendens-Stent-Peritonitis“  
(CASP)

**Markus Jörg Michael Entleutner**

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

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.- Prof. Dr. C.- D. Heidecke (Ernst-Moritz-Arndt  
Universität Greifswald)

2. Univ.- Prof. Dr. J. R. Siewert

Die Dissertation wurde am 10.09.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 13.02.2002 angenommen

Meinen Eltern  
Waltraud und Dr. Sigmund Entleutner  
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

<b>1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>3</b>	<b>Immunologische Grundlagen und Fragestellung der Arbeit</b>	<b>8</b>
<b>3.1</b>	<b>Wissenschaftliche Grundlagen: Sepsis, akute Infektion</b>	<b>8</b>
3.1.1	Pathophysiologie von Inflammation, Sepsis, SIRS, MOD	8
3.1.2	Reaktionen des Immunsystems auf bakterielle Infektionen	9
3.1.2.1	Reaktion von Makrophagen auf bakterielle Infektionen	9
3.1.2.2	Die Rolle von IL-18 und IL-12	10
3.1.2.3	Die Funktion von Chemokinen	12
3.1.3	Tiermodelle	13
3.1.3.1	Intravenöse Injektion von Endotoxin oder TNF- $\alpha$	13
3.1.3.2	Injektionsmodell mit Bakterien	14
3.1.3.3	Zökum-Ligatur-Punktion (CLP)	15
3.1.3.4	Colon-Ascendens-Stent-Peritonitis (CASP)	15
<b>3.2</b>	<b>Fragestellung vorliegender Arbeit</b>	<b>17</b>
3.2.1	Phänotyp der IL-12 defizienten Maus	17
3.2.2	Phänotyp der anti-IL-18 behandelten Maus	17
<b>4</b>	<b>Zielsetzung und Methodik</b>	<b>18</b>
<b>4.1</b>	<b>wissenschaftliche Grundlagen der Versuche</b>	<b>18</b>
<b>4.2</b>	<b>Methodik in vivo</b>	<b>19</b>
4.2.1	Genehmigung der Tierversuche	19
4.2.2	Tiere und Tierhaltung	19
4.2.3	Tiermodell : Colon-Ascendens-Stent-Peritonitis (CASP)	20
4.2.3.1	Anästhesie	20
4.2.3.2	Operationen	21
4.2.3.3	Postoperatives Vorgehen	25
4.2.3.4	Die Überlebenskinetik	25
4.2.3.5	Organentnahme	27
<b>4.3</b>	<b>Methodik in vitro</b>	<b>28</b>
4.3.1	Histologische Arbeiten	28
4.3.1.1	Anfertigen von histologischen Schnittpräparaten	28
4.3.1.2	Immunhistologische Färbungen	28
4.3.2	Extraktion der gesamtzellulären RNS aus Gewebe	29
4.3.2.1	Durchführung	29
4.3.2.2	Lösungen und Puffer	30
4.3.3	RNase-Protektion-Essay	30
4.3.3.1	Durchführung	31
4.3.3.2	Reagentien und Geräte	32
4.3.4	Bakteriologische Untersuchungen	33
<b>4.4</b>	<b>Gruppeneinteilung</b>	<b>34</b>
<b>4.5</b>	<b>Statistik</b>	<b>34</b>
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
<b>5.1</b>	<b>Grundlegende Ergebnisse aus Versuchen mit IFN-<math>\gamma</math> Rezeptor-defizienten Mäusen</b>	<b>35</b>
<b>5.2</b>	<b>Auswirkungen des IL-12 Defekts</b>	<b>36</b>
5.2.1	Auswirkungen des IL-12 Defekts auf das Überleben nach CASP	36
5.2.2	Bakterielle Besiedelung von Leber, Lunge und Peritonealhöhle nach 16G-CASP Operation	37
5.2.3	Immunhistologische Färbung von Lebergewebe mit Mac-1	38

5.2.4	Immunhistologische Färbung der Lungengewebe mit Mac-1	39
5.2.5	Zytokin- und Chemokinexpression (RNase-Protektion-Essay)	41
5.2.5.1	Zytokininduktion in der Leber	41
5.2.5.2	Chemokininduktion in der Leber	42
5.2.5.3	Zytokininduktion in der Milz	43
5.2.5.4	Chemokininduktion in der Milz	44
5.2.5.5	Zytokininduktion in der Lunge	45
5.2.5.6	Chemokininduktion in der Lunge	47
5.2.5.7	Zytokininduktion in der Niere	48
<b>5.3</b>	<b>Auswirkungen von Antikörpern gegen IL-18</b>	<b>49</b>
5.3.1	Auswirkungen von polyklonalen Antikörpern gegen IL-18 auf das Überleben nach CASP	49
5.3.2	Bakterielle Besiedelung von Leber, Lunge, Milz und Peritonealhöhle nach CASP Operation	50
5.3.3	Zytokin- und Chemokinexpression (RNase-Protektion-Essay)	51
5.3.3.1	Zytokininduktion in der Leber	51
5.3.3.2	Chemokininduktion in der Leber	53
5.3.3.3	Zytokininduktion in der Lunge	54
5.3.3.4	Chemokininduktion in der Lunge	55
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b>	<b>67</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>68</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>69</b>

## 1 Abkürzungsverzeichnis

IL-1 bis 13	Interleukin- 1 bis 13
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
IL-12 -/-	Interleukin-12 defizienter Mausstamm
aIL-18	Maus, die mit polyklonalem Antikörper gegen Interleukin-18 behandelt wurde
TGF- $\beta$	Transforming-Groth-Factor-beta
LPS	Lipopolysaccharid (Bestandteil gramnegativer Bakterien)
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
MOD	Multi Organ Disorder Syndrom
INOS	Induzierbare Stickstoffmonoxid Synthetase
NO	Stickstoffmonoxid
GM-CSF	Granulozyte-Macrophage-Colony-Stimulating-Factor
ICE	Interleukin-1 Converting Enzyme
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
IP-10	Interferon-gamma inducible Protein 10
Mip-1 $\alpha$	Makrophage Inflammatory Protein 1 alfa
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrosefaktor alfa
CLP	Caecum-Ligatur-Punktion
CASP	Colon-Ascendens-Stent-Peritonitis
C57B6	C57 Black 6-Maus (Wildtyp)
KBE	Kolonie bildende Einheiten
GTP	Guanidintriphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CTP	Cytosintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat
P <sup>33</sup>	Phosphor 33 ( $\alpha$ -Strahler)
RPA	RNase Protektion Essay

## 2 Einleitung

Trotz größter chirurgischer und intensivmedizinischer Bemühungen bleibt die postoperative bakterielle Peritonitis eine schwer beherrschbare Komplikation nach abdominalchirurgischen Eingriffen. Sie führt häufig zu systemischer Infektion, septischem Schock und Multiorganversagen, das in vielen Fällen den Tod des Patienten herbeiführt. Für diese Beobachtung gibt es zur Zeit zwei unterschiedliche pathophysiologische Erklärungsmodelle: Das eine Modell sieht septischen Schock als Folge eines massiven Bakterienwachstums im Körper, das den Zusammenbruch des Immunsystems zur Folge hat. Das andere Modell hingegen geht von einer übersteigerten Immunantwort aus, bei der das Immunsystem auf Pathogene mit einer massiven Freisetzung von Entzündungsmediatoren reagiert und so den Körper selbst schädigt.

Zur Zeit basiert die Therapie der bakteriellen Peritonitis nach chirurgischen Eingriffen auf einer primär chirurgischen Sanierung des septischen Fokus unter antibiotischer Abdeckung und begleitender intensivmedizinischer Therapie der sekundären Organdysfunktionen(4, 78).

Der aktuelle Therapieansatz berücksichtigt in erster Linie das den Organismus schädigende Pathogen, das Bakterium, dessen Beseitigung als das wichtigste Ziel der Therapie anzusehen ist(78). Unberücksichtigt bis heute ist, daß das Krankheitsbild „Sepsis“ nur zu einem Teil durch die schädigenden Einflüsse des Bakteriums, zum anderen Teil aber auch durch die Wirkungen körpereigener Entzündungsmediatoren wie  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $IL-1$  und  $IL-6$  charakterisiert wird, die oft in einem viel größeren Umfang zu Gewebsveränderungen führen, als das Bakterium(14, 78). Dies könnte ein Grund dafür sein, daß es in den letzten drei Jahrzehnten nicht gelungen ist, die Mortalität septischer Patienten auf Intensivstationen deutlich zu senken. Es stellt sich die Frage, welche Faktoren septisches Geschehen begünstigen. Ist der alleinige Grund eine Freisetzung von Bakterien, oder muß eine individuelle Disposition, eine veränderte Immunitätslage nach Operationen oder Trauma hinzukommen, damit aus einer lokal begrenzten Infektion eine Sepsis entsteht?

Es ist erwiesen, daß große chirurgische Eingriffe oder Traumatisierung die Reaktionen des Immunsystems so verändern, daß die Entstehung von septischen Komplikationen begünstigt wird(20, 28).

Aber auch schon im Vorfeld von Operationen muß davon ausgegangen werden, daß gewisse Patienten aus immunologischer Sicht gefährdeter sind, eine Sepsis zu entwickeln, als andere.

So haben z. B. Patienten, deren Monozyten präoperativ unterdurchschnittlich viel IL-12 nach Stimulierung mit LPS sezernieren, ein erhöhtes Risiko, nach dem Eingriff septische Komplikationen zu entwickeln(29). Trotz großer wissenschaftlicher Bemühungen ist es bis heute sehr problematisch, für einen Patienten eine Vorhersage zu treffen, inwieweit bei ihm eine Gefährdung für postoperative septische Verläufe vorliegt. Mit den klassischen Therapieansätzen, Chirurgie und Intensivmedizin, ist es bisher nicht gelungen, die Mortalität von Patienten mit schwerer Sepsis in den letzten 30 Jahren deutlich zu senken. Ziel der Forschung ist es, bei Patienten präoperativ eine Disposition zur Sepsis feststellen zu können, sie vor großen Operationen immunmodulatorisch zu behandeln und durch striktes postoperatives Monitoring das Risiko des Auftretens von septischen Komplikationen zu senken(77).

Voraussetzung hierfür ist, daß man sowohl die Mechanismen sehr genau kennt, die während entzündlichen Prozessen in einem Organismus ablaufen, als auch die Parameter, die es gilt zu erfassen, um septische Entgleisungen möglichst frühzeitig zu erkennen. Auf diesem Gebiet gibt es bis heute sehr wenige Erkenntnisse, die Einzug in die klinische Behandlung von Patienten gefunden haben.



## 3 Immunologische Grundlagen und Fragestellung der Arbeit

### 3.1 Wissenschaftliche Grundlagen: Sepsis, akute Infektion

#### 3.1.1 Pathophysiologie von Inflammation, Sepsis, SIRS, MOD

Für die Abwehr von Infektion und Gewebszerstörung stehen dem Körper unspezifische Systeme und antikörperspezifische Abwehrsysteme zur Verfügung. Zur akuten Entzündung kommt es in erster Linie durch mechanische, chemische oder mikrobielle Einflüsse. Die Entzündungsreaktion ist ein sich selbst verstärkendes Geschehen, das mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren, sog. Zytokinen einhergeht(64). Es besteht normalerweise im Körper eine Balance zwischen proinflammatorischen (IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) und antiinflammatorischen Zytokinen(IL-10, TGF- $\beta$ ). Gerät dieses sensible Gleichgewicht außer Kontrolle, kann dies sowohl zu einer Überreaktion des Körpers mit der Folge eines Schocks, oder aber zu einer Immunschwäche führen. Beide Fälle werden beim Krankheitsbild „Sepsis“ beobachtet(2). Die Entzündungsreaktion besteht aus einem Zusammenwirken des Komplement- und Kininsystems, Gerinnung und Fibrinolyse und der Aktivierung von immunkompetenten Zellen. Solange das entzündliche Geschehen lokalisiert bleibt, ist es für den Gesamtorganismus von Vorteil. Basierend auf Vasodilatation, erhöhtem Blutfluß und erhöhter Kapillarpermeabilität, Folgen einer Freisetzung von TNF- $\alpha$ , führt Entzündung am Ort ihres Auftretens zu den bekannten Symptomen: Rubor, Calor, Dolor und Tumor. Dieser Zustand bietet dem Gewebe durch Überangebot von Sauerstoff, aktivierenden Zytokinen und immunkompetenten Zellen bessere Möglichkeiten, vorhandene Pathogene zu bekämpfen und die Wundheilung einzuleiten(64).

Gelingt es nicht, das Pathogen in adäquater Weise zu bekämpfen, werden die einstmals protektiven Zytokine systemisch freigesetzt. Das Schlüsselzytokin an dieser Stelle ist TNF- $\alpha$ . Es führt systemisch freigesetzt zu Kapillarpermeabilitätserhöhung, Hypotonie und in der Folge zu generalisierter Mikrozirkulationsstörung(7) und disseminierter intravasaler Gerinnung(1). In der Folge kommt es durch die Induktion der ubiquitär vorhandenen induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS) zu einer gesteigerten Freisetzung des vasodilativ wirkenden Stickstoffmonoxid(39). Dies führt bei Endothelzellen zu einer Zunahme der Gefäßpermeabilität und zieht einen intravasalen Flüssigkeitsverlust nach sich. Folge ist eine Minderperfusion lebenswichtiger Organe. Dieser Zustand wird mit „Systemic

Inflammatory Response Syndrom“ (SIRS) bezeichnet(14). SIRS wird bei Keimnachweis im Blut definitionsgemäß als Sepsis bezeichnet(14). NO, TNF- $\alpha$  und andere Entzündungsmediatoren führen durch nichtobstruktiv kapillarschädigende Wirkung im Koronarstromgebiet zu septischer Kardiomyopathie und zu unzureichenden Möglichkeiten des Herzens, den Blutdruck zu erhöhen(36, 48, 76). Am Ende steht eine infauste Situation mit Hypotonie, Multiorganversagen(MOD), Schock und disseminierter intravasaler Gerinnung(2, 71).

### **3.1.2 Reaktionen des Immunsystems auf bakterielle Infektionen**

#### ***3.1.2.1 Reaktion von Makrophagen auf bakterielle Infektionen***

Gewebsmakrophagen entwickeln sich kontinuierlich aus Monozyten, die aus dem Gefäßsystem in das umliegende Gewebe wandern. Sie finden sich in hoher Zahl im Bindegewebe und in der Nachbarschaft von Blutgefäßen. Makrophagen haben auf ihrer Oberfläche zahlreiche Rezeptoren für bakterielle und chemische Pathogene. Darunter findet sich der CD 14 Rezeptor, der spezifisch für LPS ist und CR3 bzw. Mac-1, die ebenso an LPS binden.

Binden eindringende Pathogene an Oberflächenrezeptoren von Makrophagen, hat dies eine sofortige Immunreaktion zur Folge. Diese Antwort kann in vielen Fällen Pathogene unschädlich machen, bevor sie sich im Körper ausbreiten. Eine wichtige Rolle von Makrophagen besteht in der Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, die weitere immunkompetente Zellen rekrutieren und diese an den Ort der Entzündung führen.

Den Makrophagen nachgeschaltet, folgt eine zweite Abwehrlinie. Diese besteht aus Erkennungsmechanismen, die auf relativ unspezifischen Rezeptoren basieren. Es folgt eine antigenunabhängige Antwort des Immunsystems. Sie benötigt keine klonale Vermehrung immunkompetenter Zellen und kann deshalb relativ schnell beobachtet werden. Diese Antwort kommt einer antikörperspezifischen Antwort zuvor und kann Pathogene so lange eindämmen, bis sich eine antikörperabhängige Antwort entwickelt hat. In ihrem Verlauf sezernieren Makrophagen proinflammatorische Zytokine wie IL-18, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-8 und Chemokine. Diese Entzündungsmediatoren sind einerseits für die typischen Infektzeichen verantwortlich, andererseits aber auch für die weitere Rekrutierung von immunkompetenten Zellen nötig. Der Einfluß von Zytokinen bewirkt ein verstärktes Wandern von Leukozyten aus der Blutbahn in das benachbarte Gewebe. Von dort aus wandern

Leukozyten im Verlauf des Konzentrationsgradienten von Chemokinen zur Stelle des Entzündungsherdens. Durch die Aktivierung des Komplementsystems und der spezifischen zellulären und humoralen Immunantwort werden die eingedrungenen Pathogene bekämpft. [Janeway, Travers „Immunobiology“, 2. Ausgabe, Kapitel 9-10 sinngemäß übernommen].

### **3.1.2.2 Die Rolle von IL-18 und IL-12**

#### *3.1.2.2.1 Interleukin-18*

IL-18 wurde erstmalig 1989 als „Interferon Gamma Inducing Factor (IGIF)“ beschrieben(49). Es ist nahe verwandt mit IL-1 und wird als inaktive Vorstufe freigesetzt und durch IL-1 Converting Enzyme (ICE) oder Caspase-1 zum aktiven IL-18 umgesetzt. Hauptsächlich wird es von Makrophagen(16) und dendritischen Zellen(69) produziert. Weitere Studien zeigten, daß IL-18 in Verbindung mit LPS zu einer Stimulierung von Th1- und NK-Zellen führt, IFN- $\gamma$  zu sezernieren(15, 60). IFN-gamma ist ein potenter Stimulus für Makrophagen. Wird ein Makrophage stimuliert, erhöht sich in ihm die Produktion von NO und freien Sauerstoffradikalen. Die Affinität der Lysosomen zu Bakterienproteinen und die Zahl der Phagosomen wird größer. Der Makrophage exprimiert mehr Oberflächenmoleküle vom Typ MHC II, was ihn zu einer potenteren antigenpräsentierenden Zelle macht. Er sezerniert nun IL-1, TNF, IL-6 und GM-CSF und IL-12. In vitro Infektionsversuche mit ICE-defizienten Mäusen zeigten, daß Splenozyten auf einen LPS-Reiz weniger IFN- $\gamma$  produzierten, als Splenozyten des Wildtyps. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch bei Mäusen, die mit einem Antikörper gegen IL-18 vorbehandelt worden waren, so daß die Hemmung der Produktion von IFN- $\gamma$  auf das Fehlen der Wirkung von IL-18 zurückzuführen ist(55).

IL-18 führt in der Maus bei NK- und T-Zellen nach 2 Stunden zu einer vermehrten Genexpression von TNF- $\alpha$ . Im Gegenzug hemmen Antikörper gegen IL-18 die Genexpression für TNF- $\alpha$  nach LPS Gabe(59, 73)

IL-18 besitzt die Fähigkeit, die Produktion von TNF- $\alpha$ , CXC- und CC-Chemokinen in peripheren humanen Monozyten zu induzieren(59). Versuche mit Antikörpern gegen TNF- $\alpha$  haben gezeigt, daß die Induktion von Chemokinen durch IL-18 hauptsächlich indirekt durch Freisetzung von TNF- $\alpha$  vonstatten geht(59). Des Weiteren kann IL-18 NF-kappaB(46), Fas-ligand- und perforinabhängige Zytotoxizität bei T-Zellen(13) und die Expression von

CC und CXC Chemokinen steigern(16). Bei Blockierung von IL-18 durch Antikörper oder IL-18 bindende Proteine ist eine reduzierte Freisetzung von IFN- $\gamma$  nachgewiesen(55).

IL-18 stellt einen wichtigen proinflammatorischen Faktor dar, der zusammen mit IL-12 einerseits zu einer suffizienten T-Zellantwort, als auch bei akuten bakteriellen Infektionen zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen führt.

#### 3.1.2.2.2 *Interleukin-12*

IL-12 wurde ursprünglich als Produkt von B-Zelllinien identifiziert, die mit dem Epstein-Barr Virus infiziert waren. IL-12 wird als Aktivator von zytotoxischen T-Lymphozyten bzw. NK-Zellen(33) charakterisiert.

IL-12 wird von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten freigesetzt(23). Es ist essentiell für die Produktion von IFN- $\gamma$  durch NK- Zellen und T-Lymphozyten. IL-12 steigert die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen(72) und unterstützt die Differenzierung von CD4 T-Lymphozyten in Th1 Zellen. Außerdem unterstützt es die Produktion zytolytischer T-Zellen(24). Es hat Einfluß auf die Sekretion von IFN- $\gamma$ , GM-CSF und IL-10 in Th1-Lymphozyten und NK-Zellen(24, 79). Somit ist IL-12 ein wichtiger Faktor der Immunantwort vom Typ Th1.

Andererseits hat IL-12 auch eine wichtige Rolle in der akuten unspezifischen Reaktion auf bakterielle Infektionen. Sowohl in gramnegativen, wie auch in grampositiven Infektionen ist für IL-12 eine Schlüsselfunktion nachgewiesen. In der Maus ist für die T-Zell-unabhängige Produktion von IFN- $\gamma$  nach Listerieninfektion IL-12 notwendig(22). Es führt zu gesteigerter Freisetzung von IL-12 durch Makrophagen(21). Der Gegenspieler zu IL-12 ist IL-10. Es wirkt genau entgegengesetzt und hat einen starken Hemmeffekt auf NK-, T-Zellen (12) und Makrophagen (65) und steuert die Immunantwort eher in die Richtung einer humoralen Th2-Antwort.

Es besteht noch keinerlei Klarheit darüber, in welcher Weise IL-12 und IL-18 bei der Aktivierung von Makrophagen, T-Lymphozyten und NK-Zellen zusammenwirken, bzw. sich gegenseitig ersetzen können. Es ist bekannt, daß die endogene Produktion von IFN-gamma von IL-18 und IL-12 abhängig ist. IL-12 reguliert die Expression des IL-18 Rezeptors auf IFN-gamma produzierenden Zellen, wohingegen NK-Zellen unabhängig von IL-12 allein von IL-18 stimuliert werden können(57). Auf diesem Gebiet gibt es in der aktuellen Literatur erhebliche Differenzen und es ist noch nicht vollständig geklärt, inwieweit IL-12 und IL-18

an der Aktivierung von NK- und T-Zellen beteiligt sind und welchem der beiden der initiale Part zukommt bzw. ob eines durch das andere ersetzbar ist.

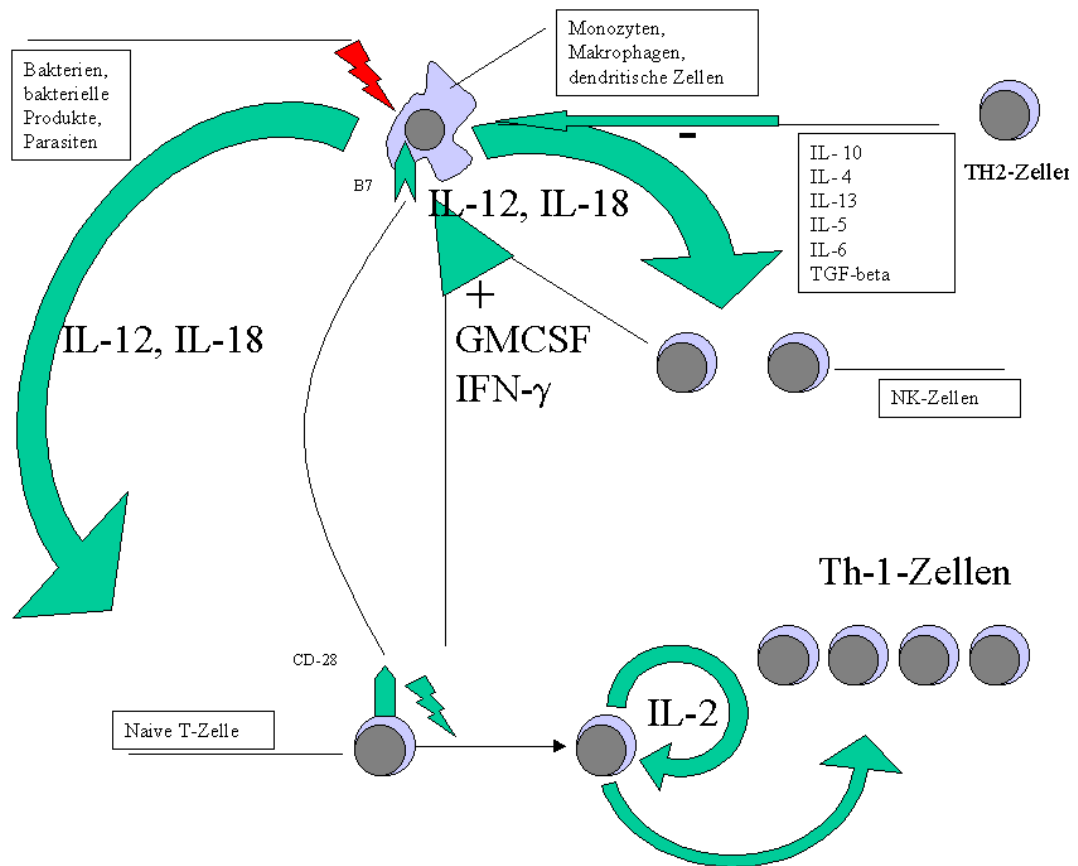


ABB. 1: ROLLE VON IL-12 UND IL-18 BEI BAKTERIELLEN INFESTIONEN

### 3.1.2.3 Die Funktion von Chemokinen

Chemokine sind Entzündungsmediatoren, die immunkompetente Zellen aus der Umgebung eines Entzündungsherdes rekrutieren, und zum Ort des entzündlichen Fokus führen(70).

Chemokine bilden eine eng verwandte Familie von Polypeptiden. Sie werden von Endothelzellen, Keratinozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen des Bindegewebes produziert. Man teilt Chemokine nach der biochemischen Stellung ihrer zwei N-ständigen charakteristischen Aminosäuren in der Proteinstruktur ein. Bei CXC- Chemokinen sind diese beiden Aminosäuren, 2 Cysteine, durch eine weitere Aminosäure getrennt, während sie bei CC-Chemokinen direkt benachbart sind. Im Unterschied zu Zytokinen gibt es bei Chemokinen für ein Chemokin mehrere Rezeptoren. Jeder dieser Rezeptoren ist für mehrere Chemokine spezifisch.

CXC Chemokine wirken typischerweise chemotaktisch auf Granulozyten, wohingegen CC-Chemokine überwiegend auf Monozyten wirken(63).

#### *3.1.2.3.1 CXC-Chemokine*

Interferon- $\gamma$  inducible protein (IP-10) wird in vitro von Monozyten, Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und T-Lymphozyten produziert(41). In der Maus wird IP-10 in großer Menge in Leber und Niere nach Gabe von IFN- $\gamma$  freigesetzt(51). IP-10 ist in der Maus ein Chemokin, dessen Expression durch die Wirkung von LPS und IFN- $\gamma$  gesteigert wird. IL-10 wirkt inhibitorisch auf die Freisetzung von IP-10.

Mip-2 ist ein weiteres Chemokin der CXC-Klasse. Es hat seine Wirkung hauptsächlich in der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten. Nach Stimulierung durch LPS wird sowohl in vitro, als auch in vivo eine verstärkte Freisetzung von Mip-2 beobachtet, wohingegen IFN- $\gamma$  einen hemmenden Einfluß zu haben scheint(35).

Weitere Chemokine dieser Gruppe sind IL-8 und MIG.

#### *3.1.2.3.2 CC-Chemokine*

Mip-1 $\alpha$  und Mip-1 $\beta$  (Macrophage inflammatory proteins) wirken chemotaktisch auf Monozyten(74), wobei Mip-1 $\alpha$  den stärkeren Effekt hat. Andere Ziele von Mip-1 $\alpha$  sind dendritische Zellen(67) und NK-Zellen(40). Mip-1 $\beta$  hat als Zielzellen Monozyten, T-Lymphozyten, dendritische Zellen, NK-Zellen und hämatopoetische Stammzellen(63). Weitere Chemokine dieser Gruppe sind MCP-1, Rantes und Eotaxin.

### **3.1.3 Tiermodelle**

Zur Zeit werden zur Simulierung des Krankheitsbildes Sepsis, basierend auf Peritonitis, folgende Versuchsansätze verwendet.

#### ***3.1.3.1 Intravenöse Injektion von Endotoxin oder TNF- $\alpha$***

Die Injektion von Lipopolysacchariden (LPS), Bestandteil gramnegativer Bakterien, oder die Injektion von TNF- $\alpha$  führt bei Säugetieren zu einem Krankheitsbild, das dem klinischen

Erscheinungsbild des septischen Schocks sehr ähnlich ist(37). Viele Studien befassen sich damit, welche immunologischen Faktoren das Überleben der Tiere beeinflussen.

Es wurden für diese Versuche sowohl Zytokin „Knock-out“ Mäuse (IL-18<sup>-/-</sup>, IL-12<sup>-/-</sup>, IL-10<sup>-/-</sup>/iNOS<sup>-/-</sup>) verwendet, als auch Blockierungen verschiedener Zytokine mit Antikörpern, sowie Injektion von rekombinanten Zytokinen durchgeführt.

Die Blockierung von IL-12(82), IFN- $\gamma$  (61) und TNF- $\alpha$ (17, 66) durch Antikörper wirkt sich positiv auf den klinischen Zustand von Versuchstieren aus. Auch die jeweiligen „Knock-out“ Mäusestämme für obige Zytokine profitieren von ihrem Gendefekt gegenüber Mäusen des Wildtyps (30, 66). Mäuse mit LPS-Schock profitieren von der Gabe antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- $\beta$ (6). Die Gabe proinflammatorischer Zytokine wie IL-12 und IFN- $\gamma$  schadet den Tieren und führt zu einem schlechteren Überleben(26).

Die Versuche zeigen, daß dieses Modell ein Schockmodell ist und das Überleben der Mäuse in erster Linie durch immunsuppressive Methoden verbessert werden kann.

Der Nachteil dieser Modelle ist, daß den Modellen der Bezug zur Klinik fehlt, da kein septischer Fokus vorhanden ist, der kontinuierlich Bakterien und deren Pathogene freisetzt.

### ***3.1.3.2 Injektionsmodell mit Bakterien***

Einen anderen Forschungsansatz stellt die Injektion von lebenden Bakterien dar. Es wurden verschiedene Bakterienarten verwendet und subletale und letale Sepsismodelle etabliert(19, 31, 52). Diese Modelle kamen dem klinischen Bild der Sepsis bedeutend näher, da man es bei septischen Patienten mit Infektionen zu tun hat, die mit einer Vermehrung pathogener Organismen einhergeht(10). Im Gegensatz zu Endotoxininjektionen haben lebende Bakterien die Fähigkeit, sich in einem Organismus zu vermehren und so ihre inflammatorische Potenz erheblich zu steigern. In vivo Versuche mit Bakterieninjektionen geben ein widersprüchliches Bild ab. Einige Versuche zeigen, daß die Gabe von proinflammatorischen rekombinanten Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  einen deletären Einfluß auf den Verlauf von Sepsis hat und identifizieren diese Modelle als Schockmodelle. In anderen Modellen jedoch ist genau das Gegenteil der Fall. Immunsuppressive Therapieversuche wie Gabe von Antikörpern gegen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-12 schlagen in diesen Modellen fehl und erhöhen die Letalität (45, 50). Die „Knock-out“ Mausvarianten für IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , zeigen eine Suszeptibilitätssteigerung(81).

Bakterieninjektionsmodelle haben den Nachteil, daß sie nicht für eine kontinuierliche Freisetzung von Bakterien sorgen und somit der Klinik des postoperativen septischen Patienten mit einem Infektionsherd nicht sehr nahe kommen.

### ***3.1.3.3 Zökum-Ligatur-Punktion (CLP)***

Viele Gruppen verwenden die Zökum-Ligatur und Punktion in Ratte oder Maus. Dabei wird ein Teil des Zökums ligiert und von der Blutversorgung abgeschnitten. Danach wird die Darmwand im ligierten Abschnitt punktiert und so ein septischer Fokus geschaffen. Der ligierte Anteil wird im Laufe der Zeit nekrotisch und setzt weiterhin Bakterien frei(3). Unserer Ansicht nach stellt die CLP aber eher ein Abszessmodell dar, das zusätzlich schlecht standardisierbar ist, da es von vielen operativen Faktoren abhängt. Die Ergebnisse von Studien zeigen ein sehr widersprüchliches Bild über die Entstehung des septischen Geschehens während CLP. Einige Autoren vertreten die Meinung, daß eher eine immunsuppressive Therapie Erfolg verspricht(32, 75), andere Autoren hingegen sehen Erfolge im Überleben bei Gabe von Immunstimulanzien wie TNF- $\alpha$ (18) oder IL-1 $\beta$  (58).

Die insgesamt widersprüchlichen Ergebnisse der CLP erforderte die Etablierung eines gut standardisierbaren und kliniknahen Tiermodells, das es erlaubt, die Situation des septischen Patienten nach viszeralchirurgischen Eingriffen zu simulieren. Dies wurde mit der Colon-Ascendens-Stent-Peritonitis (CASP) verwirklicht(5, 44, 54, 80).

### ***3.1.3.4 Colon-Ascendens-Stent-Peritonitis (CASP)***

CASP ist ein hoch standardisierbares Tiermodell für die Simulierung von Sepsis basierend auf peritonealer bakterieller Infektion. Ein Stent definierten Durchmessers im Colon ascendens stellt einen stetigen Infektionsherd in der Peritonealhöhle dar. Es kommt zu einer schnellen Aussaat von Bakterien in Peritoneum und Blut und es tritt eine Endotoxämie auf. CASP führt zu gesteigerter Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  vor allem in Milz und Lunge. IFN- $\gamma$  – defiziente Mäuse haben einen signifikanten Überlebensnachteil, wohingegen TNFRp55-/- Mäuse gleiche Überlebenskinetiken wie Mäuse des Wildtyps haben (5, 44, 54, 80)

CASP führt in Mäusen zu gesteigerter Aktivierung von neutrophilen Granulozyten in der Lunge und zu Freisetzung von Chemokinen in der Lunge(54). Weiterhin ist nachgewiesen,



daß CASP bei Mäusen zu akutem Nierenversagen führt und sich in den Nieren nach 12h eine deutliche Induktion von CC- und CXC-Chemokinen nachweisen läßt(44).

### **3.2 Fragestellung vorliegender Arbeit**

Mit dieser Arbeit soll untersucht werden, welche Rolle Interleukin 12 und Interleukin 18 in der akuten bakteriellen Peritonitis und Sepsis in der Maus spielen. In dem Tiermodell „CASP“ für Anastomoseninsuffizienz nach visceralen Operationen soll das Zusammenwirken von IL-12 und IL-18 bei der Induktion von Peritonitis und nachfolgender Sepsis beleuchtet werden. Hierfür werden IL-12 p40 „Knock-out“ Mäuse (IL-12 -/-) bzw. Mäuse, die mit einem polyklonalen Antikörper gegen IL-18 (1 mg Kaninchen-IgG intraperitoneal) behandelt wurden, mit Wildtypmäusen verglichen. Im ersten Teil der Arbeit wird auf den klinischen Einfluß obiger Zytokine auf die Tiere bzw. auf das Überleben einer Peritonitis eingegangen. Der zweite Teil befaßt sich mit in vitro Analysen von Leber, Lunge, Milz und Niere. Dabei wurde in den Organen die Expression verschiedener Zytokine und Chemokine mit dem RNase-Protektion-Essay gemessen, immunhistologische Färbungen der Organe angefertigt und Bakterienkulturen verschiedener Kompartimente angelegt.

Im einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

#### **3.2.1 Phänotyp der IL-12 defizienten Maus**

- Überlebenskinetik nach CASP
- Zytokininduktion nach 3h und 12h in Leber, Lunge, Milz und Niere
- Chemokininduktion nach 3h und 12h in Leber, Lunge, Milz und Niere
- Bakterieninfiltration nach 16h in Leber, Lunge, Milz, Niere und Peritonealhöhle
- immunhistologische Unterschiede in Leber und Lunge

#### **3.2.2 Phänotyp der anti-IL-18 behandelten Maus**

- das Überlebenskinetik nach CASP
- Zytokininduktion nach 3h und 12h in Leber und Lunge
- Chemokinexpression nach 3h und 12h in Leber und Lunge
- Bakterieninfiltration nach 16h in Leber, Lunge und Peritonealhöhle

## 4 Zielsetzung und Methodik

### 4.1 wissenschaftliche Grundlagen der Versuche

Bisherige Tierversuche im Modell CASP haben gezeigt, daß die Wirkung von TNF- $\alpha$ , einem proinflammatorischen Schlüsselzytokin, nicht zwingend an dem Entstehen von Sepsis in der Maus beteiligt ist. Versuche mit p55 TNF-Rezeptor Knock-out Mäusen ergaben, daß in Abwesenheit von TNF- $\alpha$ -Wirkung dennoch septischer Schock entstehen kann. Weitere Versuche zeigten, daß IFN- $\gamma$ , das eine bedeutende Rolle bei der Freisetzung von TNF- $\alpha$  bei Makrophagen spielt(34), signifikanten Einfluß auf das Überleben bei Sepsis hat. IFN- $\gamma$  defiziente Tiere haben einen erheblichen Überlebensnachteil gegenüber Wildtypmäusen. Dies spricht für einen starken Einfluß von IFN- $\gamma$  auf das Überleben einer bakteriellen Sepsis in diesem Tiermodell(80). Für die Freisetzung von IFN- $\gamma$  ist eine Stimulation von T-Lymphozyten oder NK-Zellen notwendig[34, 68]. Zwei wichtige Zytokine, die bei diesen Zellen zu einer Freisetzung von IFN- $\gamma$  führen, sind IL-12 und IL-18(16, 72). In dieser Arbeit wurden beide Zytokine unabhängig voneinander blockiert und so möglicherweise indirekt Einfluß auf die Produktion von IFN- $\gamma$  genommen. Hiermit sollen die Zusammenhänge der einzelnen Zytokine und ihre Rolle im Krankheitsbild „Sepsis“ genauer beleuchtet werden. Als weiteres Ziel kann die Schaffung von Grundlagen für die Entwicklung eines Therapieansatzes beim septischen Schock gesehen werden.

## **4.2 Methodik in vivo**

### **4.2.1 Genehmigung der Tierversuche**

Die Tierversuche waren gemäß Tierschutzgesetz von der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern) unter dem Aktenzeichen 211-2531-57/95 (Erweiterungsantrag) zuvor genehmigt worden.

### **4.2.2 Tiere und Tierhaltung**

Für die Versuche wurden ingezüchtete Mäuse in einem Alter von 8 bis 12 Wochen (Gewicht 20 – 30 g) verwendet.

Die Versuche wurden an C 57BL/6 Mäusen von Harlan und IL 12 p40/- Mäusen mit C 57BL/6 Hintergrund, bezogen von Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) durchgeführt. Die Generierung der IL-12 p40 defizienten Maus erfolgte nach der Methode der homologen Rekombination durch J. Magram(43). Es konnte nachgewiesen werden, daß IL-12 defiziente Mäuse eine abgeschwächte T-Zellantwort aufweisen. So ist für Leukozyten IL-12 p40 defizienter Mäuse bekannt, daß sie auf einen Reiz mit Endotoxin nicht in adäquater Weise mit einer Sekretion von IFN- $\gamma$  reagieren können, wohingegen die Sekretion von IL-4 erhöht ist.(43).

Das Geschlechterverhältnis war in unseren Versuchen ca. 1:1 und in den Kontrollgruppen befanden sich entsprechend der jeweiligen Versuchsgruppe eine gleich große Anzahl an männlichen bzw. weiblichen Tieren.

Im zweiten Experiment wurden Wildtypmäusen perioperativ polyklonale Antikörper gegen IL-18 verabreicht. Die verwendeten Antikörper stammten aus der Immunisierung von Kaninchen mit rekombinantem IL-18. Das Immuserum wurde uns freundlicherweise von Dr. Peter Hochholzer überlassen. Die Spezifität und Funktionsfähigkeit des verwendeten Antikörpers muß vorausgesetzt werden, da zur Zeit der Experimente kein Elisa-Kit für IL-18 verfügbar war. Es ist aber von einer Wirksamkeit des verwendeten Antikörpers mit hoher Sicherheit auszugehen, da als Kontrollgruppe Mäuse verwendet wurden, denen das Kaninchenserum vor deren Immunisierung mit IL-18 perioperativ verabreicht worden war. Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Versuchsgruppe und Kontrollgruppe sowohl im Überleben, als auch in weiterführenden Versuchen.

Die Tiere wurden in Macrolonkäfigen (Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland) auf Einstreu bei Preßfutter (Altromin 1324 Standard-Diät, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum im Tierstall des Instituts für Medizinische Mikrobiologie der Technischen Universität München, Klinikum Rechts der Isar, gehalten.

Vor den Versuchen wurde sichergestellt, daß entsprechende Versuchsgruppen eine Woche unter gleichen Lebensbedingungen in einem Stall verbracht wurden. Alle Versuche wurden unter Einhaltung der deutschen Tierschutzverordnung durchgeführt.

### **4.2.3 Tiermodell : Colon-Ascendens-Stent-Peritonitis (CASP)**

CASP ist ein chirurgisches Modell, das bei Mäusen Peritonitis und Sepsis hervorruft. Es ist in besonderer Weise geeignet, die Situation von Patienten mit Anastomoseninsuffizienz nach gastrointestinalen Eingriffen zu simulieren.

CASP schafft durch einen Stent variablen Durchmessers eine direkte Verbindung zwischen Darmlumen des Colon ascendens und der Peritonealhöhle. Der Durchmesser des Stents hat Einfluß auf die Menge der Bakterien, die in die Peritonealhöhle übertreten kann und demzufolge auf die Schwere der Infektion.

Das Modell erlaubt dem Operateur, durch Verwendung von verschiedenen Stentdurchmessern auf das septische Geschehen Einfluß zu nehmen:

22G-CASP hat eine Letalität von 38%, 18G/14G-CASP von 64% bzw. 100%.(80) im Wildtyp

#### **4.2.3.1 Anästhesie**

Das Versuchstier wird in einen Glaskolben (Volumen: ca. 1 Liter) verbracht. Im luftdicht verschlossenen Kolben befindet sich Zellstoff, der mit Diethylether befeuchtet ist. Nach Eintritt der Narkose Entfernen des Versuchstieres aus dem Kolben. Nun wird das narkotisierte Versuchstier rücklings auf einer Korkplatte mit vier Klebestreifen an den Vorder- und Hinterläufen fixiert. Der Narkoseverlauf kann sehr gut mit einem Zentrifugenröhrchen (15 ml), in dem sich mit Äther getränkter Zellstoff befindet, gesteuert werden. Zur Beeinflussung der Narkosetiefe kann der Abstand des Röhrchens zum Versuchstier verändert werden.

Nach Entfernen des Röhrchens Erwachen des Versuchstieres nach 5 min. Nach weiteren 5 Minuten unauffälliges Verhalten des Versuchstiers.

### 4.2.3.2 Operationen

#### 4.2.3.2.1 Instrumentarium

Lupenbrille mit dreifacher Vergrößerung

Übliches mikrochirurgisches Besteck (Nadelhalter, Pinzette gerade, Mikroschere)

Nadelhalter

Venenverweilkatheter (Stärke: 14 G, 16 G, 18 G)

Schere

5/0 Ethilon Faden (Ethilon schwarz monofil 5/0; Ethicon GmbH; Norderstedt; Deutschland)

7/0 Ethilon Faden (Ethilon schwarz monofil 7/0); Ethicon GmbH; Norderstedt; Deutschland)

Wattestäbchen

#### 4.2.3.2.2 Laparotomie, Wundversorgung

Hautdesinfektion mit (Cutasept<sup>®</sup>F, Hautdesinfiziens farblos, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland)

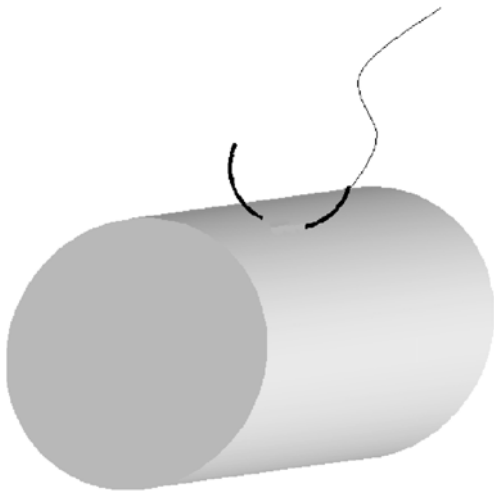
Anheben der Haut vom Muskel mit einer anatomischen Pinzette. Längsinzision der Haut mit einer Schere. Inzision der Haut oberhalb der Symphyse in einer Länge von 1,5 cm. Anheben der Bauchmuskelfaszie mit einer anatomischen Pinzette. Durchtrennen der Bauchmuskulatur in der Linea alba mit der Schere.

Fortlaufender Verschluß des Peritoneum, Muskulatur und Faszien mit 5/0 Ethilon. Anschließend Verschluß der Haut mit Einzelknopfnähten mit Ethilon.

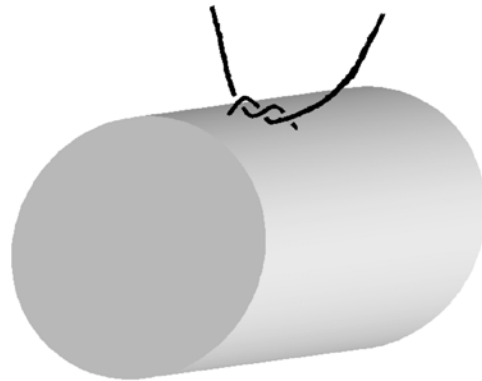
#### 4.2.3.2.3 Implantation des Colonstents

Aufsuchen des Zökalspols mit 2 Wattestäbchen. Ausschwenken von Zökum, Colon ascendens und terminalem Ileum. Aufsuchen der Einmündungsstelle des terminalen Ileums in das Colon. Tangentialer Durchstich mit Ethilon 7/0 1,5 cm aboral der Ileozökalklappe streng antimesenterial. Zirkuläres Einritzen einer Braunüle 3mm nach Beginn der Plastikummantelung mittels Schere. Punktion des Colon ascendens mit der vorbereiteten Braunüle nahe der Fixierungsstelle des Fadens. Vorschieben der Braunüle bis sich die

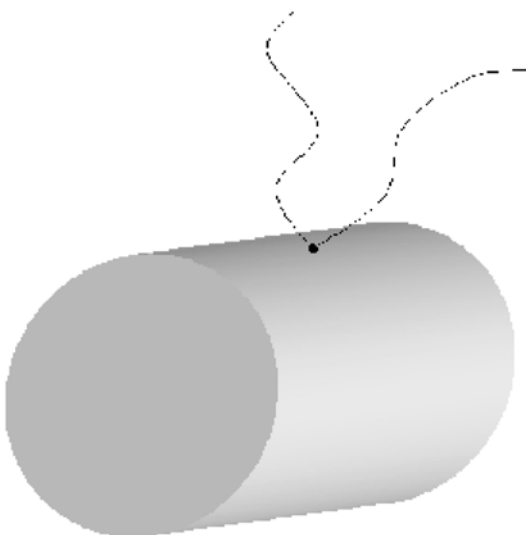
Ritzstelle auf Niveau der Serosa befindet. Verankerung der Braunüle mittels Umschlingen der Braunüle mit den freien Enden des Fixierungsfadens und Sicherung durch chirurgischen Knoten. Anschließend Fixierung der Braunüle auf der gegenüberliegenden Seite mittels 2 Stichen durch die Darmwand. Zurückziehen des Mandrin und Kürzen des Venenverweilkatheters (1mm über Fadenniveau). Füllen des Stents mit leichtem Druck auf das Zäkum. Reposition der ausgeschwenkten Darmanteile in die Bauchhöhle. Flüssigkeitssubstitution mit physiologischer Kochsalzlösung (0.5 ml i.p.) mit einer 1 ml Injektionsspritze. Wundverschluß.



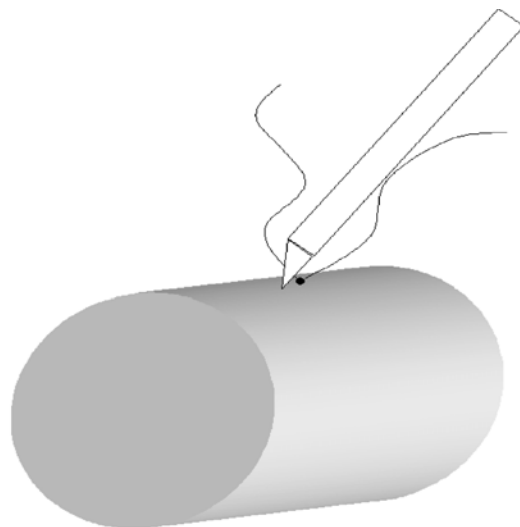
A) Fixierungsstich mit Ethilon 7/0



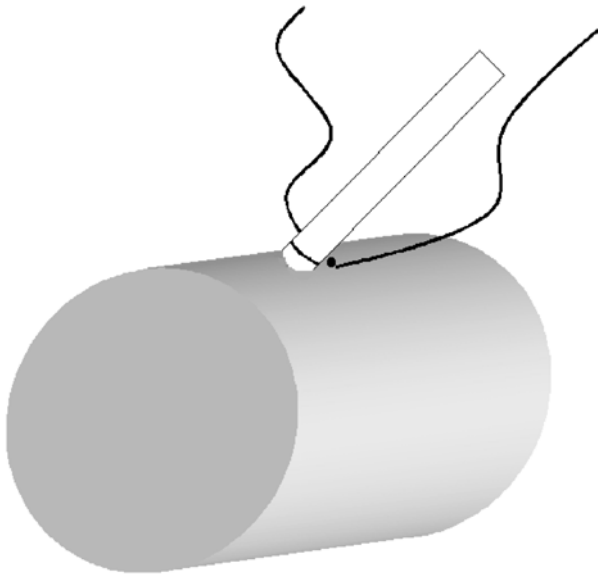
B) Knoten einfach



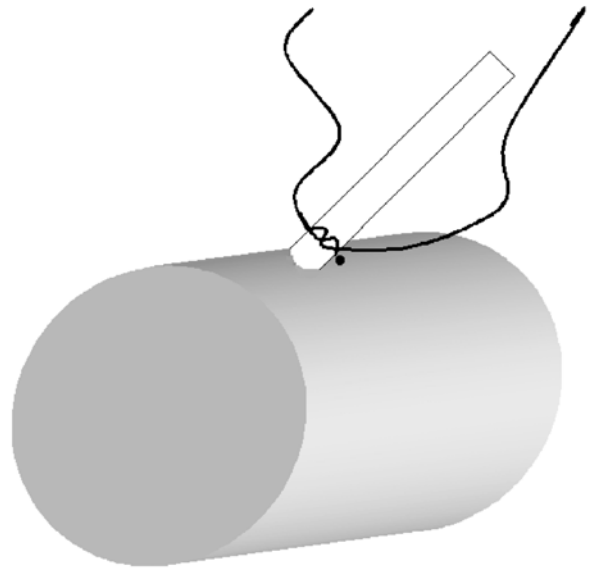
C) Knoten doppelt



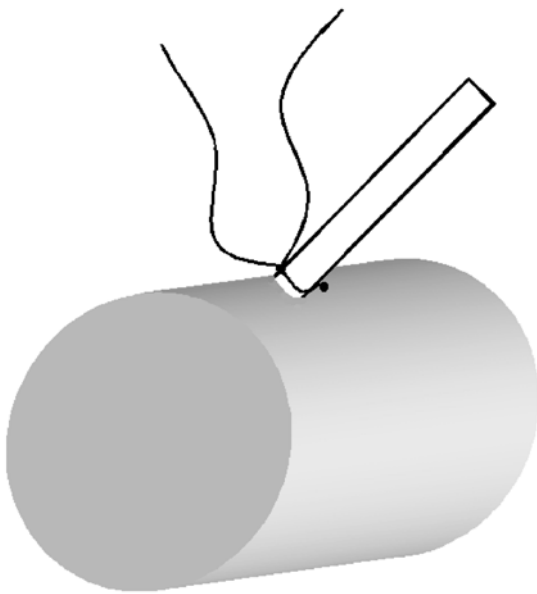
D) Punktion mit Braunüle



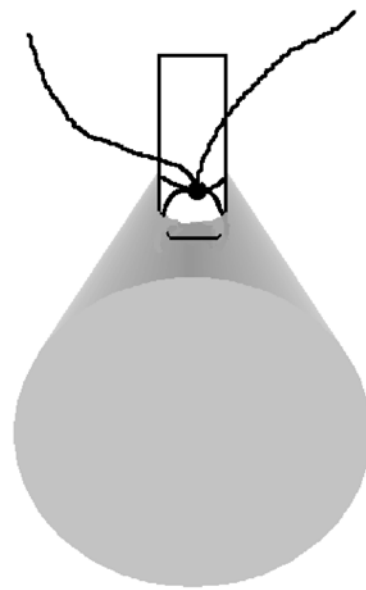
E) Vorschieben der Braunüle



F) Chirurgischer Knoten

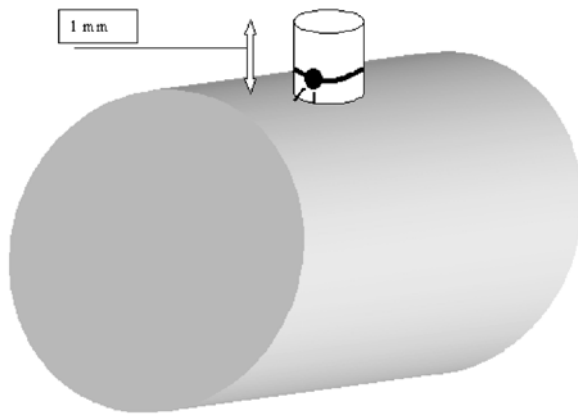


G) Fixierung der Braunüle



H) Fixierung der Darmwand





Operationsergebnis

ABB. 2: OPERATIONSTECHNIK „CASP“

### **4.2.3.3 Postoperatives Vorgehen**

#### *4.2.3.3.1 Schmerztherapie*

Alle Mäuse erhalten postoperativ eine Schmerzprophylaxe mit Buprenorphin 0,1mg/kg i.m.

#### *4.2.3.3.2 Beobachtung*

Postoperativ werden die Tiere alle 6 Stunden kontrolliert und nach einem standardisierten Schema untersucht. Bei der Untersuchung werden Körpergewicht, äußere Erscheinung, Atemgeräusch, Spontanverhalten, provoziertes Verhalten, Reaktion auf Reize erhoben. Jedes dieser Kriterien wird nach steigender Belastung mit 0 bis 3 Punkten bewertet. Werden wenigstens zwei der Kriterien mit 3 bewertet, werden alle mit 3 bewerteten Kriterien mit 4 Punkten bewertet. Damit wird der Tatsache Rechnung getragen, daß sich die Belastungen des Versuchstieres nicht linear addieren, sondern ein Kriterium mit 3 bewertet viel schlimmer wiegt, als 3 Kriterien mit jeweils 1 bewertet. Danach werden alle ermittelten Punktwerte addiert und die Belastungssituation des Tieres bewertet. Erreicht ein Tier 12 oder mehr Belastungspunkte, erreicht die Belastung definitionsgemäß ein erhebliches Ausmaß. Das Tier wird als nicht überlebensfähig eingestuft und schmerzlos geopfert.

### **4.2.3.4 Die Überlebenskinetik**

Es wurden

C57 B6 Mäuse (WT) mit IL-12-Knock-out-Mäusen(IL-12 -/-) mit C-57-B6-Hintergrund und C57 B6 Mäuse, die mit einem polyklonalem Antikörper gegen IL-18 behandelt wurden (aIL-18), mit Mäusen des WT verglichen.

Dazu wurden die Mäuse wie beschrieben operiert, es wurde abwechselnd ein Tier der Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe operiert. Der Antikörper gegen IL-18 (1 mg Hasen IgG) wurde vor dem Wundverschluß intraperitoneal in 0,5 ml PBS-Puffer verabreicht.

Im postoperativen Verlauf wurden die Mäuse engmaschig kontrolliert, und ihr klinischer Zustand nach einem standardisierten Score beurteilt. Bei erheblicher Belastung des Versuchstieres wurde es schmerzlos geopfert. Die Ergebnisse der Überlebenskurven beziehen sich auf das Überleben bei mittlerer Belastung. Die Tiere wurden postoperativ 336 Stunden (14 Tage) überwacht. Danach wurden alle Tiere schmerzlos geopfert.



#### **4.2.3.5 Organentnahme**

Das Versuchstier erhält 0,1mg Ketanest i.m.. Nach Wirkungseintritt Fixieren des Versuchstieres an den Vorder- und Hinterläufen auf einer Korkplatte. Zur Gewinnung der Peritoneallavage Injektion von 10 ml steriler PBS-Lösung in die Peritonealhöhle mit einer Spritze, danach Aspiration der Flüssigkeit und Verbringen in Eis. Durchtrennen der alten Operationsnaht mit einer Schere und Erweitern des Schnittes bis zum Sternum. Gewinnung des Serums durch Punktion der Vena cava mit einer heparinisierten Insulinspritze.

Nachfolgend Erweiterung der Laparotomie durch zwei Rippenbogenrandschnitte und seitliches Aufspannen des Abdomens.

Die Abdominalexplantation erstreckt sich auf Leber, Niere und Milz.

Abpräparieren der Organe von den sie versorgenden Strukturen und Entnahme.

Anschließend Halbieren der Organe (ein Teil für Histologie, der andere für die RNS-Isolierung).

Erweiterung des Schnittes thorakal und Durchtrennen des Sternums. Über einen medialen Halslängsschnitt Durchtrennung der Glandula thyreoidea und Darstellung der Trachea auf einer Länge von 2 cm. Einkerben der Trachea in der halben Zirkumferenz mit der Mikroschere.

Zur histologischen Aufarbeitung wird ein Lungenflügel verwendet, der andere dient der Isolierung von zellulärer RNS. Nach Ligatur eines Hauptbronchus Entnahme des abgesetzten Lungenflügels (RNS-Isolierung). Spülen des nicht ligierten Lungenflügels über einen 22G-Venenverweilkatheter mit PBS-Lösung über den trachealen Zugang. Danach Entfalten des Lungenflügels mit (0,5 ml Tissue-Tac-Sucrose-Lösung) und Ligieren des Bronchus unter der Trachealbifurkation und Durchtrennung. Entnahme

### **4.3 Methodik in vitro**

#### **4.3.1 Histologische Arbeiten**

##### ***4.3.1.1 Anfertigen von histologischen Schnittpräparaten***

Nach Entnahme der Organe wird die gewonnene Probe in ein vorbereitetes Blockschälchen gelegt und mit Einbettmedium (Jung: Tissue freezing medium, Leica instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) übergossen. Das Schälchen wird dann für 10 Sekunden in stickstoffgekühltem Isomethylbutan schockgefroren. Die so gewonnenen Blöcke werden bei –80°C aufbewahrt. Zum Schneiden werden die gefrorenen Blöcke bei einer Kammertemperatur von –23°C im Kryostat (Leitz KG, München) auf dem Schneidetisch fixiert und dann Schnitte mit einer durchschnittlichen Dicke von 5-7 µm angefertigt. Die Schnitte werden auf Objektträgern aufgebracht, acetonfixiert und bis zur Färbung bei –20°C gelagert.

##### ***4.3.1.2 Immunhistologische Färbungen***

Die immunhistochemischen Färbungen wurden an den Gefrierschnitten von Leber und Lunge der untersuchten Tiere durchgeführt und, als Kontrolle, bei Organen von nativen Mäusen. Hierfür wurden monoklonale Antikörper verwendet, die, nach Bindung an ihr jeweiliges Epitop und nach entsprechenden Auswasch- und Reinigungsschritten, mit der Peroxidase/Antiperoxidase-Methode gefärbt wurden. Es wurde folgender Antikörper verwendet: Mac-1\*\*

\*\* → Ratte-anti-Maus mAb, Hybridom, ATCC (American Type Culture Collection), Rockville, Maryland, USA

Gegengefärbt wurde mit peroxidasekonjugiertem F(ab')<sub>2</sub> Fragment Maus Anti Ratte IgG, Dianova, Hamburg, Deutschland

### 4.3.2 Extraktion der gesamtzellulären RNS aus Gewebe

Ziel der molekularbiologischen Arbeiten war es, Unterschiede in der Zytokininduktion während CASP in verschiedenen Organen zu erfassen. Es war hierzu erforderlich, aus den Geweben zelluläre RNS zu separieren.

Unmittelbar nach Entnahme des Organs wird es in ein vorher bereitgestelltes steriles Eppendorf-Cup verbracht und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gewebeproben werden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

Bei der Isolierung der zellulären RNS wurde nach dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi vorgegangen(11).

#### 4.3.2.1 Durchführung

- Tiefgefrorenes Gewebe in kaltes GSCN geben und sofort mittels Ultra Turrax T8 (IKA Labortechnik) homogenisieren
- feste Bestandteile abzentrifugieren (3000 U/min, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ )
- 280  $\mu\text{l}$  2 M Na-Acetat zu überstand geben, vortexen
- 2,8 ml Phenol,  $\text{H}_2\text{O}$ -gesättigt zugeben und vortexen
- 840  $\mu\text{l}$  Chloroform zugeben und kräftig schütteln
- 15 min auf Eis inkubieren
- zentrifugieren (3500 U/min, 20min,  $4^{\circ}\text{C}$ )
- wässrige Phase mit 2,5 Vol. Ethanol absolut fällen (1h,  $-20^{\circ}\text{C}$ )
- pelletieren (3500 U/min, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ )
- Pellet in 400 $\mu\text{l}$  GSCN lösen und in Eppendorf-Cup überführen
- Fällern mit 1ml Ethanol absolut
- pelletieren (12000 U/min, 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ )
- Pellet in 400  $\mu\text{l}$  DEPC-  $\text{H}_2\text{O}$  lösen
- 400  $\mu\text{l}$  Phenol/Chloroform (1:1 gesättigt mit 1 M Tris pH 9,5) zugeben
- vortexen
- zentrifugieren (12000 U/min, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ )
- Überstand mit 0.1 Vol 3 M Na-Acetat und 2.5 Vol Ethanol absolut fällen
- zentrifugieren
- Pellet mit Ethanol 70% waschen und Pellet in 200  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  lösen.
- Bestimmung der RNS-Konzentration mit dem Photometer (260 nm)

#### 4.3.2.2 *Lösungen und Puffer*

- Guanidiniumthiozyanat (GSCN)
- 2 M Na - Acetat, pH 4
- 3 M Na- Acetat, pH 5
- Phenol, H<sub>2</sub>O-gesättigt, pH 4.5 ( Roth Art. A 980.1)
- Chloroform ( Merck, 64271 Darmstadt)
- Ethanol absolut ( Merck, 64271 Darmstadt)
- Natronlauge ( Merck, 64271 Darmstadt)
- Ethanol 70% (selbst gemischt aus Ethanol absolut und DEPC- H<sub>2</sub>O)
- DEPC - H<sub>2</sub>O (Pyrokohlensäurediethylester, Sigma-Chemie Deisenhofen, LOT 120H3655 0,1%, 2x autoklaviert)
- Phenol/Chloroform (Verhältnis 1:1, Tris pH 9.5 gesättigt)
- Eppendorf Cups 1,5 ml 2 fach autoklaviert, RNase frei
- Zentrifugenröhrchen 15 ml
- Homogenisator Ultra Turrax T8 (IKA-Labortechnik)
- Photometer
- Heizblock

#### 4.3.3 **RNase-Protektion-Essay**

Mit Hilfe des RNase-protektion-essay sollte auf mRNS-Ebene die Induktion verschiedener Zytokine bei CASP verifiziert werden(42).

RNase-Protektion ist ein Verfahren, das Quantifizierung von definierten mRNS-Stücken in RNS-Proben zulässt.

Im ersten Schritt erfolgt eine Transskription von definierten DNA-Fragmenten sog. Template-Sets, durch eine DNS abhängige RNS-Synthetase in RNS. Dabei wird dem Ansatz radioaktiv markiertes [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] UTP beigefügt, das rein zufällig in die synthetisierte RNS eingebaut wird.

In einem Hybridisierungsschritt können die markierten RNS-Fragmente mit der zu untersuchenden RNS aus Geweben hybridisieren.

Durch Zugabe einer RNase ist überall dort, wo keine Hybridisierung stattgefunden hat, der RNS-Strang schutzlos dem RNase-Verdau ausgesetzt.

Durch Gelelektrophorese kann die erhaltene radioaktiv markierte RNS der Basenlänge entsprechend aufgetrennt werden und die Menge verschiedener mRNS-Spezies durch Phosphorimaging sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

Die Auswertung der entstandenen Banden erfolgt am PC mit dem Programm ImageQuant. Es werden die entsprechenden Banden in ein Verhältnis zu GAPDH gesetzt. GAPDH ist ubiquitär vorhanden und gilt als konstant induziertes Gen und eignet sich somit für die Quantifizierung gemessener RNS. GAPDH tritt in jedem Template-Set als Bande auf.

#### **4.3.3.1 Durchführung**

Es wurde pro Probe 10µg RNS verwendet.

Nach Trocknung der RNS-Proben in einer Speed-Vac-Zentrifuge bei Raumtemperatur wird streng nach der Anleitung der Fa. Beckton-Dickinson vorgegangen und die Proben in mehreren Hybridisierung- und Reinigungsschritten für die Gelelektrophorese vorbereitet.

Nach Gießen des Geles und Aushärtung:

- Behutsames Entfernen des Kammes und Spülen der Gelkammern mit einer Injektionsspritze und Laufpuffer
- Gelvorlauf mit 40 W für 45 min
- Vorbehandlung der Proben:
- Erhitzen auf 90 °C für 3 min
- sofortige Abkühlung auf 4 °C im Eisbad
- Die RNS liegt jetzt als Einzelstrang vor, da sich die entsprechenden Stücke getrennt und durch die rasche Abkühlung nicht mehr wiedergefunden haben.
- Auftragen der Proben, der Positiv-, Negativkontrolle und des Standards in die Gelkammern
- Elektrophorese bei 25 W für 10min
- Elektrophorese bei 50 W für 1,5 h
- Vorsichtiges Abheben der silanisierten Platte vom Gel und Abziehen des Gels auf einem Wattman-Paper unter ständiger Spülung mit ddH<sub>2</sub>O
- Gelrocknung für 1,5 h in Vakuum-Geltrockner
- Phosphorimaging für 24 h
- Scan



#### 4.3.3.2 Reagentien und Geräte

- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
- Bohrsäure(Sigma Molecular Biology St.Louis)
- Tetramethyl-ethylenediamine(Temed) (Gibco BRL)
- Natrium Acetat (Sigma Chemical Company St. Louis)
- N-Lauroylsarcosine( Sigma Ultra )
- Ammoniumpersulfat ( Gibco BRL)
- EDTA( Sigma)
- Acrylamid 40% (Liquacryl™ ICN Biomedicals Inc. Ohio 44202)
- Bisacrylamid 2%(Liquabis™ ICN.Biomedicals Inc. Ohio 44202)
- Urea
- Aqua ad iniectabilia ( Delta-Pharma GmbH Pfullingen)
- Puffer: TBE 10x (0,89 M Tris, 0,89 M Bohrsäure, 20mM EDTA, ph 8,4)
- Phenol, Tris-gesättigt
- Chloroform-isoamylalkohol
- [ $\alpha^{33}\text{P}$ ] UTP 250  $\mu\text{C}$  (Amersham Pharmacia Biotech 2000)
- Zytokin Template-Set
- Kontroll-RNS
- Sequencing Gel Electrophoresis Apparatus (Life-Technologies Modell S2)
- Wasserbad(Köttermann Labortechnik)
- Electrophoresis-power-supply (Gibco BRL PS 3003)
- Gelrockner (SE 1160 Hoefer Scientific Instruments San Francisco)
- In vitro Transkriptionskit (Becton-Dickinson):
  - RNSsin 40 U/ $\mu\text{l}$
  - GTP/ATP/CTP/UTP(GACU-Pool)
  - DTT 100 mM
  - Transkriptionspuffer
  - T7 RNS Polymerase
  - RNase freie DNase
  - Yeast tRNS 2mg/ml
  - EDTA 20 mM
  - Ammoniumazetat 4M

- RPA-Kit (Becton-Dickinson)
  - Hybridisierungspuffer
  - RNasepuffer
  - RNase A + T1 Mix (A:80 ng/μl, T1:250U/μl)
  - Proteinase K Puffer
  - Proteinase K (10mg/ml)
  - Yeast tRNS (2mg/ml)
  - Ammoniumazetat 4M
  - Ladepuffer
- Laufpuffer : 1 l 0,5x TBE-Puffer (aus 10x TBE durch Verdünnen mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt)

#### **4.3.4 Bakteriologische Untersuchungen**

Es wurden von Peritonealflüssigkeit, Lungen- und Lebergewebe Bakterienkulturen angelegt. Nach der Explantation wurden die Organe direkt in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen verbracht, das mit 4 ml eiskaltem PBS-Puffer gefüllt war. Danach wurde das Gewebe mit dem Ultrathurrax zerkleinert, so daß sich eine Gewebssuspension ergab. Mit einer Mikrotiterplatte wurde eine Verdünnungsreihe mit PBS Lösung hergestellt.

Es wurden je 10μl der Verdünnungen 1:10 und 1:100 auf Blut-Agar Kulturplatten aufgetragen und in der üblichen Technik verteilt. Danach wurden die Platten für 24 Stunden bei 37°C bebrütet und die entstandenen Kolonien ausgezählt. Die Ergebnisse wurden danach je nach Verdünnung auf die Einheit „Koloniebildende Einheiten / ml“ (KBE/ml) umgerechnet.

## Gruppeneinteilung

Von jedem der untersuchten Mausstämmen wurde primär eine Überlebenskinetik bestimmt. Als Kontrolle dazu diente die C57BL/6 Maus. Die Anzahl der Tiere wurde so gewählt, daß eine sichere Aussage in Bezug auf die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen möglich war. Bei den Gruppen für die Organentnahme wurden 3 bzw. 4 Tiere pro Gruppe verwendet.

Gruppen-name	Stamm	Therapie	Kinetik n=	Ex nach 3h, n=	Ex nach 12h, n=	Ex nach 16h, n=
16G-Casp, Kinetik	C57BL/6	∅	19	∅	∅	∅
16G-Casp, Kinetik	IL-12 -/-	∅	19	∅	∅	∅
18G-Casp, Kinetik	C57BL/6	∅	11	∅	∅	∅
18G-Casp, Kinetik	IL-12 -/-	∅	11	∅	∅	∅
nativ, Organentnahme (n=3)	C57BL/6	∅	0	∅	∅	∅
nativ, Organentnahme (n=3)	IL-12 -/-	∅	0	∅	∅	∅
16 G-Casp, Organentnahme	C57BL/6	∅	0	3	3	8
16 G-Casp, Organentnahme	IL-12 -/-	∅	0	3	3	8
16 G-Sham Casp, Organentnahme	C57BL/6	∅	0	3	∅	∅
16 G-Sham Casp, Organentnahme	IL-12 -/-	∅	0	3	∅	∅
18G-Casp, Kinetik	C57BL/6	Kontrollserum	15	∅	∅	∅
18G-Casp, Kinetik	C57BL/6	aIL-18 pAb.	14	∅	∅	∅
18G-Casp, Organentnahme	C57BL/6	Kontrollserum	0	4	4	8
18G-Casp, Organentnahme	C57BL/6	aIL-18 pAb.	0	4	4	8

ABB. 3 :AUFLISTUNG DER OP-GRUPPEN

## 4.4 Statistik

Die Ergebnisse der Überlebenskinetiken wurden mit dem Programm SPSS nach der Kaplan-Meier-Überlebenskurve mit dem Log-Rank-Test ausgewertet. Die Ergebnisse der in vitro Analysen wurden mit dem Mann-Whitney-Test auf Signifikanz überprüft. Es wurde auf einem Signifikanzniveau von 0,05 getestet.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Grundlegende Ergebnisse aus Versuchen mit IFN- $\gamma$ Rezeptor-defizienten Mäusen

Aus früheren Versuchen ist uns bekannt, daß ein Fehlen des Rezeptors für IFN- $\gamma$  in der Maus zu einer deutlich erhöhten Letalität im CASP-Modell führt(80) (Siehe Abb. 4). In Anbetracht der Tatsache, daß die Freisetzung von IFN- $\gamma$  in erheblichem Maße von IL-12 (24, 79) und IL-18(15, 60) gesteigert werden kann, konzentrieren sich die folgenden Experimente auf die klinischen Wirkungen einer Blockierung von IL-12 beziehungsweise IL-18 . Auf diese Weise soll das

Zusammenspiel von IL-12, IL-18 und IFN- $\gamma$  während septischem Schock untersucht werden.

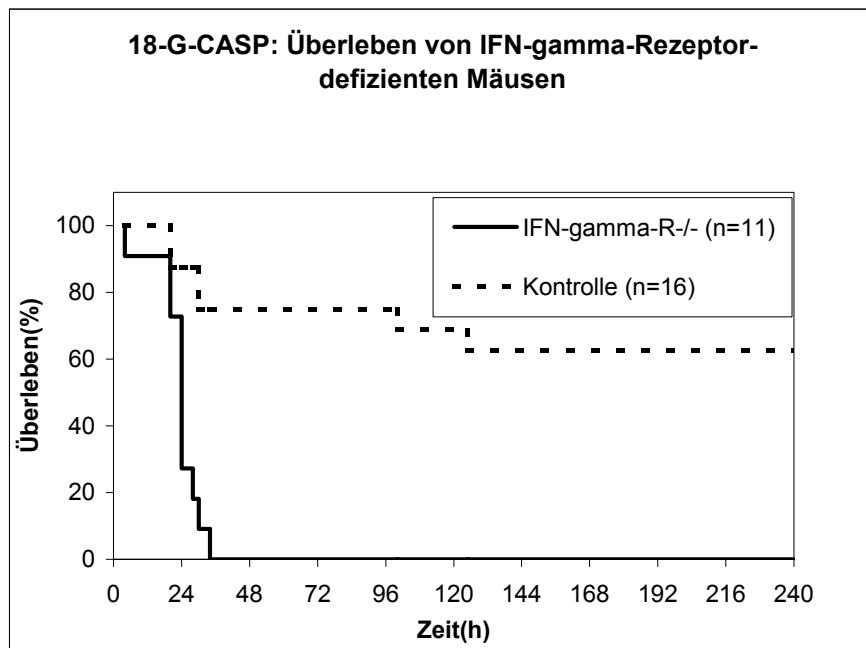


ABB.4: ÜBERLEBENSKINETIK DES IFN-GAMMA R-/- MAUSSTAMMES (HINTERGRUND C57BL/6 – 129JSv) FÜR 18G-CASP

## 5.2 Auswirkungen des IL-12 Defekts

### 5.2.1 Auswirkungen des IL-12 Defekts auf das Überleben nach CASP

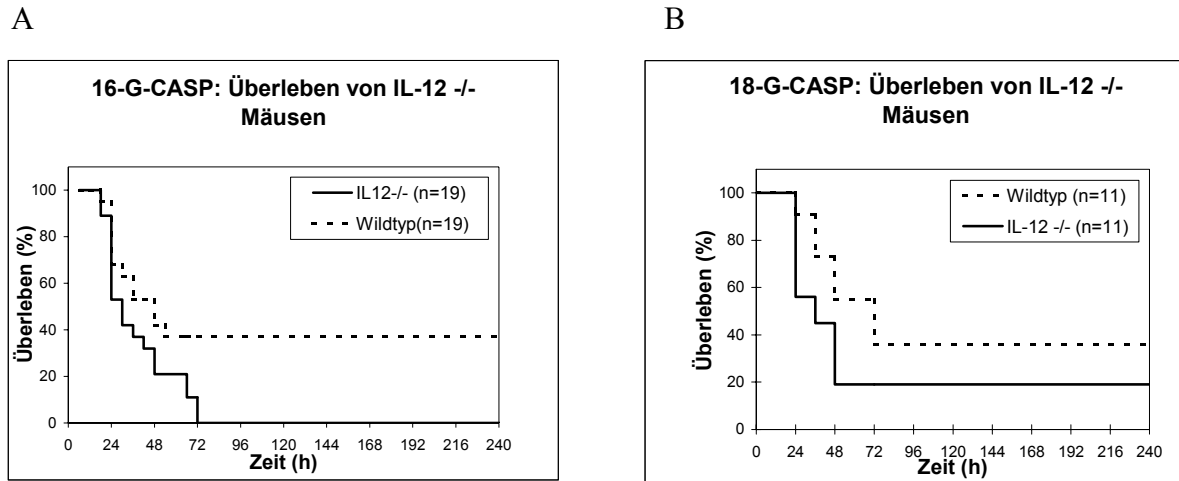


ABB.5: ÜBERLEBENSKINETIKEN DES IL-12 -/- MAUSSTAMMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VERWENDETEN STENTDICKE A: 16G; B: 18G

In obiger Abbildung ist die Überlebenskinetik der IL-12 -/- Maus im Vergleich zum WT dargestellt. Es wurde CASP mit 16G- und 18G-Stent durchgeführt und eine Gruppenstärke von 19 bzw. 11 Tieren je Versuchsgruppe gewählt. Man kann erkennen, daß IL-12 -/- Mäuse einen signifikanten Überlebensnachteil im Vergleich zu Mäusen des WT haben. Der Unterschied ist bei 16G Stent deutlicher ausgeprägt. Die subletale Operationsvariante (Stentdurchmesser 16G) bei Mäusen des Wildtyps wird bei Verwendung von IL-12 -/- Mäusen zu einer voll letalen Variante. Die Überlebensrate des Wildtyps sistiert bei 37% und bleibt bis zum Ende des Beobachtungszeitraums konstant, wohingegen nach spätestens 72 Stunden sämtliche Mäuse mit Gendefekt als nicht überlebensfähig klassifiziert wurden und schmerzlos geopfert werden mussten. Die überlebenden Tiere vom WT waren am Ende des Beobachtungszeitraums völlig unauffällig und wurden als gesund klassifiziert. Der Unterschied zwischen den Gruppen erwies sich nach der Kaplan-Meier Überlebenskurve (Log-Rang-Test) als hoch signifikant ( $\alpha < 0,018$ ).

## 5.2.2 Bakterielle Besiedelung von Leber, Lunge und Peritonealhöhle nach 16G-CASP Operation

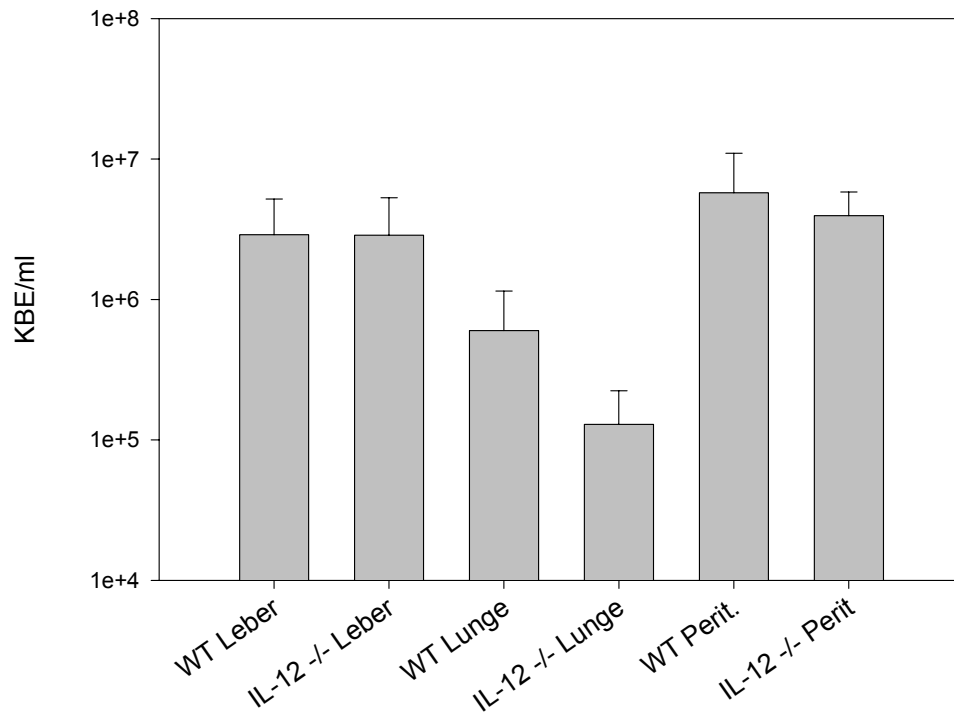


ABB. 6: ANZAHL KOLONIEBILDENDER EINHEITEN IN LEBER, LUNGE UND PERITONEALHÖHLE 16 H NACH 16G-CASP. VERGLEICH VON WILD TYPMÄUSEN (WT) UND IL-12 P40-DEFIZIENTEN TIEREN

In obiger Grafik ist ersichtlich, daß in Leber, Lunge und Peritonealflüssigkeit nach 16 Stunden keine signifikanten Unterschiede in den Bakterienzahlen bestehen. Die unterschiedlichen Bakterienzahlen in der Lunge erwiesen sich bei genauerer Betrachtung unter dem medizinisch üblichen Signifikanzniveau von 0,05 als nicht signifikant.

### 5.2.3 Immunhistologische Färbung von Lebergewebe mit Mac-1

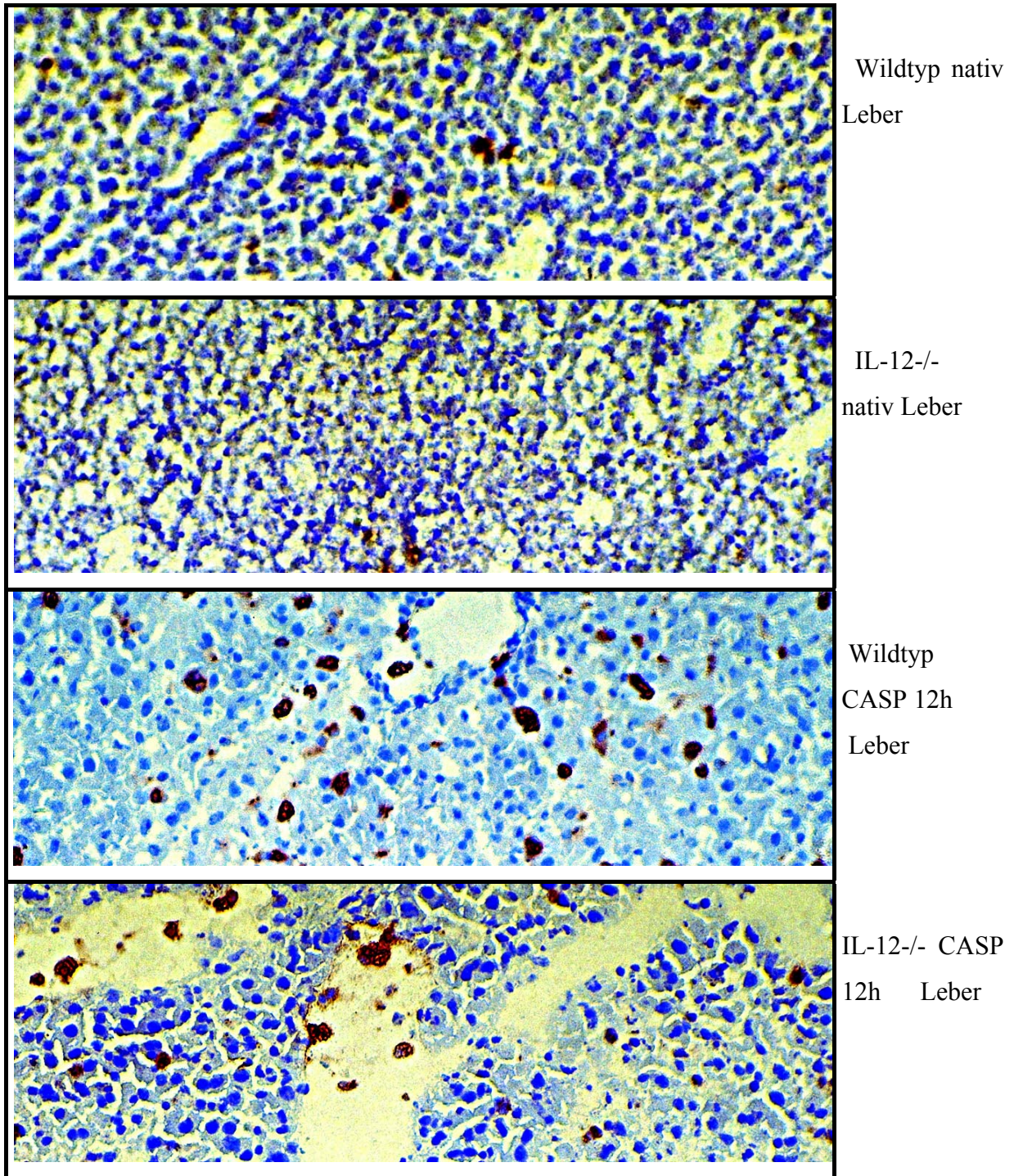


ABB. 7: IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN VON LEBERGeweBE IM IL12-/- MAUSSTAMM 12H NACH 16G- CASP  
IM VERGLEICH ZUM WILD TYP

Primärantikörper: Mac-1

Ratte-anti-Maus mAb, Hybridom, ATCC (American Type Culture Collection), Maryland, USA

Gegenfärbung:

F(ab')<sub>2</sub> Fragment: Maus Anti Ratte IgG, peroxidasekonjugiert, Dianova, Hamburg, Deutschland

Färbung: rot (Granulozyten, Makrophagen, NK Zellen)

### 5.2.4 Immunhistologische Färbung der Lungengewebe mit Mac-1

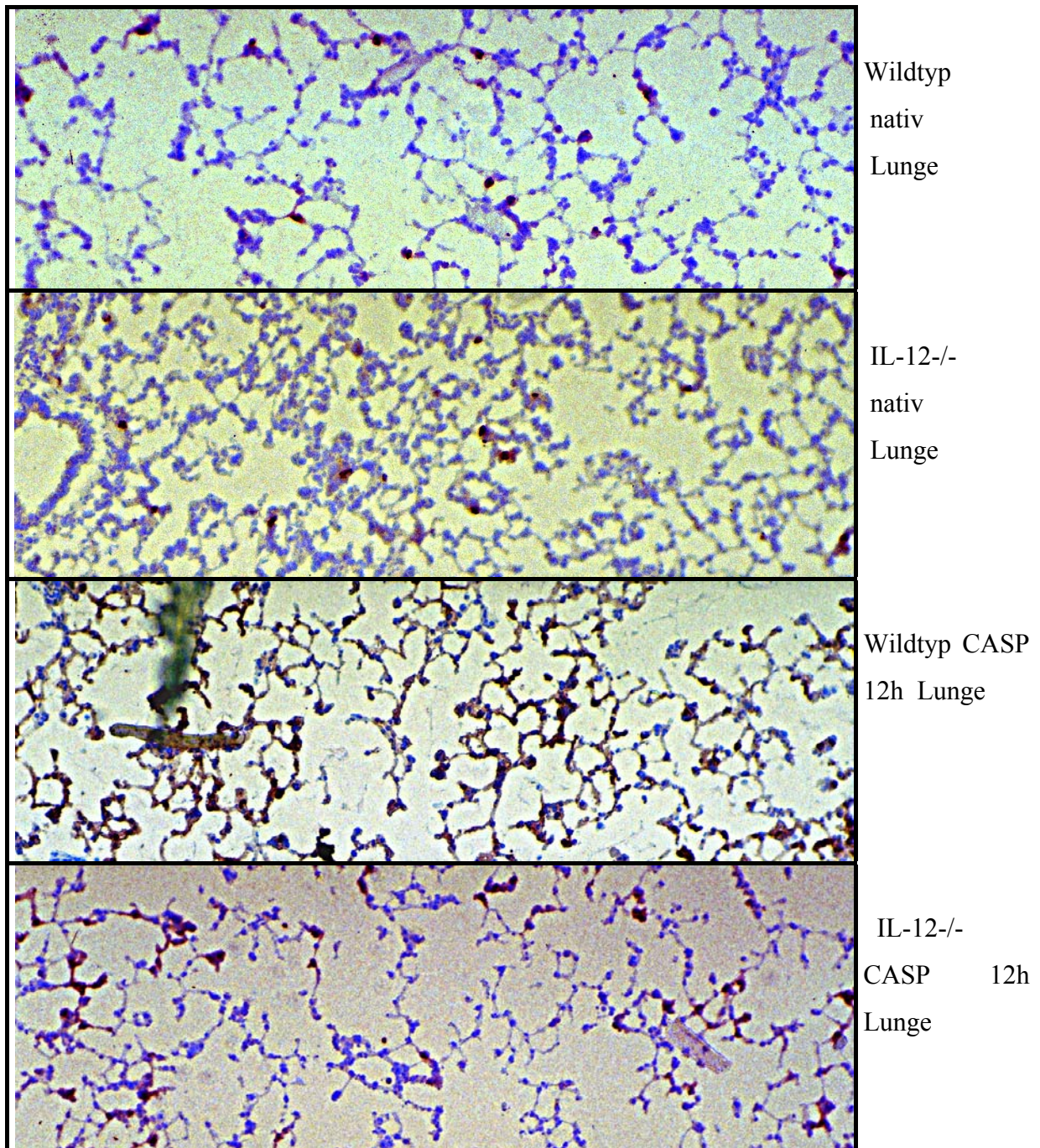


ABB.8: IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN VON LUNGENGeweBE IM IL-12-/- MAUSSTAMM 12H NACH 16G-CASP IM VERLEICH ZUM WILDTyp

Primärantikörper: Mac-1

Ratte-anti-Maus mAb, Hybridom, ATCC (American Type Culture Collection), Maryland, USA

Gegenfärbung:

F(ab')<sub>2</sub> Fragment: Maus Anti Ratte IgG, peroxidasekonjugiert, Dianova, Hamburg, Deutschland

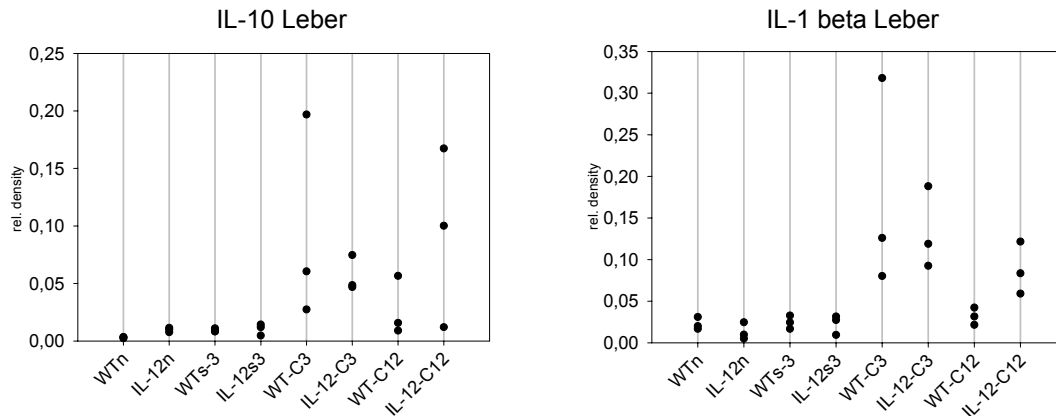
Färbung: rot (Granulozyten, Makrophagen, NK Zellen)



Obige Abbildungen zeigen Mac-1 Färbungen von Leber und Lunge. Mac-1 ist ein Antikörper, der spezifisch an Granulozyten, NK-Zellen und Makrophagen bindet. Man kann erkennen, daß 12 Stunden nach CASP in Leber und Lunge ein deutliches Infiltrat dieser Zellen vorhanden ist. In Mäusen des Wildtyps scheint es stärker ausgeprägt zu sein, als im Knock-out-Mausstamm. Dies spricht für ein stärker ausgeprägtes proinflammatorisches Geschehen in Mäusen des Wildtyps.

## 5.2.5 Zytokin- und Chemokinexpression (RNase-Protektion-Essay)

### 5.2.5.1 Zytokininduktion in der Leber



**WTn:** Wildtypmaus nativ

**IL-12n:** IL-12 p40 knock-out Maus nativ

**WTs-3:** Wildtypmaus Scheinoperation 3h postoperativ

**IL-12s3:** IL-12 p40 knock-out Maus Scheinoperation 3h postoperativ

**WT-C3:** Wildtypmaus 16G CASP 3h postoperativ

**IL-12-C3:** IL-12 p40 knock-out Maus 16G CASP 3h postoperativ

**WT-C12:** Wildtypmaus 16G CASP 12h postoperativ

**IL-12-C12:** IL-12 p40 knock-out Maus 16G CASP 12h postoperativ

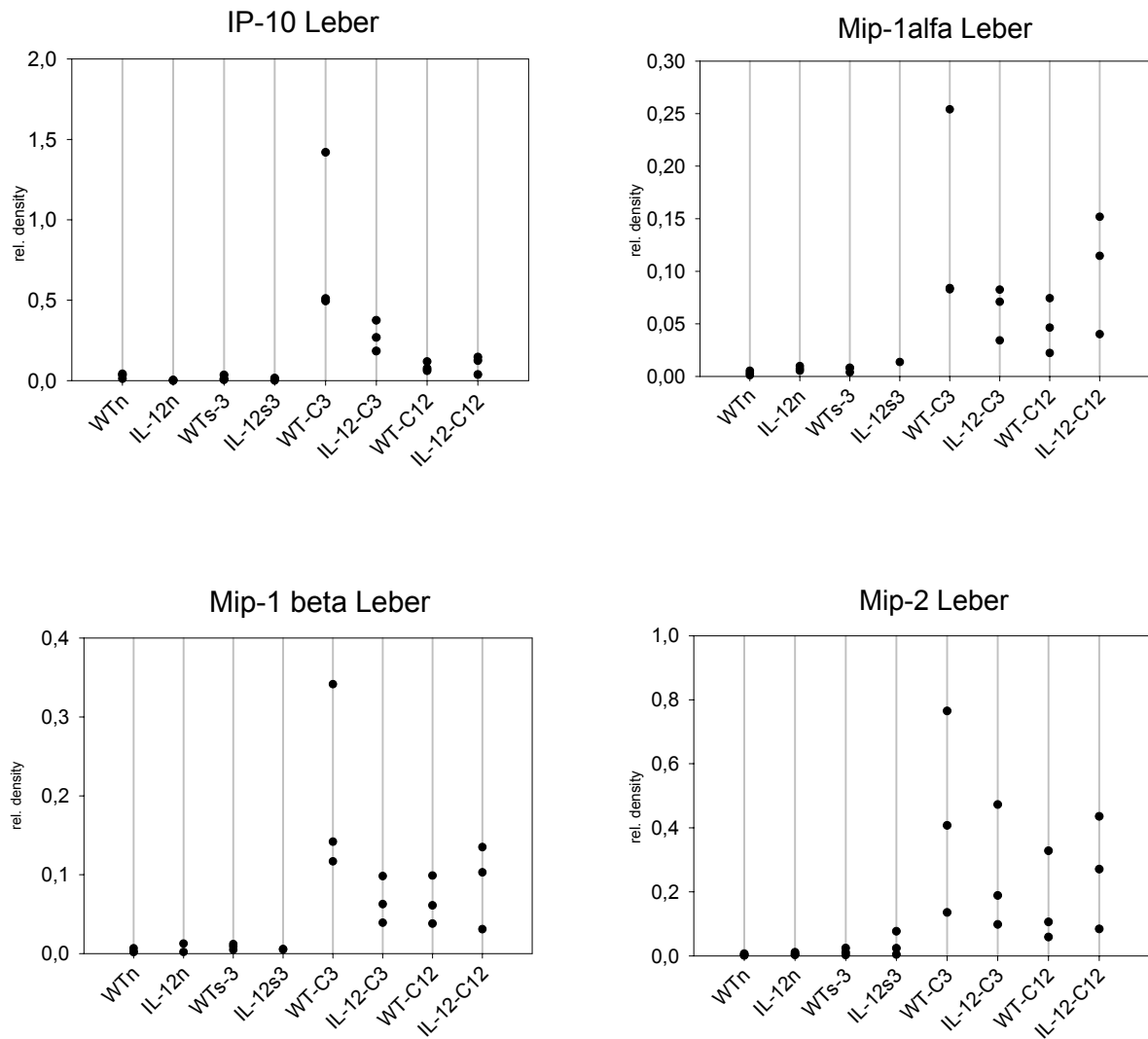
ABB. 9: ZYTKINEXPRESSION NACH CASP IN DER LEBER

Aus obigen Grafiken können folgende Aussagen abgeleitet werden:

Die Induktion von IL-1 $\beta$  und IL-10 findet bei Scheinoperationen nicht statt. Nach 3 Stunden wurden erhöhte Expressionen für IL-1 $\beta$  und IL-10 gemessen, die jedoch keine Unterschiede zwischen Versuchsgruppe und Kontrollgruppe aufwiesen.

12 Stunden nach CASP fällt der Wert für IL-1 $\beta$  bei der Kontrollgruppe auf präoperative Werte, wohingegen er sich in der Versuchsgruppe als weiterhin erhöht darstellt. IL-10 bleibt in beiden Gruppen weiterhin erhöht.

### 5.2.5.2 Chemokininduktion in der Leber



**WTn:** Wildtypmaus nativ

**IL-12n:** IL-12 p40 knock-out Maus nativ

**WTs-3:** Wildtypmaus Scheinoperation 3h postoperativ

**IL-12s3:** IL-12 p40 knock-out Maus Scheinoperation 3h postoperativ

**WT-C3:** Wildtypmaus 16G CASP 3h postoperativ

**IL-12-C3:** IL-12 p40 knock-out Maus 16G CASP 3h postoperativ

**WT-C12:** Wildtypmaus 16G CASP 12h postoperativ

**IL-12-C12:** IL-12 p40 knock-out Maus 16G CASP 12h postoperativ

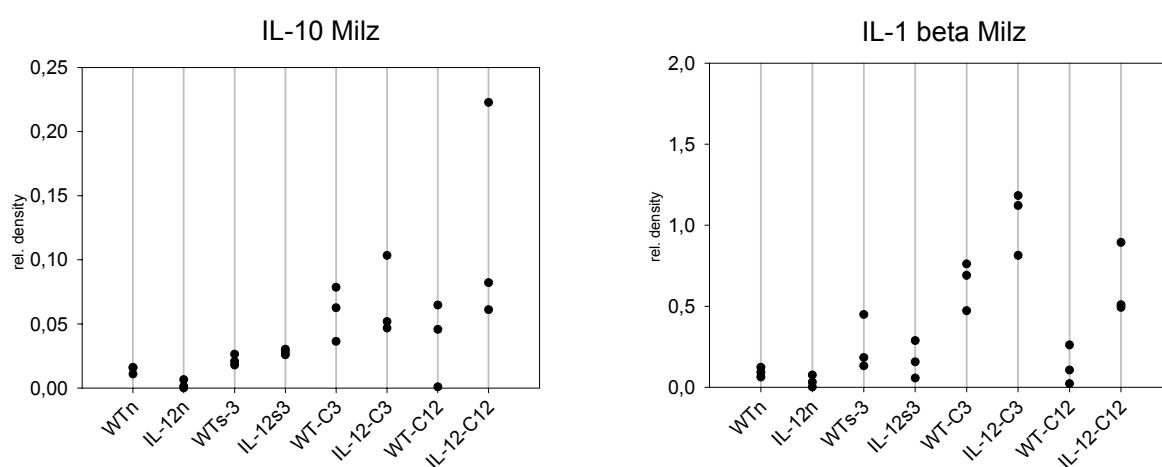
ABB. 10: CHEMOKINEXPRESSION IN DER LEBER

Bei der Scheinoperation wird keines der gemessenen Chemokine induziert. Mip-2 wird in beiden Versuchsgruppen nach CASP induziert, wobei nach 3 Stunden kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vorliegt.

IP-10, Mip-1 $\alpha$  und Mip-1 $\beta$  sind nach 3 Stunden in der Kontrollgruppe deutlich stärker exprimiert, als in der Versuchsgruppe.

Nach 12h finden sich für IP-10 wieder basale präoperative Meßwerte. Mip-1 $\alpha$ , Mip-1 $\beta$  und Mip-2 zeigen weiterhin erhöhte Expression. Es besteht aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

### 5.2.5.3 Zytokininduktion in der Milz



**WTn:** Wildtypmaus nativ

**IL-12n:** IL-12 p40 knock-out Maus nativ

**WTs-3:** Wildtypmaus Scheinoperation 3h postoperativ

**IL-12s3:** IL-12 p40 knock-out Maus Scheinoperation 3h postoperativ

**WT-C3:** Wildtypmaus 16G CASP 3h postoperativ

**IL-12-C3:** IL-12 p40 knock-out Maus 16G CASP 3h postoperativ

**WT-C12:** Wildtypmaus 16G CASP 12h postoperativ

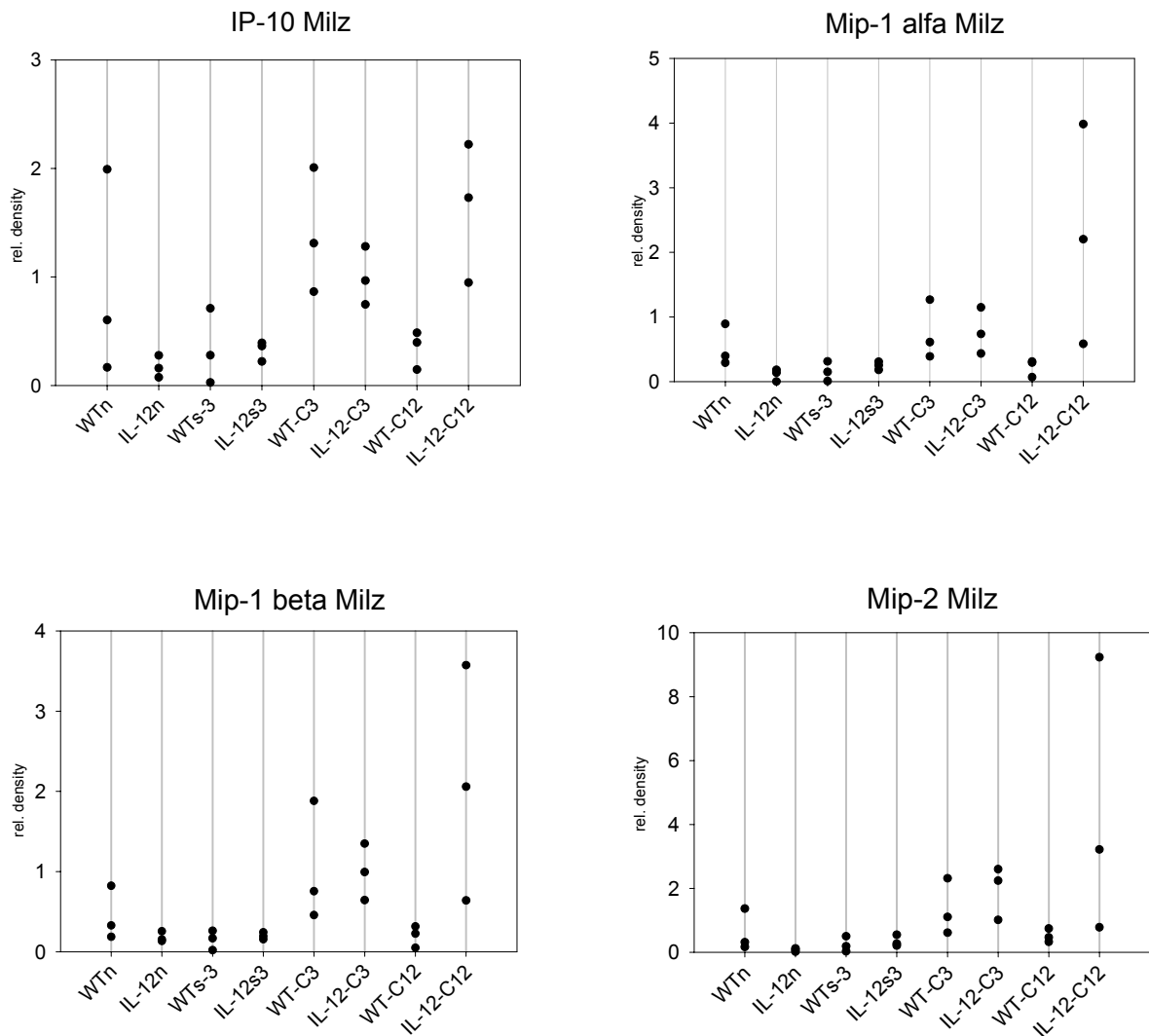
**IL-12-C12:** IL-12 p40 knock-out Maus 16G CASP 12h postoperativ

ABB. 11: ZYTOKINEXPRESSION IN DER MILZ

3h postoperativ findet sich in beiden Gruppen eine signifikante Induktion von IL-1 $\beta$  und IL-10 im Vergleich zu den präoperativen Werten, wobei für IL-1 $\beta$  in der IL-12 defizienten Maus eine verstärkte Expression gegenüber dem Wildtyp nachgewiesen werden konnte.

12h postoperativ ist IL-1 $\beta$  bei IL-12 defizienten Tieren weiterhin hoch exprimiert, wohingegen IL-1 $\beta$  beim Wildtyp wieder auf Ausgangsniveau zurückgeht. IL-10 wurde tendenziell ähnlich exprimiert wie IL-1 $\beta$ , es ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchsgruppe und Kontrollgruppe.

### 5.2.5.4 Chemokininduktion in der Milz



**WTn:** Wildtypmaus nativ

**WTn:** Wildtypmaus nativ

**IL-12n:** IL-12 p40 knock-out Maus nativ

**WTs-3:** Wildtypmaus Scheinoperation 3h postoperativ

**IL-12s3:** IL-12 p40 knock-out Maus Scheinoperation 3h postoperativ

**WT-C3:** Wildtypmaus 16G CASP 3h postoperativ

**IL-12-C3:** IL-12 p40 knock-out Maus 16G CASP 3h postoperativ

**WT-C12:** Wildtypmaus 16G CASP 12h postoperativ

**IL-12-C12:** IL-12 p40 knock-out Maus 16G CASP 12h postoperativ

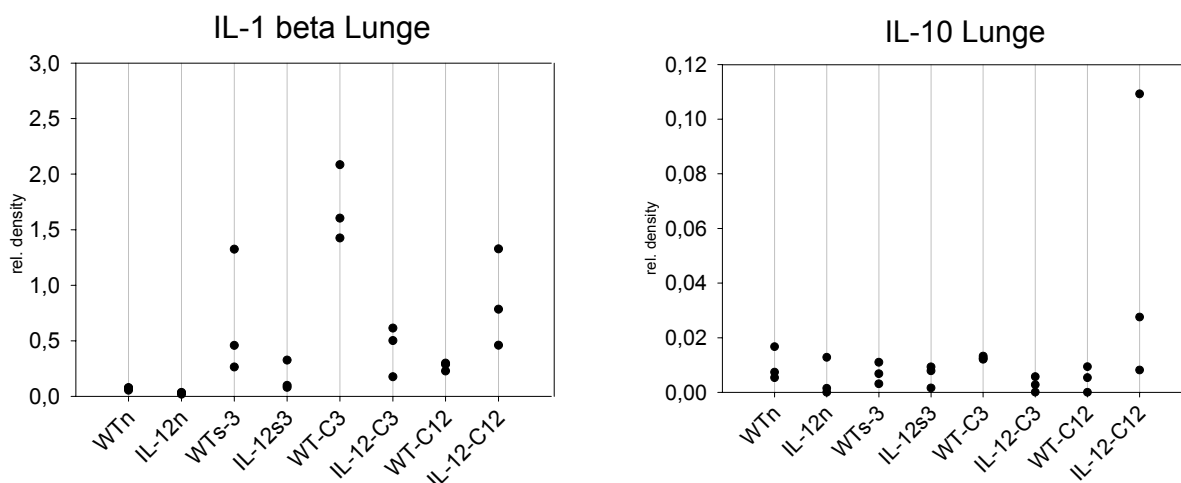
ABB. 12: CHEMOKINEXPRESSION IN DER MILZ

Es konnte gezeigt werden, daß IP-10 und Mip-1 $\alpha$  in nativen Wildtypmäusen im Vergleich zu IL-12 defizienten Tieren deutlich induziert sind.

3 Stunden nach CASP zeigte sich eine deutliche Expression von IP-10, Mip-1 $\alpha$ , Mip-1 $\beta$ , und Mip2. Es konnten aber keine Unterschiede zwischen Versuchsgruppe und Kontrollgruppe festgestellt werden.

12 Stunden postoperativ findet im Wildtyp keine erhöhte Expression von IP-10, Mip-1 $\alpha$ , Mip-1 $\beta$ , und Mip2 mehr statt. In der IL-12 defizienten Maus wurde hingegen weiterhin verstärkte Expression von IP-10, Mip-1 $\alpha$ , Mip-1 $\beta$ , und Mip2 gemessen. Im Vergleich zum 3 Stundenwert war für IP-10, Mip-1 $\alpha$ , Mip-1 $\beta$ , und Mip2 nach 12 Stunden eine tendenziell stärkere Induktion gemessen worden. Die Unterschiede erwiesen sich aber als nicht signifikant.

### 5.2.5.5 Zytokininduktion in der Lunge



**WTn:** Wildtypmaus nativ

**IL-12n:** IL-12 p40 knock-out Maus nativ

**WTs-3:** Wildtypmaus Scheinoperation 3h postoperativ

**IL-12s3:** IL-12 p40 knock-out Maus Scheinoperation 3h postoperativ

**WT-C3:** Wildtypmaus 16G CASP 3h postoperativ

**IL-12-C3:** IL-12 p40 knock-out Maus 16G CASP 3h postoperativ

**WT-C12:** Wildtypmaus 16G CASP 12h postoperativ

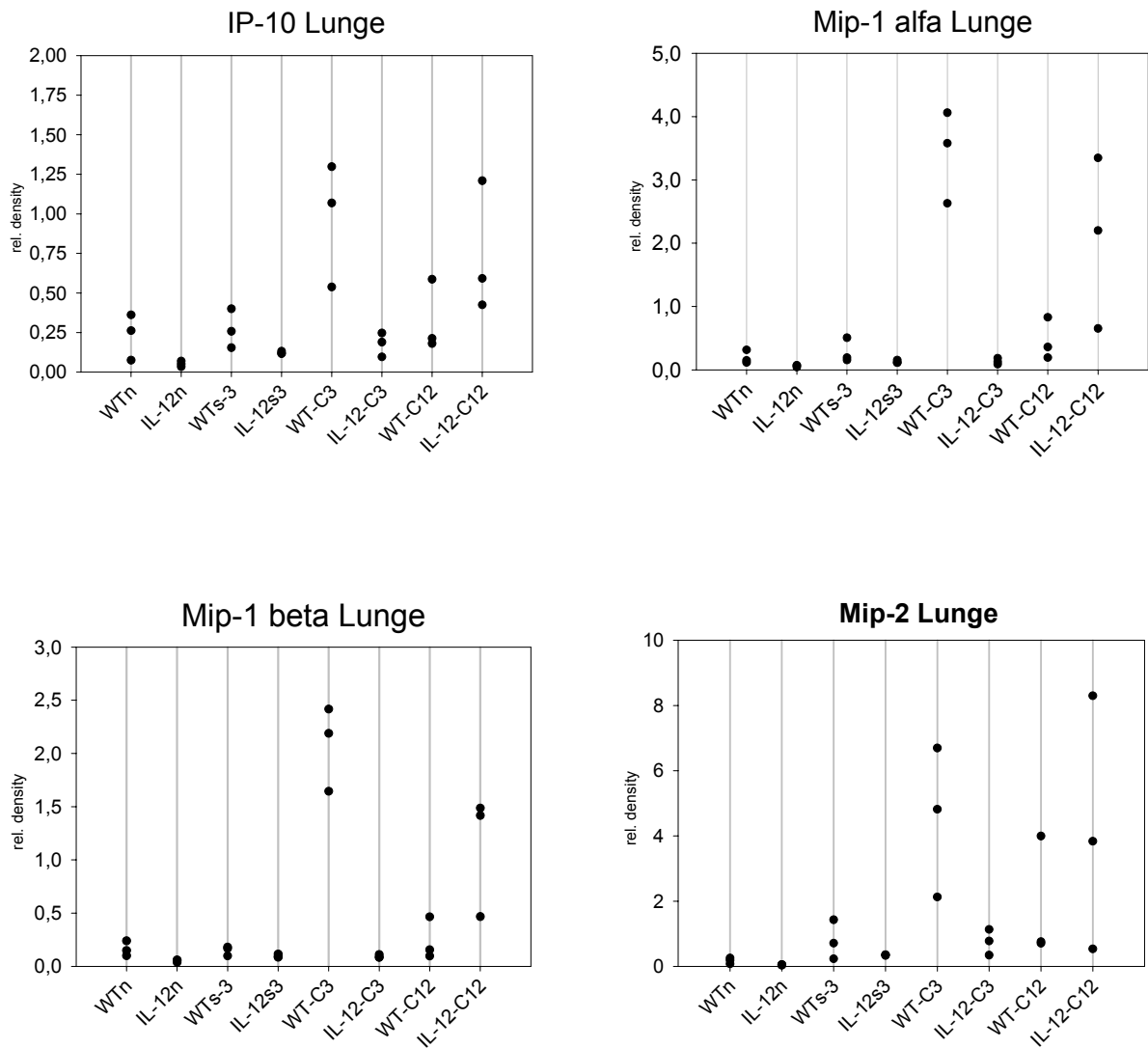
**IL-12-C12:** IL-12 p40 knock-out Maus 16G CASP 12h postoperativ

ABB. 13: ZYTOKINEXPRESSION IN DER LUNGE

3 h postoperativ zeigt sich für IL 1- $\beta$  eine deutlich stärkere Expression in der Wildtypmaus als in der IL-12 defizienten Maus. Für IL-10 ist keine Induktion im Vergleich zur nativen Maus nachweisbar.

12 h postoperativ ist im Wildtyp weder für IL-10 noch für IL 1- $\beta$  erhöhte Expression nachzuweisen. Für die IL-12 defiziente Maus zeigt sich sowohl für IL-10 als auch IL 1- $\beta$  weiterhin erhöhte Expression, die im Vergleich zum 3 Stunden-Wert nach 12 Stunden einen höheren Wert zeigen. Im Wildtyp zeigt sich nach 12 Stunden keine Expression von IL 1- $\beta$ . IL-10 wurde nur in IL-12-/- Tieren nach 12 h als erhöht gemessen, beim Wildtyp zeigte sich ein Abfall auf präoperatives Niveau.

### 5.2.5.6 Chemokininduktion in der Lunge



**WTn:** Wildtypmaus nativ  
**IL-12n:** IL-12 p40 knock-out Maus nativ  
**WTs-3:** Wildtypmaus Scheinoperation 3h postoperativ  
**IL-12s3:** IL-12 p40 knock-out Maus Scheinoperation 3h postoperativ  
**WT-C3:** Wildtypmaus 16G CASP 3h postoperativ  
**IL-12-C3:** IL-12 p40 knock-out Maus 16G CASP 3h postoperativ  
**WT-C12:** Wildtypmaus 16G CASP 12h postoperativ  
**IL-12-C12:** IL-12 p40 knock-out Maus 16G CASP 12h postoperativ

ABB. 14: CHEMOKINEXPRESSION IN DER LUNGE

3 Stunden nach CASP wurde nur in Mäusen des Wildtyps IP-10, Mip-1 $\alpha$  und Mip-1 $\beta$  induziert. In der IL-12 defizienten Maus zeigt sich keine Expression gemessener Chemokine nach 3 Stunden.



Nach 12 Stunden zeigt sich eine deutliche Induktion von IP-10, Mip-1 $\alpha$ , Mip-1 $\beta$  und Mip-2 in beiden Gruppen. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ergeben sich bei Betrachtung von Mip-1 $\beta$ . Hier wurde eine deutlich stärkere Induktion von Mip-1 $\beta$  beim knock-out-Mausstamm gemessen. Bei Vergleich mit dem 3 Stunden-Wert zeigen sich für Mip-1 $\alpha$  und Mip-1 $\beta$  in Mäusen des Wildtyps eine Abschwächung der Expression fast auf Ausgangsniveau.

#### ***5.2.5.7 Zytokininduktion in der Niere***

In der Niere wurde nach 3 und 12h eine Induktion der untersuchten Zytokine und Chemokine gemessen, es ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den 2 Gruppen. Die Daten wurden deshalb nicht dargestellt.

### 5.3 Auswirkungen von Antikörpern gegen IL-18

#### 5.3.1 Auswirkungen von polyklonalen Antikörpern gegen IL-18 auf das Überleben nach CASP

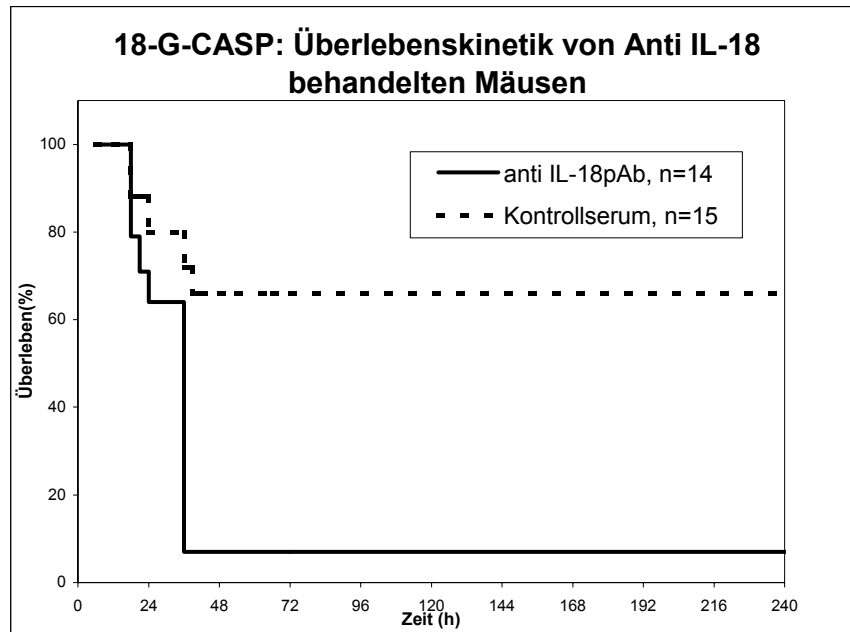


ABB. 15: ÜBERLEBENSKINETIK DER AIL-18 BEHANDELTEN MAUS

In obiger Grafik ist ersichtlich, daß Mäuse, die mit einem polyklonalem Antikörper gegen IL-18 behandelt wurden, einen erheblichen Überlebensnachteil gegenüber Mäusen haben, die mit Kontrollserum behandelt wurden. Ab ca. 30 Stunden sistieren beide Kurven bei ihren Endwerten. Vom Wiltyp überleben langfristig 66% der Tiere, von der Versuchsgruppe überleben langfristig 7%. Die Unterschiede in den Gruppen sind nach Kaplan-Meier-Überlebenskurve (Log-Rang-Test) hoch signifikant ( $\alpha < 0,005$ ).

### 5.3.2 Bakterielle Besiedelung von Leber, Lunge, Milz und Peritonealhöhle nach CASP Operation

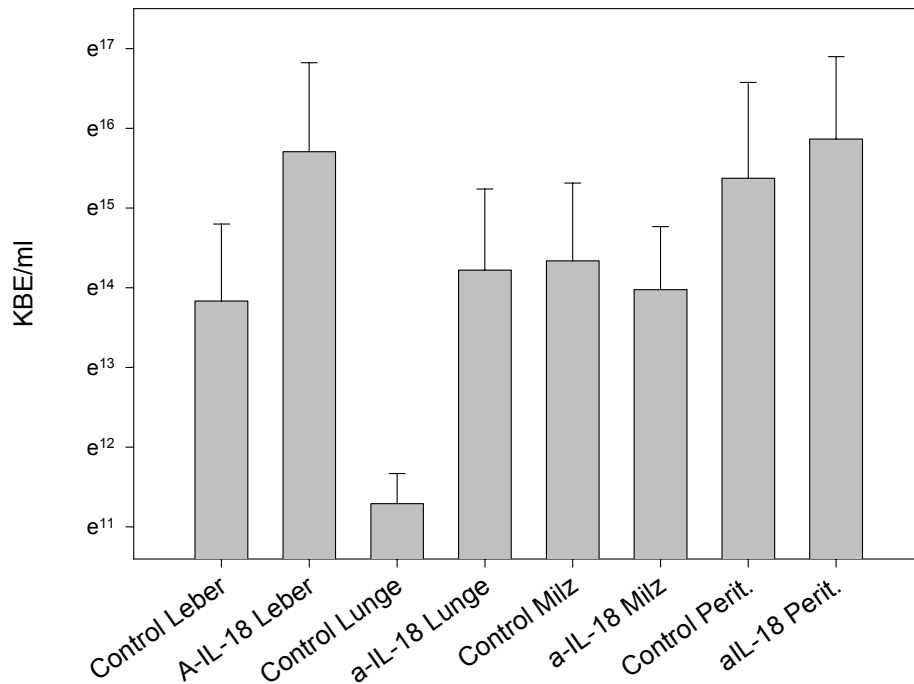
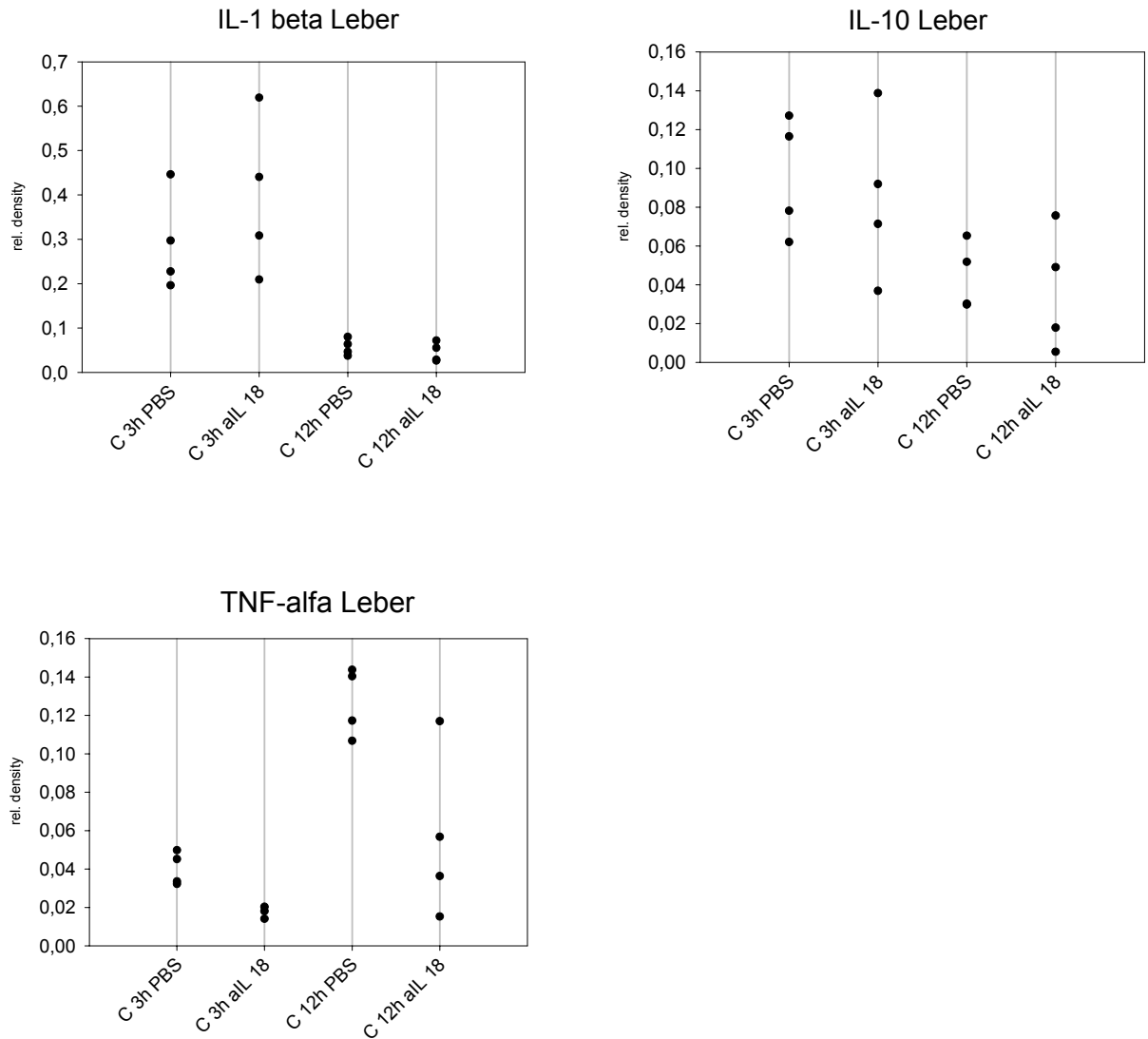


ABB. 16: ANZAHL KOLONIEBILDENDER EINHEITEN IN LEBER, LUNGE, MILZ UND PERITONEALHÖHLE 16H NACH 18G-CASP. VERGLEICH VON WILDTPYMÄUSEN(CONTROL) UND MÄUSEN, DIE PERIOPERATIV MIT EINEM POLYKLONALEN ANTIKÖRPER GEGEN IL-18 (A-IL-18) BEHANDELT WORDEN WAREN

In obiger Grafik ist ersichtlich, daß in den Versuchsgruppen in Leber und Lunge unterschiedliche Bakterienzahlen nachweisbar sind. In Leber und Lunge von Mäusen, die mit einem Antikörper gegen IL-18 vorbehandelt worden sind, finden sich im Vergleich zur Kontrollgruppe weit mehr Bakterien. Die Unterschiede erweisen sich als hoch signifikant. ( $\alpha < 0,05$ ). Für Peritonealflüssigkeit und Milz ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

### 5.3.3 Zytokin- und Chemokinexpression (RNase-Protektion-Essay)

#### 5.3.3.1 Zytokininduktion in der Leber



**C 3h PBS:** Kontrollgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum ohne Antikörper perioperativ) 3h nach 18G CASP

**C 3h a IL 18:** Versuchsgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum mit anti IL-18 perioperativ) 3h nach 18G CASP

**C 12h PBS:** Kontrollgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum ohne Antikörper perioperativ) 12h nach 18G CASP

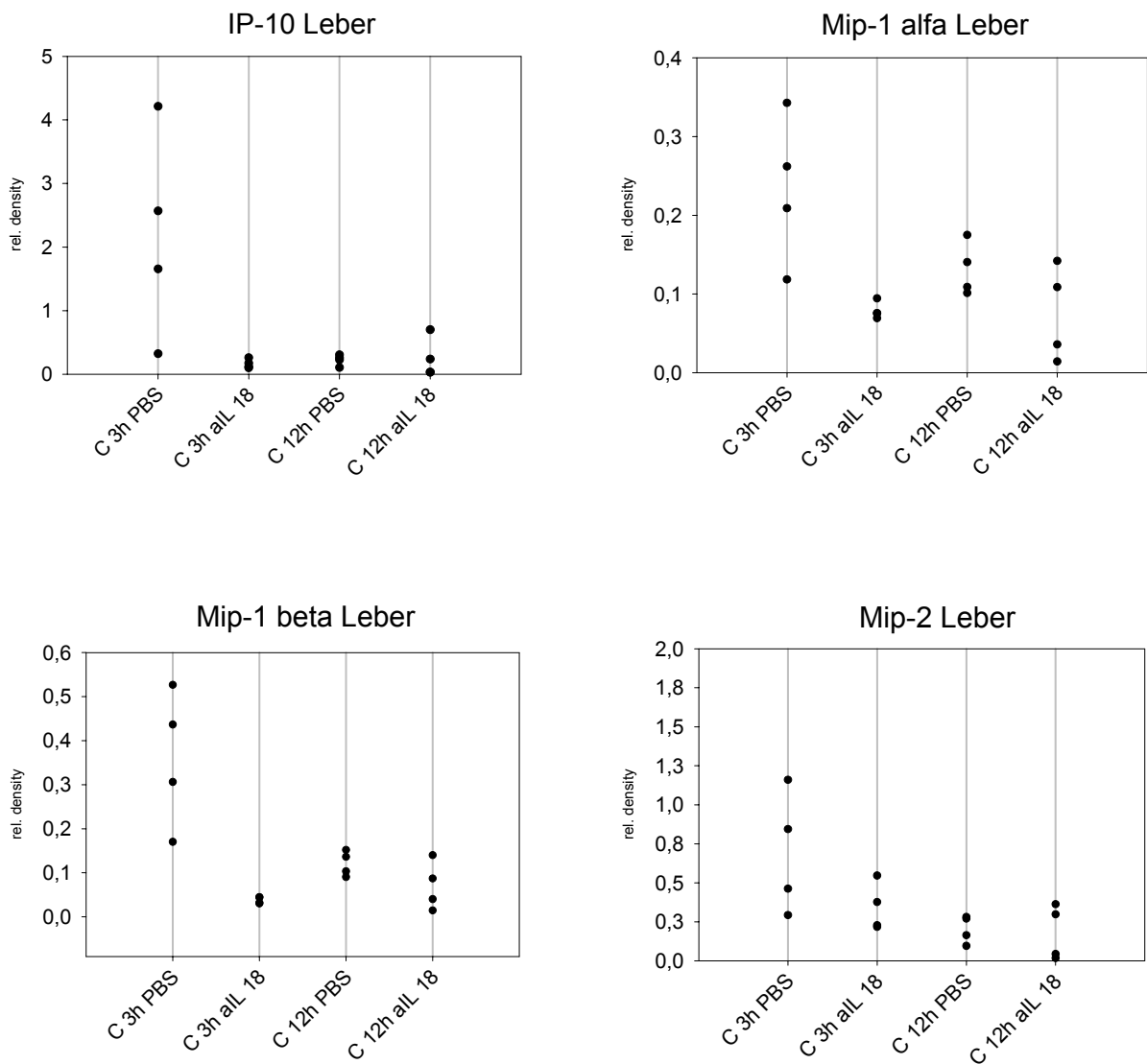
**C 12h a IL18:** Versuchsgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum mit anti-IL-18 perioperativ) 12h nach 18G CASP

ABB. 17: ZYTOKINEXPRESSION IN DER LEBER

3 Stunden postoperativ wurde für IL-10, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  in beiden Gruppen eine verstärkte Expression nachgewiesen. Ein Unterschied zwischen den Gruppen ließ sich hierbei nicht feststellen. TNF- $\alpha$  war in der Versuchsgruppe deutlich schwächer exprimiert als in der Kontrollgruppe.

12 Stunden nach CASP zeigt sich für beide Gruppen ein Rückgang der Induktion von IL-1 $\beta$  auf Werte von nativen Mäusen. IL-10 und TNF- $\alpha$  erwiesen sich weiterhin deutlich erhöht, wobei bei TNF- $\alpha$  eine deutliche Verstärkung der Expression im Vergleich zum 3 Stunden-Wert besteht, wohingegen bei IL-10 ein Abfall der Expression für beide Gruppen zu verzeichnen ist.

### 5.3.3.2 Chemokininduktion in der Leber



**C 3h PBS:** Kontrollgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum ohne Antikörper perioperativ) 3h nach 18G CASP

**C 3h a IL 18:** Versuchsgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum mit anti IL-18 perioperativ) 3h nach 18G CASP

**C 12h PBS:** Kontrollgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum ohne Antikörper perioperativ) 12h nach 18G CASP

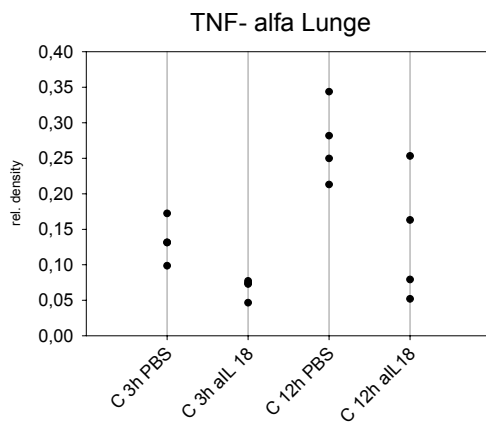
**C 12h a IL18:** Versuchsgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum mit anti-IL-18 perioperativ) 12h nach 18G CASP

ABB. 18: CHEMOKINEXPRESSION IN DER LEBER

3 Stunden postoperativ sind IP-10, Mip-1- $\alpha$  und Mip-1- $\beta$  in der aIL-18 behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich supprimiert. Bei Mip-2 ergibt sich kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen.

12 Stunden nach CASP finden sich keine signifikanten Unterschiede der gemessenen Chemokinexpressionen zwischen den Gruppen.

### 5.3.3.3 Zytokininduktion in der Lunge



**C 3h PBS:** Kontrollgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum ohne Antikörper perioperativ) 3h nach 18G CASP

**C 3h a IL 18:** Versuchsgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum mit anti IL-18 perioperativ) 3h nach 18G CASP

**C 12h PBS:** Kontrollgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum ohne Antikörper perioperativ) 12h nach 18G CASP

**C 12h a IL18:** Versuchsgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum mit anti-IL-18 perioperativ) 12h nach 18G CASP

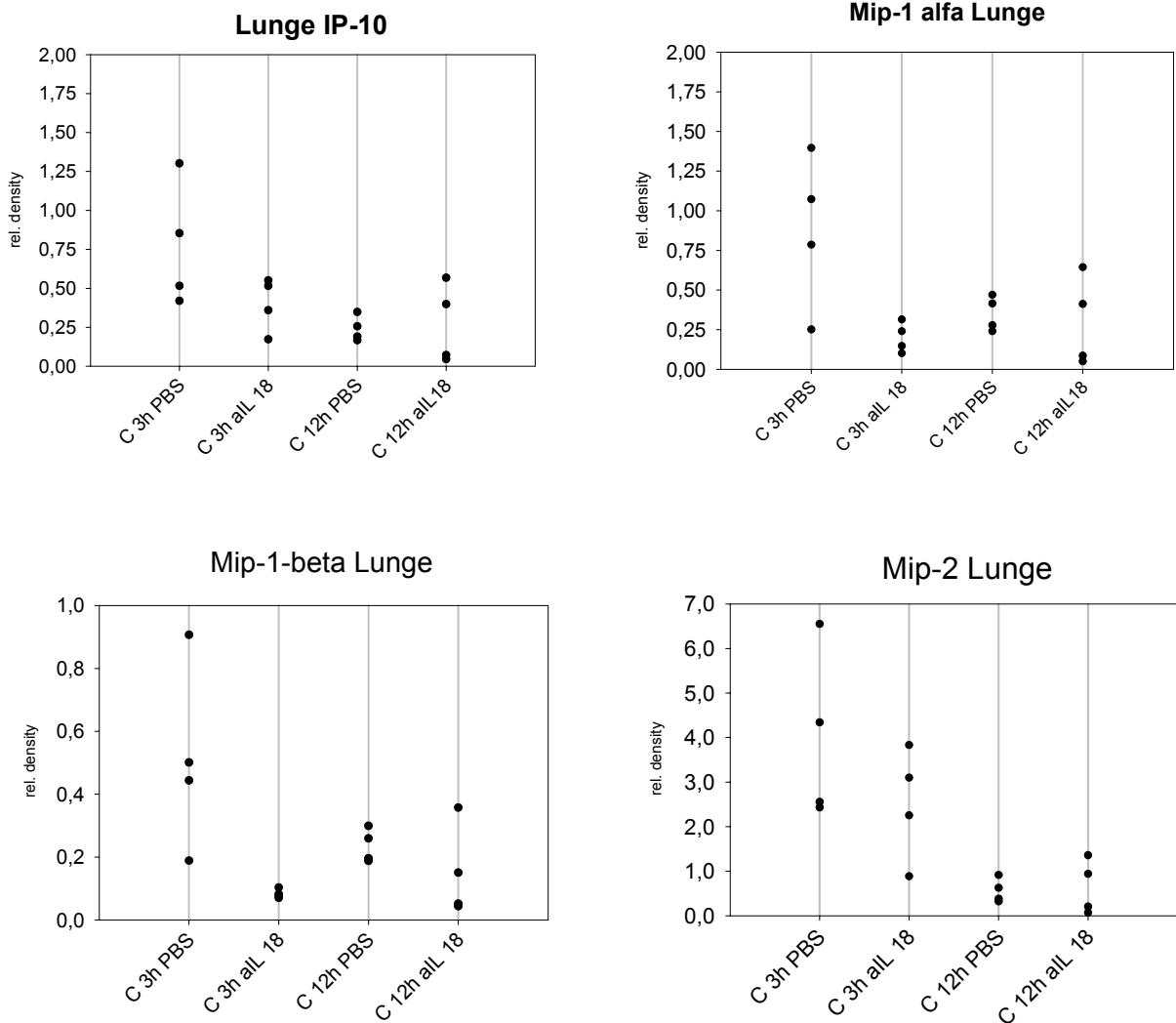
ABB. 19: ZYTOKINEXPRESSION IN DER LUNGE

(IL-10 und IL-1- $\beta$  waren in diesem Versuch auch nach 2 maliger Wiederholung des Essays nicht nachweisbar)

3 Stunden postoperativ zeigte sich eine deutlich stärkere Expression von TNF- $\alpha$  in Mäusen des Wildtyps als in der Versuchsgruppe.

Nach 12 Stunden konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von TNF- $\alpha$  zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Im Vergleich zum 3 Stundenwert zeigen sich in beiden Gruppen beim 12 Stundenwert für TNF- $\alpha$  eine stärkere Expression.

### 5.3.3.4 Chemokininduktion in der Lunge



**C 3h PBS:** Kontrollgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum ohne Antikörper perioperativ) 3h nach 18G CASP

**C 3h a IL 18:** Versuchsgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum mit anti IL-18 perioperativ) 3h nach 18G CASP

**C 12h PBS:** Kontrollgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum ohne Antikörper perioperativ) 12h nach 18G CASP

**C 12h a IL18:** Versuchsgruppe (Verabreichung von Kaninchenserum mit anti-IL-18 perioperativ) 12h nach 18G CASP

ABB. 20: CHEMOKINEXPRESSION IN DER LUNGE

3 Stunden nach CASP zeigte sich sowohl bei IP-10 und Mip-1 $\alpha$ , wie auch bei Mip-1 $\beta$  und Mip-2 in beiden Gruppen eine deutliche Induktion. Unterschiede zwischen Versuchsgruppe und Kontrollgruppe waren bei Mip-1 $\alpha$  und Mip-1 $\beta$  zu erkennen. Hierbei zeigte sich, daß bei beiden Chemokinen in der Kontrollgruppe eine deutlich stärkere Expression erfolgt.



12 Stunden nach CASP ergaben sich weder für IP-10 und Mip-1 $\alpha$ , noch für Mip-1 $\beta$  und Mip-2 signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Expression von Mip-2 war in beiden Gruppen gegenüber dem 3h-Wert deutlich vermindert.

## 6 Diskussion

Vorliegende Dissertation beschäftigt sich an Hand eines Tiermodells für den septischen Schock nach Colonperforation mit der Rolle von IL-12 und IL-18 während der Sepsis. Beide Zytokine sind an der Aktivierung von Makrophagen, T-Lymphozyten und NK-Zellen(38) beteiligt. Makrophagen stellen eine Hauptquelle für IL-1, TNF- $\alpha$  und IL-6, den Schlüsselzytokinen mit proinflammatorischer Funktion während postoperativer Sepsis, dar(2). Sie sind zum einen für die suffiziente Bekämpfung von Pathogenen im Körper notwendig, zum anderen vermitteln sie aber auch deletäre Effekte einer übersteigerten Immunantwort auf den Organismus (62). In früheren Tiermodellen war es nicht gelungen, sich der Klinik genügend zu nähern, um die Situation des Patienten mit postoperativer Sepsis zu simulieren. Diese Studien beleuchteten im allgemeinen nur eine Seite des pathologischen Geschehens während Sepsis: Die übersteigerte Inflammation, durch die der Körper geschädigt wird(17, 32, 53), oder aber das massive Wachstum von Bakterien, das zu einer Paralyse des Immunsystems führt(58). Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, mit einem geeigneten Tiermodell, das keine der beiden Standpunkte favorisiert, mehr Klarheit über den zeitlichen Verlauf von septischem Schock und die damit verbundene Freisetzung von Entzündungsmediatoren zu gewinnen. Besonderes Interesse galt der Rolle von IL-12 und IL-18 in diesem Modell.

Frühere Versuche anderer Gruppen haben gezeigt, daß die Blockierung von IL-12 durch Antikörper bei LPS-Schock in der Maus zu einem Überlebensvorteil der behandelten Tiere führt (47). Betrachtet man aber verschiedene Infektionsmodelle mit lebenden Bakterien, so führt die Blockierung von IL-12 mit Antikörpern in zahlreichen Tiermodellen zu einer Zunahme der Letalität und der Bakterienzahlen in der Maus (27, 82). Bei einem Infektionsmodell mit Yersinien wurde gezeigt, daß ein Therapieversuch mit rekombinantem IL-12 bei Mäusen des Wildtyps einen Überlebensvorteil mit sich bringt, wohingegen bei Verwendung von IFN- $\gamma$ -/- Mäusen kein Effekt zu verzeichnen war(8). Dies legt den Schluß nahe, daß bei akuten bakteriellen Infektionen im Anfangsstadium hohe Konzentrationen von IL-12 protektiv wirken, dieser Effekt aber scheinbar auf die vermehrte Sekretion von IFN- $\gamma$  zurückzuführen ist. Im CLP Modell führt eine Blockierung von IL-12 mit einem polyklonalen Antikörper gegen IL-12 in der Maus zu einer Zunahme der Letalität und der Anzahl von Bakterien in der Peritonealhöhle(68).

Die Ergebnisse unserer Überlebenskinetiken zeigen, daß Mäuse, denen IL-12 Expression und somit die Produktion von biologisch wirksamem IL-12 von Geburt an fehlt (IL-12 -/-), in dem Sepsismodell CASP einen eindeutigen Überlebensnachteil haben. Bei Berücksichtigung der Versuche anderer Gruppen kann das CASP Modell somit eher in die Reihe der Infektionsmodelle eingeordnet werden, in dem die Versuchstiere an einem massiven Wachstum von Bakterien leiden und an einer Insuffizienz des Immunsystems versterben.

Im LPS-Modell hat man es mit einem Schock zu tun, der durch LPS ausgelöst wird, das in einer bestimmten Menge vorliegt, und sich nicht vermehren kann. Es ist nachvollziehbar, daß in einem solchen Fall eine antiinflammatorische Therapie, beispielsweise Immunsuppression, ein geeigneter Therapieansatz ist. Immunsuppression verhindert die deletären Effekte von LPS, die durch Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen vermittelt werden(64) ohne Gefahr eines massiven Bakterienwachstums, da keine Bakterien vorliegen. Im Falle von Sepsismodellen mit vermehrungsfähigen Bakterien ist die Situation aber eine andere. Dort bringt eine immunsuppressive Therapie gleichzeitig die Gefahr der ungehemmten Vermehrung von Bakterien mit sich. (82).

Es ist in der CLP nachgewiesen, daß die Blockierung von IL-12 mit einem Antikörper zu verminderter Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch NK- und T-Zellen führt(68). Als Schlüsselzytokin der angeborenen Immunantwort führt IFN- $\gamma$  in Makrophagen zu einer gesteigerten TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ - Sekretion und stimuliert die bakterienabtötende Wirkung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen(25).

Bei Betrachtung der Zytokininduktion fällt auf, daß in der Lunge das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  nach 3 Stunden bei beiden Gruppen deutlich unterschiedlich induziert ist. Bei dem Knock-out Mausstamm scheint die Entzündung noch nicht begonnen zu haben, während sie im Wildtyp schon in vollem Gange ist.

Nach 12 Stunden ist IL-1 $\beta$  in Leber, Milz und Lunge beim WT auf normale Werte zurückgegangen, bei der IL-12-/- bleibt es weiterhin hoch bzw. ist sogar zwischen 3 Stunden und 12 Stunden noch angestiegen. Dies legt den Schluß nahe, daß bei IL-12-/- die Entzündungsreaktion später beginnt. Bei Betrachtung der Hauptproduzenten für IL-1, den Makrophagen, kann man folgern, daß bei Mangel an IL-12 die Aktivierung der Makrophagen am Zeitpunkt 3 Stunden nur insuffizient erfolgt ist. Nach 12 Stunden jedoch findet auch bei den IL-12-/- Mäusen eine Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen statt. Es ist denkbar, daß in der IL-12 -/- am Anfang der Sepsis nur eine insuffiziente Bekämpfung der Bakterien stattfindet, und die Bakterienzahlen somit bei der Knock-out Maus höher sind als

im Wildtyp. Dies würde die Versuche mit anti-IL-12 Antikörper in einem Bakterieninjektionsmodell bestätigen(82).

Die immunhistologischen Untersuchungen zeigen 12 Stunden nach CASP in Leber und Lunge in beiden Gruppen ein deutliches Infiltrat. In Mäusen des Wildtyps scheint ein dichteres Infiltrat vorzuliegen, als in der IL-12 defizienten Gruppe. Dies könnte das Korrelat für eine verspätete proinflammatorische Reaktion in IL-12 defizienten Mäusen darstellen.

Bei Betrachtung der Chemokine fällt auf, daß in der Leber der IL-12  $-/-$  als einzigem Organ sowohl CXC, als auch CC- Chemokine nach 3 Stunden induziert werden. Beim Wildtyp hingegen ist dies in allen Organen zu verzeichnen. Dies legt den Schluß nahe, daß Chemokine zuerst in der Leber hochreguliert werden, und daß bei IL-12 Mäusen die Rekrutierung von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen am Anfang einer abdominalen Sepsis erst verspätet beginnt. Bei Betrachtung von IP-10 (IFN- $\gamma$ -inducible-protein) fällt auf, daß nach 3 Stunden beim WT eine erheblich stärkere Expression in Leber und Lunge auftritt, als im IL-12  $-/-$  Stamm. Dies legt die Vermutung nahe, daß in der IL-12  $-/-$  die Expression von IFN- $\gamma$  nach akuten Infektionen reduziert ist, da für IP-10 eine erhebliche Abhängigkeit von IFN- $\gamma$  nachgewiesen ist(56).

Mit einer Verzögerung von mehreren Stunden erreichen IL-12 knock-out Mäuse allerdings gleich hohe Zytokin und Chemokininduktion wie Mäuse des Wildtyps. Die unterschiedlichen Überlebenskurven könnten darauf zurückzuführen sein, daß bei der IL-12 Knock-out Maus die Bakterien einige Stunden mehr Zeit haben, sich zu vermehren, bzw. sich im Körper zu verteilen, bis die Immunantwort in vollem Gange ist. Der Organismus des Versuchstieres hat es daher mit höheren Bakterienzahlen zu tun, die möglicherweise für die höhere Letalität verantwortlich sind. Diese Vermutung konnte durch bakteriologische Untersuchungen in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Um Aussagen über das Bakterienwachstum machen zu können, wurden in den Versuchen Bakterienkulturen von Peritonealflüssigkeit, Leber und Lunge angelegt. Nach 16 Stunden zeigten sich bei der IL-12  $-/-$  Maus keine signifikanten Unterschiede in den Bakterienzahlen nach CASP. Dies liegt möglicherweise daran, daß das Verfahren der Bakterienkultur auf Blutagar und die nachfolgende Auszählung zu ungenauen Verfahren sind, um genauen Rückschluß auf ursprüngliche Bakterienzahlen in den Organen zu ziehen. Möglicherweise ist aber auch der Zeitpunkt 16 Stunden nach Induktion von Sepsis zu früh gewählt, um Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen. Es könnte möglicherweise auch sein, daß nach 16 Stunden durch die verstärkte proinflammatorische Situation in der IL-12  $-/-$  Maus viele Bakterien abgetötet worden sind und nach 16 Stunden in der IL-12  $-/-$  die Inflammation

hauptsächlich durch LPS dieser Bakterien in Gang gehalten wird. In weiteren Versuchen sollte die Bakterieninfiltration in verschiedenen Geweben zu mehreren Zeitpunkten untersucht werden.

LPS-Schockmodelle in der Maus zeigen, daß Antikörper gegen IL-18 die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in Leber und Lunge stark reduzieren und sich positiv auf das Überleben nach LPS-Schock auswirken. Die Spiegel von IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Mip-2 sind in der behandelten Gruppe in Leber und Lunge niedriger (53). Der protektive Effekt von aIL-18 scheint eng mit der reduzierten Freisetzung von IFN- $\gamma$  verbunden zu sein. Auch die IL-18 -/- Maus zeigt verminderte Empfindlichkeit gegenüber LPS Schock(30). Bei Versuchen mit Injektion von Bakterien zeigte sich, daß die Blockierung von IL-18 einen schädlichen Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Tiere hatte. Für Yersinien wurde gezeigt daß sich durch einen Antikörper gegen IL-18 die Bakterienklearance in der Milz erheblich verschlechterte(9).

Unsere Versuche zeigten in der Leber und der Lunge eine deutlich geringere Expression von TNF- $\alpha$  nach Applikation eines Antikörpers gegen IL-18, als im WT. Sowohl nach 3 Stunden, als auch nach 12 Stunden waren diese Unterschiede sichtbar. Dieses Ergebnis steht mit dem Ergebnis früherer Versuche in Einklang, in denen gezeigt worden war, daß IL-18 ein wichtiger Faktor für die Sekretion von TNF- $\alpha$  bei(73) ist. Bei Betrachtung der Chemokinexpression zeigt sich, daß nach 3 Stunden in der Leber deutlich mehr IP-10 beim WT exprimiert wird, als in der Kontrollgruppe. Dies hat seine Ursache möglicherweise in einer verminderten Sekretion von IFN- $\gamma$  durch NK- und T-Zellen bei Fehlen von IL-18-Wirkung. Auch die Chemokine Mip-1- $\alpha$  und Mip-1- $\beta$  zeigen in Leber und Lunge geringere Expression nach aIL-18 für 3 und 12 Stunden.

Die Überlebenskinetik für die aIL-18 behandelte Maus zeigt, daß IL-18 ein protektives Zytokin für das Überleben einer bakteriellen Peritonitis darstellt. Auch TNF- $\alpha$  hat eine protektive Rolle in diesem Modell.

Vergleicht man die Ergebnisse aller vier Versuchsgruppen, fällt auf, daß die Expression der Chemokine Mip-1 $\alpha$ , Mip-1 $\beta$  und IP-10 nach 3 Stunden eine positive Korrelation zum Überleben haben. Betrachtet man die Werte für 3 Stunden in Leber und Lunge, zeigt sich klar, daß starke Expression dieser drei Chemokine mit einem guten Überleben von CASP korreliert ist. Weitere Versuche müssen zeigen, ob eines dieser Chemokine geeignet ist, als Monitor für die Beurteilung von septischen Patienten zu dienen. Eine Schwierigkeit hierbei wird sein, daß noch nicht endgültig geklärt ist, welche Chemokine im Menschen denen in der Maus zuzuordnen sind.

Eine Schwierigkeit bei der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse der ex vivo Versuche ist die Tatsache, daß man ein Kollektiv von Tieren untersucht, deren septisches Krankheitsbild einen unterschiedlichen Verlauf nehmen würde, falls der Versuch nicht durch die Opferung des Versuchstieres zur Probengewinnung abgebrochen würde. Dies erklärt die teilweise erhebliche Streuung der Messwerte in den ex vivo Versuchen innerhalb der Versuchsgruppen, werden doch Versuchstiere, die den Versuch überleben würden und solche, die eine letale Sepsis bekommen würden, in einer Versuchsgruppe zusammengefaßt. Um dieses Problem zu lösen, müßte man die Probengewinnung am lebenden Tier vornehmen und den klinischen Verlauf weiter beobachten. Dies ist aus technischen Gründen für die Lunge zum heutigen Zeitpunkt gänzlich unmöglich. Für Milz, Leber und Niere wäre die Probengewinnung bedingt praktikabel, wobei dies immer einen großen Zweiteingriff darstellt und den klinischen Verlauf bedeutend beeinflussen würde. Hiermit ginge die Vergleichbarkeit der Versuchsergebnisse mit großer Wahrscheinlichkeit verloren.

Vergleicht man die Expression von IL-1 $\beta$ , Mip-1 $\alpha$ , Mip-1 $\beta$  und IP-10 in allen vier Versuchsgruppen, fällt auf, daß bei der IL-12 -/- proinflammatorische Entzündungsmediatoren nur verspätet, wohingegen sie bei Behandlung mit Antikörpern gegen IL-18 überhaupt nicht in voller Stärke exprimiert werden.

Ein Grund hierfür könnte sein, daß die IL-12 -/- Maus von Geburt an kein IL-12 besitzt. Es könnten sich Mechanismen eingeschaltet haben, die dieses Defizit ausgleichen und nach wie vor eine suffiziente, wenn auch verspätete proinflammatorische Reaktion gewährleisten. Möglicherweise wird IL-12 durch ein anderes Zytokin ersetzt, das in einem gewissen Umfang die Rolle von IL-12 übernehmen kann.

Dieser Aspekt muß auch bei der Beurteilung der Überlebenskinetiken berücksichtigt werden. Eine Maus, die mit Antikörpern gegen IL-18 behandelt wird, hat ein proinflammatorisches Zytokin nicht mehr zur Verfügung, das normalerweise vorhanden wäre. Es können sich deshalb noch keine Wege zur Umgehung dieses Defizits eingeschaltet haben.

Eine Lösung dieses Problems wären zukünftige Versuche mit IL-18 -/- Mäusen, sowie (IL-12 X IL-18 ) defiziente Tiere. Sie bieten vergleichbare Versuchsbedingungen in den Versuchsgruppen. Weiterhin ist in zukünftigen Versuchsreihen anzustreben, die Expression von IFN- $\gamma$  zu messen, da IL-18 und IL-12 wichtige Induktoren für die Expression von IFN- $\gamma$  sind. Dies ist uns bisher mit dem RNase-Protektion-Essay nicht gelungen, da die Sensitivität zu gering ist. Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion könnte hier in zukünftigen Versuchen eingesetzt werden.

## 7 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Rolle von Interleukin-12 und Interleukin-18 in dem Modell CASP für bakterielle Peritonitis in der Maus untersucht. Die bakterielle Infektion wird in diesem Modell durch ein chirurgisch erzeugtes Leck im Kolon erzeugt.

IL-18 und IL-12 sind Schlüsselzytokine bei der Aktivierung von Makrophagen und der zellulären Immunantwort. Beide Zytokine wurden im Versuchstier unabhängig voneinander blockiert. In einem Fall wurden Interleukin-12 Knock-out Mäuse mit C57-Black 6 Hintergrund verwendet, im anderen Fall wurde bei Mäusen des Typs C57 Black 6 Interleukin-18 durch intraperitoneale Gabe eines polyklonalen Kaninchenantikörpers gegen Interleukin-18 gehemmt. Als Kontrollen dienten für die Interleukin-12 Knock-out Maus Mäuse des Wildtyps C57-Black 6. Für die Mäuse, die mit einem polyklonalen Antikörper gegen IL-18 behandelt wurden, wurden Mäuse des Wildtyps C57-Black 6 verwendet, denen Kaninchenserum intraperitoneal verabreicht worden war. Bei allen vier Versuchsgruppen wurde CASP durchgeführt.

Dabei zeigte sich, daß sowohl Interleukin-12 Knock-out Mäuse, als auch Mäuse, bei denen Interleukin-18 blockiert worden war, einen signifikanten Überlebensnachteil gegenüber Tieren des Wildtyps hatten. Dieser war in der Gruppe, bei der Interleukin 18 blockiert worden war, stärker ausgeprägt.

Daraufhin wurde nach Ursachen für diese Unterschiede gesucht. Es wurde in Leber, Lunge, Milz und Niere der Versuchstiere nach 3 beziehungsweise 12 Stunden die Expression der Zytokine Interleukin-1-beta + Interleukin-10 sowie der Chemokine IP-10, Mip-1-alfa, Mip-1-beta und Mip-2 gemessen. Zur Beurteilung der leukozytären Infiltration wurden immunhistologische Färbungen angefertigt. Zusätzlich wurden Bakterienkulturen der Organe und der Peritonealflüssigkeit angelegt.

Bei Betrachtung der Expression von Interleukin 1-beta, Interleukin-10 und den Chemokinen fiel auf, daß proinflammatorische Entzündungsmediatoren in der Interleukin-12 -/- Maus im Vergleich zum Wildtyp verzögert hochreguliert werden. Die Expression erreicht nach 12 Stunden aber auch in der Interleukin 12 -/- Maus die volle Ausprägung. Somit scheint das Fehlen von Interleukin-12 die Reaktion auf Bakterien in diesem Modell hinauszuzögern, aber doch in voller Ausprägung zu einem späteren Punkt zuzulassen. Immunhistologische Untersuchungen zeigten ein deutliches Infiltrat von Granulozyten, Makrophagen und NK-

Zellen 12 Stunden nach CASP in Leber und Lunge, das bei Mäusen des Wildtyps stärker ausgeprägt zu sein scheint als bei IL-12 Knock-out Mäusen.

Bei der Blockierung von Interleukin-18 hingegen zeigte sich bei Betrachtung von Zytokin- und Chemokininduktion, daß die proinflammatorische Reaktion nicht die volle Stärke von Tieren des Wildtyps erreicht. Das Fehlen von Interleukin-18 scheint somit nicht zu einer Verzögerung der Antwort zu führen, sondern verhindert, daß die inflammatorische Antwort in voller Stärke ausgeprägt wird.

Aus diesen Versuchen kann gefolgert werden, daß im Anfangsstadium einer bakteriellen Peritonitis eine frühe proinflammatorische Reaktion sich günstig auf die Prognose auswirkt. Zur Bekämpfung von septischer Peritonitis eignen sich im Anfangsstadium eher proinflammatorische Therapieansätze. Unseren Versuchen zufolge scheinen antiinflammatorische Therapieansätze geringe Erfolgsaussichten bei der Therapie von bakterieller Peritonitis zu haben.



## 8 Literaturverzeichnis

1. Aderka D. Role of tumor necrosis factor in the pathogenesis of intravascular coagulopathy of sepsis: potential new therapeutic implications. *Isr J Med Sci* 27 (1): 52-60, 1991.
2. Aikawa N, Fujishima S, Shinozawa Y, Hori S. [Cytokine-mediated biological response to severe infections in surgical patients]. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 97 (12): 1054-9, 1996.
3. Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 94 (2): 331-5, 1983.
4. Bartels H, Siewert JR. [The role of antibiotic therapy for postoperative infectious complications]. *Klin Wochenschr* 69 (Suppl 26): 53-6, 1991.
5. Barthlen W, Zantl N, Pfeffer K, Heidecke CD, Holzmann B, Stadler J. Impact of experimental peritonitis on bone marrow cell function. *Surgery* 126 (1): 41-7, 1999.
6. Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Menon S, Davidson N, Grunig G, Rennick D. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest* 96 (5): 2339-47, 1995.
7. Beutler B, Grau GE. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit Care Med* 21 (10 Suppl): S423-35, 1993.
8. Bohn E, Schmitt E, Bielfeldt C, Noll A, Schulte R, Autenrieth IB. Ambiguous role of interleukin-12 in *Yersinia enterocolitica* infection in susceptible and resistant mouse strains. *Infect Immun* 66 (5): 2213-20, 1998.
9. Bohn E, Sing A, Zumbihl R, Bielfeldt C, Okamura H, Kurimoto M, Heesemann J, Autenrieth IB. IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. *J Immunol* 160 (1): 299-307, 1998.
10. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine [see comments]. *Chest* 101 (6): 1644-55, 1992.
11. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1): 156-9, 1987.
12. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 178 (3): 1041-8, 1993.
13. Dao T, Mehal WZ, Crispe IN. IL-18 augments perforin-dependent cytotoxicity of liver NK-T cells. *J Immunol* 161 (5): 2217-22, 1998.
14. Davies MG, Hagen PO. Systemic inflammatory response syndrome [see comments]. *Br J Surg* 84 (7): 920-35, 1997.
15. Dinarello CA. IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 103 (1 Pt 1): 11-24, 1999.
16. Dinarello CA, Novick D, Puren AJ, Fantuzzi G, Shapiro L, Muhl H, Yoon DY, Reznikov LL, Kim SH, Rubinstein M. Overview of interleukin-18: more than an interferon-gamma inducing factor. *J Leukoc Biol* 63 (6): 658-64, 1998.
17. Doherty GM, Lange JR, Langstein HN, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA. Evidence for IFN-gamma as a mediator of the lethality of endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149 (5): 1666-70, 1992.
18. Echtenacher B, Hultner L, Mannel DN. Cellular and molecular mechanisms of TNF protection in septic peritonitis. *J Inflamm* 47 (1-2): 85-9, 1995.
19. Evans T, Carpenter A, Silva A, Cohen J. Differential effects of monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha and gamma interferon on induction of hepatic nitric oxide synthase in experimental gram-negative sepsis. *Infect Immun* 60 (10): 4133-9, 1992.
20. Faist E, Mewes A, Strasser T, Walz A, Alkan S, Baker C, Ertel W, Heberer G. Alteration of monocyte function following major injury. *Arch Surg* 123 (3): 287-92, 1988.
21. Fantuzzi L, Gessani S, Borghi P, Varano B, Conti L, Puddu P, Belardelli F. Induction of interleukin-12 (IL-12) by recombinant glycoprotein gp120 of human immunodeficiency virus type 1 in human monocytes/macrophages: requirement of gamma interferon for IL-12 secretion. *J Virol* 70 (6): 4121-4, 1996.
22. Gazzinelli RT, Hieny S, Wynn TA, Wolf S, Sher A. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon gamma by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (13): 6115-9, 1993.
23. Germann T, Rude E. Interleukin-12. *Int Arch Allergy Immunol* 108 (2): 103-12, 1995.
24. Gerosa F, Paganin C, Peritt D, Paiola F, Scupoli MT, Aste-Amezaga M, Frank I, Trinchieri G. Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10. *J Exp Med* 183 (6): 2559-69, 1996.
25. Golab J, Zagozdzon, Stoklosal T, Kaminski R, Kozar K, Jakobisiak M. Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18--a bridge too far? *Immunol Lett* 72 (3): 153-7, 2000.

26. Heinzel FP. The role of IFN-gamma in the pathology of experimental endotoxemia. *J Immunol* 145 (9): 2920-4, 1990.
27. Heinzel FP, Schoenhaut DS, Rerko RM, Rosser LE, Gately MK. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 177 (5): 1505-9, 1993.
28. Hensler T, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Barthlen W, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B. Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun* 65 (6): 2283-91, 1997.
29. Hensler T, Heidecke CD, Hecker H, Heeg K, Bartels H, Zantl N, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B. Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production. *J Immunol* 161 (5): 2655-9, 1998.
30. Hochholzer P, Lipford GB, Wagner H, Pfeffer K, Heeg K. Role of interleukin-18 (IL-18) during lethal shock: decreased lipopolysaccharide sensitivity but normal superantigen reaction in IL-18-deficient mice. *Infect Immun* 68 (6): 3502-8, 2000.
31. Jansen PM, van der Pouw Kraan TC, de Jong IW, van Mierlo G, Wijdenes J, Chang AA, Aarden LA, Taylor FB, Jr., Hack CE. Release of interleukin-12 in experimental *Escherichia coli* septic shock in baboons: relation to plasma levels of interleukin-10 and interferon-gamma. *Blood* 87 (12): 5144-51, 1996.
32. Kato T, Murata A, Ishida H, Toda H, Tanaka N, Hayashida H, Monden M, Matsuura N. Interleukin 10 reduces mortality from severe peritonitis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 39 (6): 1336-40, 1995.
33. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170 (3): 827-45, 1989.
34. Koerner TJ, Adams DO, Hamilton TA. Regulation of tumor necrosis factor (TNF) expression: interferon-gamma enhances the accumulation of mRNA for TNF induced by lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages. *Cell Immunol* 109 (2): 437-43, 1987.
35. Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA, Vogel SN. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *J Immunol* 163 (3): 1537-44, 1999.
36. Kumar A, Haery C, Parrillo JE. Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Clin* 16 (2): 251-87, 2000.
37. Kurtz HJ, Quast J. Effects of continuous intravenous infusion of *Escherichia coli* endotoxin into swine. *Am J Vet Res* 43 (2): 262-8, 1982.
38. Lauwerys BR, Renaud JC, Houssiau FA. Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. *Cytokine* 11 (11): 822-30, 1999.
39. Le Roy D, Heumann D, Glauser MP, Mauel J, Smith J, Betz Corradin S. Nitric oxide production in experimental gram-negative infection: studies with cytokine receptor-deficient mice. *Shock* 10 (1): 37-42, 1998.
40. Loetscher P, Seitz M, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and enzyme release. *J Immunol* 156 (1): 322-7, 1996.
41. Luster AD, Unkeless JC, Ravetch JV. Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins. *Nature* 315 (6021): 672-6, 1985.
42. Ma YJ, Dissen GA, Rage F, Ojeda SR. RNase Protection Assay. *Methods* 10 (3): 273-8, 1996.
43. Magram J, Connaughton SE, Warriar RR, Carvajal DM, Wu CY, Ferrante J, Stewart C, Sarmiento U, Faherty DA, Gately MK. IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4 (5): 471-81., 1996.
44. Maier S, Emmanuilidis K, Entleutner M, Zantl N, Werner M, Pfeffer K, Heidecke CD. Massive chemokine transcription in acute renal failure due to polymicrobial sepsis [In Process Citation]. *Shock* 14 (2): 187-92, 2000.
45. Mancuso G, Cusumano V, Genovese F, Gambuzza M, Beninati C, Teti G. Role of interleukin 12 in experimental neonatal sepsis caused by group B streptococci. *Infect Immun* 65 (9): 3731-5, 1997.
46. Matsumoto S, Tsuji-Takayama K, Aizawa Y, Koide K, Takeuchi M, Ohta T, Kurimoto M. Interleukin-18 activates NF-kappaB in murine T helper type 1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 234 (2): 454-7, 1997.
47. Mattner F, Ozmen L, Podlaski FJ, Wilkinson VL, Presky DH, Gately MK, Alber G. Treatment with homodimeric interleukin-12 (IL-12) p40 protects mice from IL-12-dependent shock but not from tumor necrosis factor alpha-dependent shock. *Infect Immun* 65 (11): 4734-7, 1997.
48. Muller-Werdan U, Prondzinsky R, Witthaut R, Stache N, Heinroth K, Kuhn C, Schmidt H, Busch I, Werdan K. [The heart in infection and MODS (multiple organ dysfunction syndrome)]. *Wien Klin Wochenschr Suppl* 1: 3-24, 1997.
49. Nakamura K, Okamura H, Wada M, Nagata K, Tamura T. Endotoxin-induced serum factor that stimulates gamma interferon production. *Infect Immun* 57 (2): 590-5, 1989.
50. Nakane A, Minagawa T, Kohanawa M, Chen Y, Sato H, Moriyama M, Tsuruoka N. Interactions between endogenous gamma interferon and tumor necrosis factor in host resistance against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infections. *Infect Immun* 57 (11): 3331-7, 1989.
51. Narumi S, Wyner LM, Stoler MH, Tannenbaum CS, Hamilton TA. Tissue-specific expression of murine IP-10 mRNA following systemic treatment with interferon gamma. *J Leukoc Biol* 52 (1): 27-33, 1992.
52. Nauciel C, Espinasse-Maes F. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha in resistance to *Salmonella typhimurium* infection. *Infect Immun* 60 (2): 450-4, 1992.
53. Netea MG, Fantuzzi G, Kullberg BJ, Stuyt RJ, Pulido EJ, McIntyre RC, Jr., Joosten LA, Van der Meer JW, Dinarello CA. Neutralization of IL-18 reduces neutrophil tissue accumulation and protects mice against lethal *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* endotoxemia. *J Immunol* 164 (5): 2644-9, 2000.
54. Neumann B, Zantl N, Veihelmann A, Emmanuilidis K, Pfeffer K, Heidecke CD, Holzmann B. Mechanisms of acute inflammatory lung injury induced by abdominal sepsis. *Int Immunol* 11 (2): 217-27, 1999.

55. Novick D, Kim SH, Fantuzzi G, Reznikov LL, Dinarello CA, Rubinstein M. Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 10 (1): 127-36, 1999.
56. Ohmori Y, Hamilton TA. The interferon-stimulated response element and a kappa B site mediate synergistic induction of murine IP-10 gene transcription by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 154 (10): 5235-44, 1995.
57. Okamura H, Kashiwamura S, Tsutsui H, Yoshimoto T, Nakanishi K. Regulation of interferon-gamma production by IL-12 and IL-18. *Curr Opin Immunol* 10 (3): 259-64, 1998.
58. O'Reilly M, Silver GM, Davis JH, Gamelli RL, Hebert JC. Interleukin 1 beta improves survival following cecal ligation and puncture. *J Surg Res* 52 (5): 518-22, 1992.
59. Puren AJ, Fantuzzi G, Gu Y, Su MS, Dinarello CA. Interleukin-18 (IFN-gamma-inducing factor) induces IL-8 and IL-1beta via TNF-alpha production from non-CD14+ human blood mononuclear cells. *J Clin Invest* 101 (3): 711-21, 1998.
60. Puren AJ, Razeghi P, Fantuzzi G, Dinarello CA. Interleukin-18 enhances lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production in human whole blood cultures. *J Infect Dis* 178 (6): 1830-4, 1998.
61. Redmond HP, Chavin KD, Bromberg JS, Daly JM. Inhibition of macrophage-activating cytokines is beneficial in the acute septic response. *Ann Surg* 214 (4): 502-8; discussion 508-9, 1991.
62. Remick DG, Strieter RM, Eskandari MK, Nguyen DT, Genord MA, Raiford CL, Kunkel SL. Role of tumor necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced pathologic alterations. *Am J Pathol* 136 (1): 49-60, 1990.
63. Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 90 (3): 909-28, 1997.
64. Schlag G, Redl H. Mediators of injury and inflammation. *World J Surg* 20 (4): 406-10, 1996.
65. Shibata Y, Foster LA, Kurimoto M, Okamura H, Nakamura RM, Kawajiri K, Justice JP, Van Scott MR, Myrvik QN, Metzger WJ. Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of IFN-gamma-inducing factors but enhances NK cell production of IFN-gamma. *J Immunol* 161 (8): 4283-8, 1998.
66. Smith SR, Calzetta A, Bankowski J, Kenworthy-Bott L, Terminelli C. Lipopolysaccharide-induced cytokine production and mortality in mice treated with *Corynebacterium parvum*. *J Leukoc Biol* 54 (1): 23-9, 1993.
67. Sozzani S, Sallusto F, Luini W, Zhou D, Piemonti L, Allavena P, Van Damme J, Valitutti S, Lanzavecchia A, Mantovani A. Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J Immunol* 155 (7): 3292-5, 1995.
68. Steinhilber ML, Hogaboam CM, Lukacs NW, Strieter RM, Kunkel SL. Multiple roles for IL-12 in a model of acute septic peritonitis. *J Immunol* 162 (9): 5437-43, 1999.
69. Stoll S, Jonuleit H, Schmitt E, Muller G, Yamauchi H, Kurimoto M, Knop J, Enk AH. Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12-dependent Th1 development. *Eur J Immunol* 28 (10): 3231-9, 1998.
70. Strieter RM, Kunkel SL. The immunopathology of chemotactic cytokines. *Adv Exp Med Biol* 351: 19-28, 1993.
71. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: an updated review of its biology. *Crit Care Med* 21 (10 Suppl): S415-22, 1993.
72. Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *J Leukoc Biol* 59 (4): 505-11, 1996.
73. Tsutsui H, Matsui K, Kawada N, Hyodo Y, Hayashi N, Okamura H, Higashino K, Nakanishi K. IL-18 accounts for both TNF-alpha- and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. *J Immunol* 159 (8): 3961-7, 1997.
74. Ugucioni M, D'Apuzzo M, Loetscher M, Dewald B, Baggiolini M. Actions of the chemotactic cytokines MCP-1, MCP-2, MCP-3, RANTES, MIP-1 alpha and MIP-1 beta on human monocytes. *Eur J Immunol* 25 (1): 64-8, 1995.
75. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 64 (11): 4733-8, 1996.
76. Werdan K, Muller-Werdan U. Elucidating molecular mechanisms of septic cardiomyopathy--the cardiomyocyte model. *Mol Cell Biochem* 163-164: 291-303, 1996.
77. Windsor AC, Klava A, Somers SS, Guillou PJ, Reynolds JV. Manipulation of local and systemic host defence in the prevention of perioperative sepsis. *Br J Surg* 82 (11): 1460-7, 1995.
78. Wittmann DH, Schein M, Condon RE. Management of secondary peritonitis. *Ann Surg* 224 (1): 10-8, 1996.
79. Wysocka M, Kubin M, Vieira LQ, Ozmen L, Garotta G, Scott P, Trinchieri G. Interleukin-12 is required for interferon-gamma production and lethality in lipopolysaccharide-induced shock in mice. *Eur J Immunol* 25 (3): 672-6, 1995.
80. Zantl N, Uebe A, Neumann B, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B, Heidecke CD, Pfeffer K. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun* 66 (5): 2300-9, 1998.
81. Zhao YX, Tarkowski A. Impact of interferon-gamma receptor deficiency on experimental *Staphylococcus aureus* septicemia and arthritis. *J Immunol* 155 (12): 5736-42, 1995.
82. Zisman DA, Kunkel SL, Strieter RM, Gauldie J, Tsai WC, Bramson J, Wilkowski JM, Bucknell KA, Standiford TJ. Anti-interleukin-12 therapy protects mice in lethal endotoxemia but impairs bacterial clearance in murine *Escherichia coli* peritoneal sepsis. *Shock* 8 (5): 349-56, 1997.

## 9 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

ABB. 1: ROLLE VON IL-12 UND IL-18 BEI BAKTERIELLEN INFESTIONEN .....	12
ABB. 2: OPERATIONSTECHNIK „CASP“ .....	24
ABB. 3 :AUFLISTUNG DER OP-GRUPPEN .....	34
ABB.4: ÜBERLEBENSKINETIK DES IFN-GAMMA R-/- MAUSSTAMMES (HINTERGRUND C57BL/6 – 129JSv) FÜR 18G-CASP .....	35
ABB.5: ÜBERLEBENSKINETIKEN DES IL-12 -/- MAUSSTAMMS IN ABHÄNGIGKEIT VON DER VERWENDETEN STENTDICKE A: 16G; B: 18G.....	36
ABB. 6: ANZAHL KOLONIEBILDENDER EINHEITEN IN LEBER, LUNGE UND PERITONEALHÖHLE 16 H NACH 16G-CASP. VERGLEICH VON WILDTYPMÄUSEN (WT) UND IL-12 p40-DEFIZIENTEN TIEREN .....	37
ABB. 7: IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN VON LEBERGEWEBE IM IL12-/- MAUSSTAMM 12H NACH 16G- CASP IM VERGLEICH ZUM WILDSTYP.....	38
ABB.8: IMMUNHISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN VON LUNGENGEBEWE IM IL-12-/- MAUSSTAMM 12H NACH 16G-CASP IM VERLEICH ZUM WILDSTYP .....	39
ABB. 9: ZYTOKINEXPRESSION NACH CASP IN DER LEBER .....	41
ABB. 10: CHEMOKINEXPRESSION IN DER LEBER .....	42
ABB. 11: ZYTOKINEXPRESSION IN DER MILZ.....	43
ABB. 12: CHEMOKINEXPRESSION IN DER MILZ .....	44
ABB. 13: ZYTOKINEXPRESSION IN DER LUNGE .....	45
ABB. 14: CHEMOKINEXPRESSION IN DER LUNGE .....	47
ABB. 15: ÜBERLEBENSKINETIK DER aIL-18 BEHANDELTEN MAUS .....	49
ABB. 16: ANZAHL KOLONIEBILDENDER EINHEITEN IN LEBER, LUNGE, MILZ UND PERITONEALHÖHLE 16H NACH 18G-CASP. VERGLEICH VON WILDTYPMÄUSEN(CONTROL) UND MÄUSEN, DIE PERIOPERATIV MIT EINEM POLYKLONALEN ANTIKÖRPER GEGEN IL-18 (A-IL-18) BEHANDELT WORDEN WAREN .....	50
ABB. 17: ZYTOKINEXPRESSION IN DER LEBER .....	51
ABB. 18: CHEMOKINEXPRESSION IN DER LEBER.....	53
ABB. 19: ZYTOKINEXPRESSION IN DER LUNGE .....	54
ABB. 20: CHEMOKINEXPRESSION IN DER LUNGE .....	55

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Claus-Dieter Heidecke für das interessante Thema. Er hat durch seine Vorarbeiten mit seinem Labor am Klinikum Rechts der Isar in München ein wissenschaftliches Umfeld geschaffen, in dem man als Doktorand bei den üblichen anfänglichen Schwierigkeiten immer mit sachkundiger Hilfe rechnen konnte.

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Klaus Pfeffer. Prof. Dr. Pfeffer hat durch die Bereitstellung von Operationsplätzen, Tierställen und wissenschaftlichen Grundlagen für die durchgeführten Untersuchungen die Arbeit erst ermöglicht.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Stefan Maier. Durch seine kompetente Mithilfe und besonnene Art war meistens er es, der mich über so manche Fehlschläge und Mißerfolge im Zusammenhang mit dieser Arbeit hinweggebracht hat. Er hat besondere Verdienste im Hinblick auf das Gelingen vorliegender Arbeit.

Bei Frau Tanja Fleischmann möchte ich mich für ihre stets humorvolle Art bedanken, mit der sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau Tanja Herrig. Sie hat in der Endphase dieser Arbeit maßgeblich zu deren Gelingen beigetragen.

Frau Sigrid Himpl hat mich organisatorisch in jeder Situation unterstützt. Ihr möchte ich vor allem für die Schaffung eines funktionsfähigen Radioaktiv-Arbeitsplatzes danken.

Dr. Peter Hochholzer möchte ich danken für die methodische Hilfestellung bei der Etablierung des RNase-Protektion-Essay im chirurgischen Gastrolabor und der Überlassung des anti-IL-18 Antikörpers.

Dr. Niko Zantl hat durch die Etablierung des CASP Modells die Grundlagen für die Versuche geschaffen. Ohne ihn wäre diese Arbeit nie entstanden.

Sonja Lange hat mich durch Ihre besonnene und aufmunternde Art über die gesamten 4 Jahre begleitet. Ihr möchte ich meinen besonderen Dank zukommen lassen.

Meinen Eltern Waltraud und Dr. Sigmund Entleutner. Ohne ihre moralische und finanzielle Unterstützung wäre vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen. Ihnen gilt mein besonderer Dank. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

## 11 Lebenslauf

Geboren	am 2.7.1973 in Regensburg
Vater:	Dr. Sigmund Entleutner (Professor für Übertragungstechnik an der Fachhochschule Regensburg)
Mutter:	Waltraud Entleutner (Studienrätin für Biologie und Sport)
1980 -1984	Grundschule Königswiesen (Regensburg)
1984 - 1993	Von-Müller-Gymnasium Regensburg
1993	allgemeine Hochschulreife
8/93 - 9/94	Zivildienst im chirurgischen OP der Uniklinik Regensburg
11/94	Immatrikulation an der Universität Regensburg
3/95-10/96	Wissenschaftliche Mitarbeit in der traumatologischen Abteilung der Universität Regensburg an einer Knie-Endoprothetikstudie
11/95 - 2/96	Tutor am anatomischen Institut der Universität Regensburg
8/96	Physikum
9/96	Immatrikulation an der Technischen Universität München
8/97	erstes Staatsexamen
8/99	zweites Staatsexamen
2/2000-6/2000	Auslandsaufenthalt im Rahmen des praktischen Jahres in Toronto, Canada und Houston, USA im Fach Orthopädie.
5/2001	drittes Staatsexamen und Teilapprobation
seit 7/2001	Arzt im Praktikum an der Chirurgischen Klinik der Universität Greifswald