

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik
Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. H. Friess)

Der Aminopyrin-Atemtest als hepatischer Verlaufsparemeter in der abdominalen Sepsis

Steffen Rüdiger Josef Wurzbacher

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

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

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. B. Holzmann
2. Univ.-Prof. Dr. H. Bartels

Die Dissertation wurde am 18.10.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 26.09.2007 angenommen.

1. Abkürzungsverzeichnis

2. Einleitung

3. Wissenschaftliche Grundlagen und Fragestellung der Arbeit

3.1 Wissenschaftliche und klinische Grundlagen zur Leberfunktion im septischen Geschehen

3.1.1 Pathophysiologie der Sepsis

3.1.2 bisherige Diagnostik der Leber im septischen Verlauf

3.2 Studiendesign

4. Material und Methoden

4.1 Wissenschaftliche Grundlagen der Versuche

4.2 Methodik in vivo

4.2.1. Tiere und Tierhaltung

4.2.2. Tiermodell: Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)

4.2.2.1 Anästhesie

4.2.2.2 Operationen

4.2.2.3 Postoperatives Vorgehen

4.2.3.4 Organentnahme

4.2.3. Tiermodell: Aminopyrine Breath Test (ABT)

4.2.3.1 Injektion des radioaktiven Aminopyrins i.v.

4.2.3.2 Durchführung der Messung

4.2.3.3 Auswertung der Ergebnisse

4.2.4. Aminopyrine Breath Test (ABT) beim Menschen

4.2.4.1 Demographische Daten der septischen Patienten

4.2.4.2 Durchführung des ABT beim Menschen

4.3 Methodik in vitro

4.3.1. Aktivitätsmessung der Isoenzyme

4.3.2. ELISA zur Bestimmung der TNF α -Konzentration

4.4 Gruppeneinteilung

4.5 Statistik

5. Ergebnisse

5.1 ABT im Mausmodell

5.2 ABT beim Menschen

5.3 Fluorometrie

5.4 ELISA

6. Diskussion

7. Zusammenfassung

8. Literaturverzeichnis

9. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

10. Danksagung

11. Lebenslauf

1. Abkürzungsverzeichnis

ABT	Aminopyrine Breath Test
AP	Alkalische Phosphatase
ARDS	Adult Respiratory Response Syndrome
CASP	Colon Ascendens Stent Peritonitis
CYP	Cytochrom P
DIG	Disseminierte intravasale Gerinnung
γ GT	gamma-Glutamyl-Transferase
Il	Interleukin
INF γ	Interferon gamma
LAP	Leuzin-Aminopeptidase
LPS	Lipopolysaccharid
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
MOV	Multiorganversagen
NOS	Stickoxid-Synthase
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TGF	Tumor Groth Factor
TNF	Tumornekrosefaktor

2. Einleitung

Das Krankheitsbild Sepsis stellt auch durch größte intensivmedizinische Bemühungen immer noch eine ernstzunehmende Problematik in der postoperativen Phase viszeralchirurgischer Eingriffe dar. Auch neueste Entwicklungen operativer Instrumentarien und weitreichende Fortschritte chirurgischer Fähigkeiten können Komplikationen, wie das septische Krankheitsbild nicht ausschließen. Sepsis gilt als häufigste Todesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen. Derzeit liegt die Inzidenz der postoperativen Sepsis bei 9-12% und die Letalität bei 46-82% nach elektiven chirurgischen Eingriffen (79, 150). In der Viszeralchirurgie ist die potentiell zur Sepsis führende Peritonitis meist durch eine Anastomoseninsuffizienz, aber auch durch Perforation des Darmes oder exogener Keimverschleppung begründet. Diese bedingt über bakterielle Aussiedlung häufig eine systemische Infektion, die zu septischem Schock, Multiorganversagen und schließlich zum Tod führen kann. Die Problematik der Therapie der Sepsis liegt unter anderem in der Notwendigkeit, sie früh zu diagnostizieren. Dabei ist jedoch die Differenzierung zu den üblichen postoperativen bzw. posttraumatischen Reaktionen des Körpers schwierig. Die volle Ausprägung des klinischen Bildes der Sepsis und damit das *Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)* kann sich erst verhältnismäßig spät zeigen (64). Es ist definiert durch mindestens zwei der folgenden Merkmale:

Leukozytose ($>12\ 000/\mu\text{l}$) oder -penie ($<4000/\mu\text{l}$) oder 10% unreife Neutrophile, Hyper- ($>38\ ^\circ\text{C}$) oder Hypothermie ($<36\ ^\circ\text{C}$), Tachykardie (HF $>90/\text{min}$), Tachypnoe ($>20/\text{min}$) bzw. bei fehlender Spontanatmung Hypokapnie ($\text{pCO}_2 <32\ \text{mmHg}$) (6, 19, 21, 33, 69, 74).

Um der Definition der Sepsis gerecht zu werden, muss neben dem klinischen Bild des SIRS auch noch die mikrobielle Komponente erfüllt sein. Es muss also ein Infektionsherd nachgewiesen werden können. Denn aus Untersuchungen geht hervor, dass es auch nicht mikrobiell bedingte, schwere Entzündungssyndrome gibt. Diese können ebenfalls eine Zytokin-Kaskade auslösen, welche gegebenenfalls zum klinischen Bild des SIRS führt. Hierzu zählen Reaktionen auf Polytraumen, großflächige Verbrennungen oder schwere Pankreatitiden, jedoch auch im Zusammenhang mit chronischer Salicylat-Intoxikation ist bereits von genanntem Entzündungssyndrom berichtet worden (27, 73, 89, 95, 96).

Ebenso schwierig wie die Definition, ist es, den zu erwartenden Verlauf und damit die Prognose einer Sepsis abzuschätzen. Es zeigen sich sowohl hyperakute Verläufe mit rasant abfallenden Organfunktionen, als auch jene, mit wochenlang wiederkehrenden septischen Schüben. Auch das Spektrum des septischen Krankheitsbildes kann sich facettenreich darstellen. So wird die Sepsis, die mit einer Letalität von 16% assoziiert ist, beim Sepsis Syndrom durch beginnende Organdysfunktion, Hypotension oder Hypoperfusion der peripheren Organe verkompliziert. Hier ist die Letalität bereits auf 35% angestiegen. Bei Persistenz einer septisch bedingten, katecholaminpflichtigen Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution, sowie Zeichen von Hypoperfusion und multiplen Organdysfunktionen spricht man vom septischen Schock (32). Dieser geht mit einer Letalität von 46-82% einher (102). In diesem Zusammenhang ist das „Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS)“ zu erwähnen. Darunter ist das

Unvermögen zu verstehen, die Homöostase der Organfunktionen ohne Intervention von außen aufrecht zu erhalten, so dass es zum Versagen von mindestens zwei vitalen Organfunktionen kommt. Während fast alle Patienten mit einer Sepsis eine Dysfunktion eines Organes entwickeln, tritt MODS bei ca. 30% der Patienten mit Sepsis in Erscheinung. Man unterscheidet primäres MODS, welchem ein singulärer Reiz zugrunde liegt, vom sekundären, das erst als Konsequenz der Immunantwort nach einem Reiz auftritt. Letzteres findet seine Bedeutung in der Pathophysiologie der Sepsis (61, 78).

Danach geht die Schädigung des Organismus nicht direkt von den beteiligten Bakterien oder Pilzen oder von deren Exo- oder Endotoxinen aus. Vielmehr führen sie zu einer Überreaktion des Immunsystems (129). Dabei werden in überschüssendem Maße Zytokine und andere Mediatoren freigesetzt (15, 65). Die bei einem lokal begrenzten Infekt protektiv wirksamen Substanzen stören somit bei hohen, systemisch wirksamen Mengen die immunologische Homöostase und führen zu einer Schädigung des Organismus (40, 109, 110). Einige Tiermodelle hatten eine direkte Störung dieses Gleichgewichtes zur Folge. Dies wurde unter anderem durch intravenöse Gabe von LPS oder Zytokinen, wie beispielsweise $\text{TNF}\alpha$ erreicht. Die Tiere entwickelten in der Folge die beim Menschen bekannten Symptome einer Sepsis. Daraufhin wurde versucht, durch Applikation von Zytokinen (42, 43, 103, 112, 113), Rezeptoren (86) oder deren Antagonisten (31, 45) eine Durchbrechung der Mediatorkaskade zu erzielen. In zahlreichen Studien mit letalen Sepsismodellen beim Tier konnte dadurch eine protektive Wirkung mit geringerer Letalität erzielt werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass $\text{TNF}\alpha^{-/-}$ -Mäuse einen Überlebensvorteil bei der Sepsis haben (123). Diese vielversprechenden Ergebnisse ließen sich jedoch leider nicht vollständig auf klinische Studien übertragen. Sowohl die Gabe von

antiinflammatorischen Zytokinen (70, 108), oder gegen Endotoxin gerichtete Antikörper (81), als auch blockierende Antikörper proinflammatorischer Zytokine (44) oder deren Rezeptorantagonisten (63, 80) konnten bisher in der Sepsistherapie keinen Durchbruch erzielen. Dadurch wird die Komplexität des septischen Krankheitsbildes erneut deutlich.

Die genauen Mechanismen, die zu einer pro- oder antiinflammatorischen Überreaktion führen, sind derzeit noch nicht vollständig erschlossen und bedürfen weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen.

So unzureichend, wie das Verständnis über die Entstehungsmechanismen der Sepsis sind auch die therapeutischen Mittel, die derzeit zur Sepsistherapie zu Verfügung stehen. Es gibt drei Ansatzpunkte, die therapeutisch von Bedeutung sind (132, 135, 136). Im Rahmen der kausalen Therapie kann der Infektionsherd durch operativ-interventionelle Sanierung (22) oder mittels antibiotischer Therapie oder kombiniert durch beides eradiziert werden. Desweiteren sind die kardiovaskulären, pulmonalen und metabolischen Störungen zu behandeln. Hier kommen die supportiven intensivmedizinischen Therapieansätze zum Tragen. Da die schwere Sepsis häufig (bei ca. 25 bis 42% der Patienten) mit einem akuten Lungenversagen („Acute respiratory distress syndrome, ARDS“) assoziiert ist (50), spielt unter anderem die Beatmungstherapie eine hervorzuhebende Rolle. Besonders effektiv zeigte sich dabei die Beatmung mit einem niedrigen Atemzugvolumen (6ml/kg Körpergewicht) (127).

Ebenfalls zu den supportiven Maßnahmen zählt die Kreislauftherapie. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine frühzeitige und aggressive Optimierung der kardiovaskulären Funktion zu einer signifikanten Letalitätssenkung führt. Über die optimale Version einer Volumenersatz-, Transfusions- und Katecholamintherapie wird jedoch gegenwärtig kontrovers diskutiert (7, 30, 105).

Auch eine die Gerinnung modulierende Therapie mit Substanzen, wie Antithrombin III oder Protein C, befindet sich noch weitgehend in der experimentellen Phase. Bisherige Ergebnisse lassen jedoch in absehbarer Zeit auf eine erfolgreiche Anwendbarkeit beim Patienten hoffen (17, 97, 133).

Als ebenso wenig vollends ausgereift sind derzeitige Therapieansätze im Rahmen einer Immunmodulation zu sehen (5, 25, 58, 68). Tierexperimentelle Ergebnisse versprachen hierbei großen Erfolg, der, wie schon erwähnt, leider nicht vollends auf die humane Situation übertragen werden konnte. Dies lag jedoch unter anderem an Tiermodellen, die den septischen Krankheitsverlauf auf Intensivstationen nur unzureichend widerspiegeln, als auch an Studiendesigns, die hinsichtlich ihrer Patientengruppen und des Zeitfaktors noch einmal zu überprüfen wären (41, 107).

In Tiermodellen wird das Krankheitsbild der Sepsis meist durch intravenöse oder intraperitoneale Injektion von lebenden Bakterien (34), LPS (72) oder Zytokinen (46, 100) provoziert. Das Erregerspektrum bei einer postoperativen Sepsis variiert hingegen immens. Außerdem kommt es in der Klinik im Allgemeinen nicht zu einem einmaligen Auftreten eines immunmodulierenden Reizes, sondern vielmehr zu einer kontinuierlichen oder intermittierenden Ausbreitung von Mediatoren, die erst im zeitlichen Verlauf zu einer Destabilisierung der Homöostase des Immunsystems führen. In diesem Zusammenhang muss auch auf die eher abrupt auftretende Ausschwemmung von Keimen beim CLP-Modell hingewiesen werden (94, 128).

Des Weiteren kann bei Tiermodellen der differenzierte Allgemeinzustand eines meist schon präoperativ durch sein Grundleiden beeinträchtigten Patienten nicht mit einbezogen werden. Faktoren, wie etwaige Vorerkrankungen, das Operationstrauma oder hohes Alter lassen sich im Tiermodell kaum

miteinbeziehen. Abschließend ist der klinische Verlauf einer Sepsis, wie bereits erwähnt, sehr heterogen und deshalb durch ein stets konstantes Sepsismodell nur bedingt simuliert. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Sepsismodell wurde die Situation einer Anastomoseninsuffizienz möglichst realitätsnah widergegeben, da „CASP“ (Colon Ascendens Stent Peritonitis) eine kontinuierliche Ausbreitung von Keimen in der Bauchhöhle bewirkt.

Von besonderer klinischer Bedeutung im Hinblick auf die Therapie einer Sepsis ist der frühe Zeitpunkt der Diagnose. Da es dabei zu einer Beeinträchtigung vieler Organsysteme kommt, ist die Berücksichtigung mehrerer Organfunktionen vonnöten (71, 88, 92, 130). Als ein wichtiger Baustein wird in dieser Studie die Leberfunktion untersucht. Die Leber spielt im Geschehen der Sepsis eine hervorzuhebende Rolle (36, 52). Bei einer Beeinträchtigung der Leberfunktion kommt es unter anderem zu einer verminderten Synthese von Plasmaproteinen und damit zu Gerinnungsstörungen und zur Beeinträchtigung des onkotischen intravasalen Drucks.

Die üblichen klinisch-chemischen Parameter, wie Serumwerte und Gerinnungsstatus geben erst verhältnismäßig spät Aufschluss über eine beginnende Sepsis und deren Beeinträchtigung der Leberfunktion. Wichtig für die Prognose des septischen Patienten wäre jedoch ein Test, der die therapeutischen Bemühungen frühzeitig auf die Behandlung einer aufkommenden Leberinsuffizienz lenkt. Dieser Test müsste für eine klinische Einsetzbarkeit eine Reihe von Kriterien erfüllen. Er sollte einfach und schnell in der Durchführbarkeit, sensitiv, reproduzierbar und möglichst nicht-invasiv sein.

Hierbei bietet sich der Aminopyrin-Atemtest (ABT) an. Er erfüllt alle erwähnten Kriterien und ist außerdem unabhängig vom hepatischen Blutfluß. Er basiert auf der Demethylierung von Aminopyrin durch Isoenzyme des Cytochrom P450 und

gibt somit Aufschluss über die mikrosomale Leberfunktion (48, 54, 55, 83, 99). Beim Cytochrom P₄₅₀ handelt es sich um ein misch-funktionelles Enzymsystem, das von großer Bedeutung für die Biotransformation ist. Hierunter versteht man den Vorgang der Umwandlung von meist lipophilen toxischen Fremdstoffen in hydrophile, polare Metabolite, die so über die Galle oder die Nieren ausgeschieden werden können. Das Cytochrom P₄₅₀ dient also der Entgiftung und verhindert somit die Kumulation von schädlichen Fremdstoffen im Körper (91).

Bisher fand der ABT lediglich klinische Anwendung im Rahmen der Lebertransplantation. Hier liefert er nützliche Hinweise auf eine beginnende akute Abstoßungsreaktion, welche von den üblichen klinisch-chemischen Routineparametern anfangs nur uneinheitlich und zudem teilweise deutlich später, als vom ABT erkannt werden (3).

Die Anwendung des ABT kann zum Monitoring der Leberfunktion während der Sepsis einen wertvollen Beitrag leisten. So ist es möglich, bei nachgewiesener Minderung der Leberfunktion medikamentös oder durch Substitution fehlender Substanzen unterstützend einzugreifen (106). Es bleibt zu hoffen, dass der ABT damit in Zukunft einen Beitrag leisten kann, die Letalität der Sepsis zu senken.

3. Wissenschaftliche Grundlagen und Fragestellung der Arbeit

3.1 Wissenschaftliche und klinische Grundlagen zur Leberfunktion im septischen Geschehen

3.1.1 Pathophysiologie der abdominalen Sepsis

Im Zusammenhang mit viszeralchirurgischen Eingriffen stehen bei der abdominalen Sepsis die Anastomoseninsuffizienz sowie Perforationen im Vordergrund. Vereinzelt kann sie auch durch exogene Keimverschleppung hervorgerufen werden. In jedem Fall liegt ihr ein lokaler Herd bakterieller Keime zugrunde. Je nach körperlicher Verfassung des Patienten, die durch Faktoren, wie individuelle Disposition, Zustand des Immunsystems und Schwere des operativen Traumas, jedoch auch von der Quantität des septischen Fokus, beeinflusst wird, kann es in der Folge zum klinischen Bild der Sepsis kommen. Ebenso spielt auch die „Qualität“, also die Pathogenität der Erreger eine wichtige Rolle (4, 11, 20, 134).

Im septischen Verlauf findet eine Störung des Gleichgewichtes zwischen pro- (z.B.: $\text{TNF}\alpha$, $\text{INF}\gamma$, IL-1) und antiinflammatorischen (z.B.: IL-10 , $\text{TGF}\beta$) Zytokinen statt (9, 18, 37, 38, 56, 67, 98, 118, 119). Von hervorgehobener Bedeutung für die Leber ist dabei die systemische Wirkung der Entzündungsmediatoren Tumornekrosefaktor α ($\text{TNF}\alpha$) und Stickstoffmonoxid (NO) (24, 49, 75, 76). $\text{TNF}\alpha$ führt systemisch zu Kapillarpermeabilitätsstörungen und begünstigt die intravasale Blutgerinnung. Die Mikrozirkulationsstörung, welche unter anderem durch die Endothelschädigung hervorgerufen wird, zeigt sich durch einen massiven transvaskulären Abstrom von Flüssigkeit und Proteinen ins Interstitium. Der daraus resultierende intravaskuläre

Volumenmangel führt zu einer verminderten Perfusion der Organe. In der Leber kommt es hierbei zu vermehrter Ausbildung von portosystemischen Shunts mit konsekutiv ansteigendem Portalvenenfluß und -druck (59, 62). Infektios-toxische Schädigung und Hypoxie führen im weiteren Verlauf zum Multiorganversagen (MOV). Über Mediatoren wie Zytokine und Bakterientoxine, sowie bedingt durch die Mikrozirkulationsstörung, kann es zur disseminierten intravasalen Gerinnung kommen (DIG). Dabei führen Mikrothromben in den Kapillaren unter Verbrauch von Gerinnungsfaktoren zur Verbrauchskoagulopathie.

Des weiteren kommt es im fortgeschrittenen septischen Verlauf unter anderem zu einem Überschießen von proinflammatorischen Zytokinen. Diese werden für die gesteigerte Aktivität der NO-Synthetase (NOS) verantwortlich gemacht. Dabei handelt es sich um ein Enzym, welches aus der Aminosäure L-Arginin neben L-Citrullin Stickstoffmonoxid (NO) synthetisiert. Man unterscheidet eine konstitutive (kNOS) von der induzierbaren Form (iNOS). kNOS findet sich vorwiegend in Endothelzellen, Thrombozyten, Astrozyten, Mastzellen und enteralen, sowie zerebralen Neuronen und wird überwiegend von Bradykinin, Kalziumionophoren, ADP und Leukotrienen induziert. Zytokine und Endotoxin hingegen induzieren iNOS, welches vor allem in Makrophagen, Kupffer-Zellen, Hepatozyten und Neutrophilen, aber auch in Endothelzellen, Astrozyten, Makrophagen, Chondrozyten, Fibroblasten, Tumorzelllinien und Inselzellen vorkommt (23, 77, 120). NO ist ein kurzlebiges, lipophiles, gasförmiges Radikal, welches bei einer Reihe unterschiedlichster Mechanismen von großer Bedeutung ist (115). Es spielt eine Schlüsselrolle in der Neurotransmission, bei der Kontrolle des Blutdrucks (durch Vasodilatation) und bei immunologischen Zusammenhängen. Das bei einem schweren septischen Verlauf typischerweise auftretende Unvermögen des Körpers, einen adäquaten Blutdruck aufrechtzuerhalten, wird

auf die systemische Wirkung von NO zurückgeführt (57). Weiter inhibiert es die Thrombozytenaggregation und Leukozytenadhäsion und führt zu einer gestörten granulozytären Chemotaxis (1, 16). In der Leber bewirkt NO eine Hemmung der hepatozellulären Proteinsynthese, deren genauer Mechanismus jedoch nicht geklärt ist. Es konnte gezeigt werden, dass NO eine wichtige Rolle bei der Induktion der Leberzell-Apoptose spielt und damit direkt zur Schädigung der Leber beiträgt (28, 93, 125, 131). Außerdem bindet NO an prosthetischen Eisengruppen, wie den Hämgruppen, die auch im Cytochrom P₄₅₀ enthalten sind. Dabei kommt es zu einer Bindung an das katalytische Zentrum. Die für die Funktion notwendige Sauerstoffbindung wird somit verhindert und die Enzymaktivität blockiert. Zusätzlich zu diesem reversiblen Schritt, wird auch ein irreversibler Mechanismus postuliert (8, 84, 87, 114, 116).

3.1.2 bisherige Diagnostik der Leber im septischen Verlauf

Entsprechend ihrer eingeschränkten Funktion, kommt es seitens der Leber während der Sepsis zu verschiedenen pathologischen Symptomen. Dabei stehen die Syntheseleistung und die Detoxifikationsfunktion (Clearance) im Vordergrund. Eine herabgesetzte Syntheseleistung ist ein wichtiger Indikator des funktionellen Leberschadens. Anfangs zeigt sich dies in einem Abfall der Vitamin K abhängigen Gerinnungsfaktoren (Faktoren II, VII, IX, X, Protein C und Protein S) und Antithrombin III (AT III), später auch in einem Abfall der anderen Gerinnungsfaktoren und des Albumins. Funktionstests, wie Quick-Test, PTT, Elektrophorese, Koller-Test u.a. sind in diesem Zusammenhang gängige Verfahren, die Syntheseleistung der Leber zu beurteilen.

Außerdem geben erhöhte Spiegel von Gallensäuren und Ammoniak Hinweise auf eine verminderte Leberfunktion im Sinne einer Senkung der endogenen Clearance. Diese Tests können jedoch aufgrund der komplexen Organleistung der Leber und wegen der pathophysiologisch an sich schon veränderten extrahepatischen Faktoren eine lediglich semiquantitative Aussage treffen.

Bei exogenen Clearance-Tests hingegen werden Substanzen verwendet, die ausschließlich in der Leber metabolisiert werden und die unabhängig von der portalen Perfusion sind. Abhängig von der Quantität der durch diesen Prozess entstehenden Metaboliten, wird auf die Gesamtsituation der metabolischen Funktionskapazität der Leber geschlossen (26, 60). In diesem Zusammenhang kamen Farbstoffe zur klinischen Anwendung, die sich jedoch wegen mangelnder Praktikabilität nicht durchsetzen konnten. Das anfangs lange Zeit verwendete Bromsulphalein war nicht nur teuer und zeitaufwendig, sondern führte auch häufig zu schwerwiegenden Nebenwirkungen, wie Anaphylaxie und Thrombophlebitis. Auch das wesentlich nebenwirkungsärmere Indocyaningrün fand aufgrund seiner hohen Kosten keine klinische Anwendung (66). Ein weiterer Vertreter der exogenen Clearance-Tests stellt der Galactose-Eliminationstest dar. In Abhängigkeit der Leberfunktion nimmt die Konzentration applizierter Galactose im peripheren Blut ab. Bei mangelnder Funktion lässt sich eine deutlich verzögerte Elimination der Galactose nachweisen. Nachteilig bei dieser Methode ist jedoch der große Aufwand bei Patienten und Personal, was durch die wiederholten Blutentnahmen bedingt ist.

Hier brachte der Galactose-Atemtest einen deutlichen Fortschritt. Mit radioaktivem ^{14}C markierte Galactose wird i.v. appliziert und vom hepatischen mikrosomalen System metabolisiert. Durch das Enzym Cytochrom P₄₅₀ kommt es zur N-terminalen Demethylierung und somit zur Abspaltung des radioaktiven

CO₂, welches in der Atemluft nachgewiesen werden kann. Auf demselben Prinzip basieren auch Funktionstests mit radioaktiv markiertem Aminopyrin und Coffein. Hierbei ist festzuhalten, dass Clearance-Tests nicht zum Erstellen einer Diagnose, sondern zur Verlaufsbeurteilung fortschreitender oder chronischer Lebererkrankungen dienen sollen (14, 53, 85, 101).

Von Bedeutung im fortgeschrittenen Verlauf der Sepsis ist auch das Monitoring der Cholestase, die durch die mit der Sepsis einhergehenden Mikrozirkulationsstörung, Hypoxie und Störung des kanalikulären Galleflusses hervorgerufen wird. Die Bestimmung der Gallensäuren stellt eine kombinierte Erfassung von Leberdurchblutung, portosystemischen Shunts und intrinsischer Aufnahmekapazität der Hepatozyten dar. Weiterhin führt die Cholestase zu einer verminderten intraluminalen Gallensäurenkonzentration und somit, den Fettstoffwechsel betreffend, zu einer Malabsorption. Damit einhergehend ist eine geringere Aufnahme der fettlöslichen Vitamine A, E, D und K. Diarrhoe, Steatorrhoe und brauner Urin (Bilirubinurie) sind weitere klinische Hinweise, die auf eine Cholestase schließen lassen können. Chemische Serumanalysen zeigen bei Cholestase typischerweise Anstiege der Enzyme:

Gamma-Glutamyl-Transferase (γ GT), Alkalische Phosphatase (AP), Cholinesterase, Leuzin-Amino-peptidase (LAP) und 5-Nukleotidase. Im Labor lässt sich außerdem eine konjugierte Hyperbilirubinämie feststellen.

Neben der Cholestase kommt es bei der Sepsis zu Leberzellschädigungen, die über verschiedenartige Tests nachgewiesen werden können. Die beeinträchtigte Integrität der Hepatozyten und deren Membranfunktion wird durch einen Anstieg einiger Enzyme deutlich:

ALT (GPT), AST (GOT), GLDH, LDH, Aldolase u. a.

Bildgebende Verfahren spielen bei der Leberdiagnostik in der Sepsis eine untergeordnete Rolle. Die Sonographie beschreibt neben der Lage, Größe und Form der Leber auch deren strukturelle Beschaffenheit und lässt eine mäßige Beurteilung der intra- und extrahepatischen Gallenwege zu. Cholezystocholangiographie, ERCP, MRT und CT können ebenfalls ergänzende Hinweise liefern. Im Einzelfall werden auch invasive diagnostische Techniken, wie Feinnadelpunktion und Laparoskopie hinzugezogen.

3.2 Studiendesign

Diese Arbeit soll die klinische Einsetzbarkeit des Aminopyrin-Atemtests als funktionellen Leberfunktionstest im Rahmen des septischen Geschehens beleuchten.

Zum einen wird im Tiermodell versucht, die während der Sepsis abfallende Leberfunktion zu dokumentieren und die dabei erhobenen Ergebnisse in Bezug zu den immunologischen Veränderungen zu setzen. Des weiteren soll beurteilt werden, inwiefern der ABT dazu in der Lage ist, eine Aussage über die Prognose eines bereits an einer Sepsis erkrankten Patienten zu treffen.

Um die postoperativen Verhältnisse nach viszeralchirurgischen Eingriffen und eine aufkommende Anastomoseninsuffizienz, die zu bakterieller Peritonitis und Sepsis führen kann, zu simulieren und um ein möglichst homogenes Bild des septischen Verlaufes zu bekommen, wurde das Tiermodell „CASP“ gewählt. Bei diesem Modell wird der kontinuierliche Austritt bakterieller Keime in die Peritonealhöhle induziert, wie es bei einer Anastomoseninsuffizienz der Fall ist (13, 137, 138). Daraufhin erfolgen in zeitlichen Abständen ABT-Messungen, die

den septischen Verlauf dokumentieren sollen. Durch begleitende in vitro-Bestimmungen von Isoenzymen des CYP450 und von TNF α soll sowohl Reliabilität, als auch Validität des ABT gesichert werden.

4. Material und Methoden

4.1 Wissenschaftliche Grundlagen der Versuche

Seit Mitte der 70er Jahre befassen sich experimentelle Studien mit dem Aminopyrin-Atemtest. Heute sind die Vorteile dieses sensitiven, nicht-invasiven und quantitativen Test, der sich auf die Entgiftungsfunktion der Leber konzentriert, bekannt und anerkannt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ein vorliegender Leberschaden signifikant mit einem erniedrigten ABT-Wert übereinstimmt. Ebenfalls beschrieben ist ein Vorteil gegenüber klinisch-chemischen Parametern bei drohender Leber-Transplantatabstoßung. Hier reagierten die klassischen Parameter deutlich später und dazu uneinheitlich im Vergleich zum ABT auf die bevorstehende Rejektion (3). Auch die Korrelation der in vivo Funktion des Cytochroms P₄₅₀ mittels ABT mit in vitro Messungen mehrerer Isoenzyme von Cytochrom P₄₅₀ konnte belegt werden (14).

4.2 Methodik in vivo

4.2.1 Tiere und Tierhaltung

Die Versuche wurden an C 57/Bl 6 Mäusen der Firma Harlan durchgeführt. Die ingezüchteten Mäuse hatten ein Alter von 8 - 12 Wochen und wogen ca. 20g. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet.

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 sicher gestellt, dass entsprechende Versuchsgruppen eine Woche unter gleichen Bedingungen in einem Stall verbracht wurden. Alle Versuche wurden unter Einhaltung der deutschen Tierschutzverordnung durchgeführt.

4.2.2 Tiermodell: Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)

Im Gegensatz zu anderen tierexperimentellen Peritonitismodellen simuliert CASP die Anastomoseninsuffizienz als viszeralchirurgische Komplikation in besonders geeigneter Weise. Durch die Implantation eines Stents in das Colon ascendens wird ein kontinuierlicher Fluss von Fäces in das Abdomen hervorgerufen. Der variable Durchmesser des Stents nimmt Einfluss auf die in die Peritonealhöhle eintretende Menge von bakterienhaltigem Stuhl. Dieses chirurgische Modell erlaubt somit eine Einflussnahme auf das Ausmaß der Infektion.

4.2.2.1 Anästhesie

Um die Leberfunktion nicht zu beeinträchtigen, wurde die Äthernarkose gewählt, welche leicht zu steuern ist und keine störenden Nebenwirkungen aufweist. Zur Narkoseeinleitung wird das Versuchstier in einen luftdicht verschlossenen Glaskolben (Volumen: ca. 1 Liter) verbracht, in welchem sich mit Diethylether getränkter Zellstoff befindet. Nach sich rasch einstellender Narkose wird das Tier aus dem Kolben entfernt und rücklings auf eine Korkplatte gelegt, wo es mit Klebestreifen an den Extremitäten fixiert wird.

Zur Aufrechterhaltung der Narkose wird ein Zentrifugenröhrchen (Volumen: 15ml) verwendet, in welchem sich mit Diethylether getränkter Zellstoff befindet. Durch Veränderung des Abstandes des Röhrchens zur Nase des Versuchstieres kann die Narkosetiefe sehr gut gesteuert werden. Fünf Minuten nach Entfernen des Röhrchens erwacht das Versuchstier und zeigt nach weiteren fünf Minuten völlig unauffälliges Verhalten.

4.2.2.2 Operationen

- Instrumentarium

- übliches mikrochirurgisches Besteck
(Nadelhalter, Pinzette gebogen, Mikroschere)
- Venenverweilkatheter (Stärke: 16 G)
- 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)
- Injektionsspritze 1ml
- physiologische Kochsalzlösung
- Wattestäbchen
- Cutasept ®F, Hautdesinfizienz farblos, Bode Chemie, Hamburg, Deutschland

- Laparotomie

Desinfektion der Haut, bzw. des Fells. Medianes Anheben der Haut mit anatomischer Pinzette und Längsinzision mit Schere. Fortführen der Hautinzision oberhalb der Symphyse in einer Länge von 1,5 cm. Anheben der Bauchmuskelfaszie mit Pinzette und Eröffnen der Linea alba mit Schere (s.Abb.1).

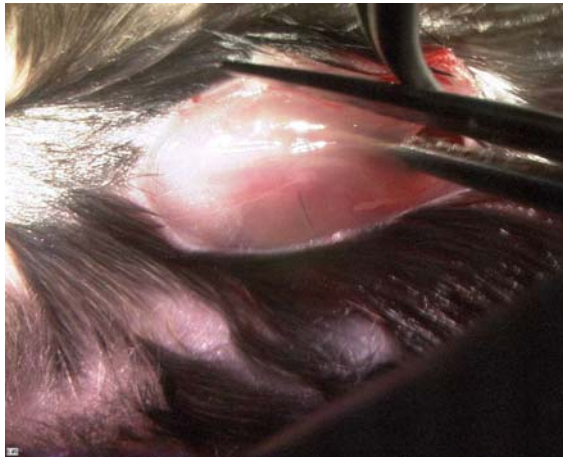


Abb.1: Eröffnen der Linea alba

- Implantation des Colonstents

Vorbereiten des Stents durch zirkuläre Einritzung 3mm nach Beginn der Plastikummantelung mittels Schere. Aufsuchen und Ausschwenken von Zökum, Colon ascendens und Ileozökalklappe mit Hilfe von Wattestäbchen (s.Abb.2).



Abb. 2: Darstellung des Colon ascendens

1,5cm distal der Ileozökalklappe streng antimesenterialer, tangentialer Durchstich und doppelter Knoten mit Ethilon 7/0. Punktion des Colon

ascendens mit der vorbereiteten Braunüle nahe der Fadenfixierung (s.Abb.3).



Abb. 3: Punktion des Colons mit Stent

Vorschieben der Braunüle, bis sich die Einritzung auf Niveau der Serosa befindet. Fixierung der Braunüle durch chirurgischen Knoten und weiterem Knoten nach Durchstechen des Darmes auf der gegenüberliegenden Seite. Zurückziehen des Mandrins und Kürzen der Braunüle auf 1mm über Fadenniveau. Füllen des Stents durch leichten Druck auf das Zökum (s.Abb.4).



Abb. 4: Fixierter, mit Fäces gefüllter Stent

Reposition der ausgeschwenkten Darmanteile in die Peritonealhöhle.
Flüssigkeitssubstitution mit physiologischer Kochsalzlösung (0,5ml i.p.)
mittels Injektionsspritze.

- Wundverschluss

Fortlaufender Verschluss von Peritoneum, Muskulatur und Faszien (s.Abb.5)
und anschließender Verschluss der Haut mit Einzelkopfnähten mit 5/0
Ethilon (s.Abb.6).

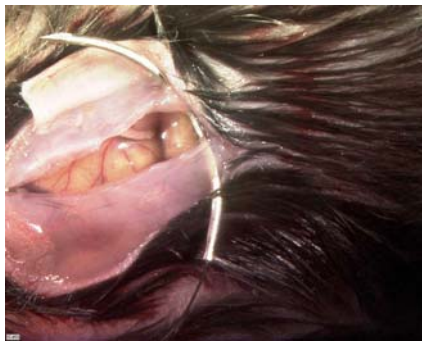


Abb. 5:
Naht von Peritoneum, Muskulatur und Faszien

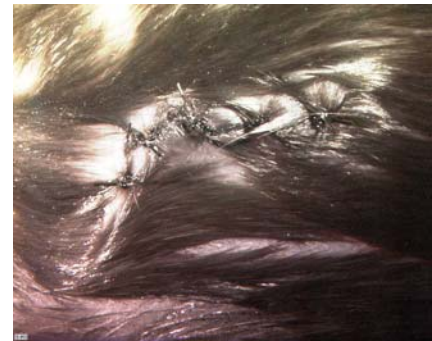


Abb. 6:
Hautnaht

- sham Operation

Dieser Eingriff ist dazu gedacht, das operative Trauma zu simulieren, ohne ein septisches Krankheitsbild hervorzurufen. Im Gegensatz zur CASP wird der Stent lediglich an die Oberfläche des Colon ascendens befestigt, ohne eine Verbindung zum Darmlumen zu schaffen. Die sham operierten Mäuse stellen somit die Kontrollgruppe dar.

4.2.2.3 Postoperatives Vorgehen

Zur postoperativen Überwachung werden die Tiere alle sechs Stunden nach einem standardisierten Schema untersucht. Dabei werden äußere Erscheinung, Körpergewicht, Atemgeräusch, spontanes und provoziertes Verhalten, sowie Reaktion auf Reize erhoben. Alle Kriterien werden nach steigender Belastung mit 0 bis 3 Punkten bewertet. Werden wenigstens 3 Kriterien mit 3 bewertet, werden alle mit 3 bewerteten Kriterien mit einem Zusatzpunkt versehen. Damit wird erreicht, dass sich die Belastungskriterien nicht linear addieren und somit ein mit 3 bewertetes Kriterium wesentlich mehr ins Gewicht fällt, als drei mit 1 bewertete Kriterien. Danach werden alle ermittelten Punktwerte addiert und daraus die Belastungssituation des Versuchstieres ermittelt. Erreicht ein Tier 12 oder mehr Punkte, erreicht die Belastung definitionsgemäß ein erhebliches Ausmaß. Das Tier wird als nicht überlebensfähig eingestuft und schmerzlos geopfert.

4.2.2.4 Organentnahme

Das Versuchstier wird wie schon beschrieben in die Narkosekammer verbracht und in narkotisiertem Zustand auf der Korkplatte fixiert. Durchtrennen der alten Operationsnaht mit der Schere und Erweitern des Schnittes bis zum Sternum. Abpräparation der Leber von den sie versorgenden Strukturen und Entnahme. Lagerung der Präparate bei -180°C .

4.2.3 Tiermodell: Aminopyrine Breath Test (ABT)

Der ABT ist ein selektiver Funktionstest des Cytochroms P₄₅₀. Zu diesem Hämprotein zählen zehn Gen-Familien, davon acht bei Mammilarien, die sich weiter in mehrere Subfamilien untergliedern lassen. Insgesamt sind bis heute 67 cDNA-Sequenzen bekannt. Cytochrom P₄₅₀ lässt sich sowohl in Mitochondrien der Nebenniere, als auch im endoplasmatischen Reticulum der Leber nachweisen, wo ihnen eine Reihe unterschiedlicher Funktionen zufällt. Dazu zählt der oxidative Metabolismus von Steroiden, Fettsäuren, Prostaglandinen, Leukotrienen, Pheromonen u.a. (2, 91).

Bei der Entgiftung spielt Cytochrom P₄₅₀ eine dominante Rolle. Bei dem als Biotransformation bekannten Mechanismus werden lipophile Substanzen zuerst oxidiert und die dabei entstandenen Metaboliten mittels Transferasen an Glucuron- oder Schwefelsäure konjugiert. Dadurch erhalten vormals lipophile Substanzen einen hydrophilen Charakter und können über die Galle oder den Urin ausgeschieden werden.

Beim ABT wird mit ¹⁴C markiertes Aminopyrin i.v. gespritzt, welches in der Leber über das Cytochrom P₄₅₀ metabolisiert wird. Aminopyrin, chemisch als 4-Dimethylaminoantipyridin bezeichnet, wird im ersten metabolischen Schritt zu CO₂ und 4-Monomethylaminoantipyridin abgebaut. Das CO₂, welches vorher radioaktiv markiert wurde, wird abgeatmet und kann in der Expirationsluft nachgewiesen werden.

4.2.3.1 Injektion des radioaktiven Aminopyrins i.v.

Hierfür wird das Versuchstier in ein röhrenförmiges Behältnis verbracht, an dessen Ende sich eine Öffnung befindet, aus welcher der Schwanz des Tieres hervorsteht. Über den Schwanz wird nun eine Rotlichtlampe gestellt, deren Wärmestrahlung bei den im Schwanz befindlichen Venen eine Vasodilatation hervorruft. Daraufhin wird über eine Injektionsspritze mit feiner Nadel das markierte Aminopyrin langsam appliziert. Die Menge des injizierten Markers errechnet sich aus dem konstant applizierten Volumen (0,2ml) und dem vorher im Nuklearmedizinischen Institut bestimmten Faktor (also der Menge des Markers pro Volumen).

4.2.3.2 Durchführung der Messung

Das mit dem Marker versehene Tier wird unverzüglich in eine röhrenförmige Glaskammer (Volumen: 0.3l) verbracht, welche an jedem Ende jeweils eine kleine Öffnung besitzt. Eine Öffnung stellt eine Verbindung zur Umgebungsluft dar und dient der Frischluftzufuhr. An die andere ist ein Schlauchsystem konnektiert, welches, angetrieben von einem maschinellen Sauger, die Luft aus der Kammer zu den Messbehältern leitet. Im ersten Behälter wird der einströmenden Luft durch Ethanol Feuchtigkeit entzogen. Im zweiten und dritten Behälter wird die Luft durch Hyaminhydroxid äquilibriert, welches das anflutende CO₂ bindet (s.Abb.7).

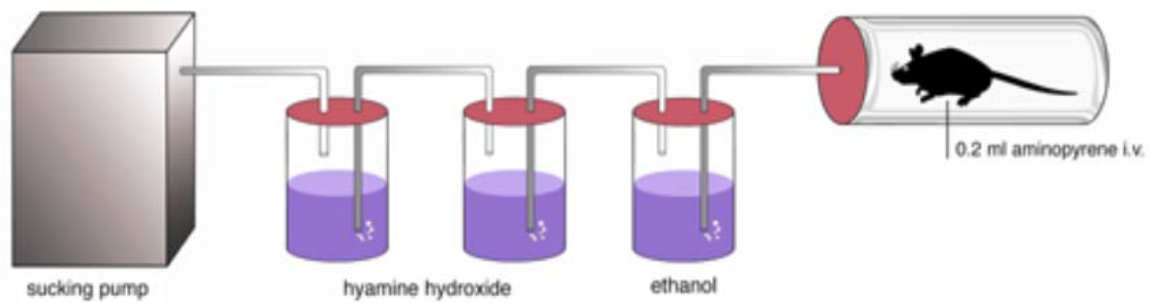


Abb. 7: Versuchsaufbau der ABT-Messung

4.2.3.3 Auswertung der Ergebnisse

Abschließend werden die Messbehälter im Nuklearmedizinischen Institut in einen β -Counter gestellt, welcher die Menge des markierten CO_2 misst.

4.2.4 Aminopyrine Breath Test (ABT) beim Menschen

Beim Patienten findet der ABT schon seit geraumer Zeit Anwendung im klinischen Alltag. Vor allem zur Verlaufsbeurteilung der Leberfunktion bei Patienten nach einer Lebertransplantation leistet der Test einen wichtigen Beitrag. In dieser Studie soll die Anwendung des ABT zur Beurteilung der Leberfunktion im septischen Verlauf betrachtet werden. Insbesondere die Frage, inwieweit der ABT eine Prognose eines septischen Patienten zulässt, spielte hierbei eine Rolle.

4.2.4.1 Demographische Daten der septischen Patienten

Bei der Auswahl der in diese Studie einbezogenen Patienten wurde folgendermaßen verfahren:

Zunächst wurden bei allen Patienten, bei denen ein großer viszeralchirurgischer Eingriff bevorstand, ein Kontroll-ABT durchgeführt. Postoperativ, erfolgte die erste Einteilung der Patienten (s. Abb. 8). Ausschließlich bei Patienten, welche die SIRS-Kriterien erfüllten, wurden kontinuierlich ABT-Daten erhoben. Bei der Auswertung schließlich erfolgte die Differenzierung zwischen Patienten, welche die Sepsis überwinden konnten und jenen, die ihr erlagen.

Charakteristik	Überlebende (n = 29)	Nicht- Überlebende (n = 20)	<i>P</i>
Basisdaten			
Alter (Jahre ± SEM)	62,3	64,1	0.0
männlich	21	12	
weiblich	8	8	
Zugrunde liegende Krankheit			
Malignität	21	13	0.0
Nicht-maligne Krankheit	8	7	
Chirurgische Eingriffe			
Ösophagektomie	11	5	
Totale Gastrektomie	6	4	
Partielle Pankreatoduodenektomie	2	2	0.0
Colorektale Chirurgie	5	5	
Gemischte Resektionschirurgie	5	4	

Abb. 8: Kollektiv der septischen Patienten

4.2.4.2 Durchführung des ABT beim Menschen

Wie im Tiermodell basiert auch der ABT beim Menschen auf der Demethylierung von [^{14}C] Dimethylaminopyrin zu $^{14}\text{CO}_2$. Von ruhenden und nüchternen Patienten wurden vor und 30 Minuten nach intravenöser Injektion von 50 kBq [^{14}C] Dimethylaminopyrin Atemproben genommen. Die ^{14}C -Aktivität wurde in einem β -Counter gemessen und als Prozentsatz der applizierten Menge ausgedrückt (Normalwerte zwischen 0,6 bis 1,0 [% Dosis \times kgKG pro (mmol CO_2)]. Die Gesamtkörper-Belastung an Radioaktivität betrug weniger als 1 mrem pro Messung.

4.3 Methodik in vitro

4.3.1 Aktivitätsmessung der Isoenzyme

Die enzymatischen Aktivitäten der verwendeten Zellsuspensionen aus den explantierten Lebern wurden in Abhängigkeit der Substratspezifität der Cytochrome P₄₅₀ mit verschiedenen Aktivitätstests wie folgt bestimmt:

- Ethoxy-Resorufin-O-Deethylase-Test (EROD) für CYP 1A1 und CYP 1A2
- Lidocain-Test für CYP 3A4

4.3.2 ELISA zur Bestimmung der TNF α -Konzentration

Die TNF α -Konzentrationen im Serum wurden entsprechend den Anweisungen des Herstellers gemessen. Es wurde TNF α ELISA Kit der Firma BioSource Europe S.A.. Nivelles, Belgien verwendet. Blutproben wurden aus der V. cava entnommen und bei 4 °C zentrifugiert. Die Sensitivität des Assays betrug 3,0 pg/ml. Die Bestimmung der Absorbierung der Proben erfolgte mittels einem MRX Microplate Reader (Dynatech, Denkendorf, Germany), mit 405 nm als Primär- und 630 nm als Referenz-Wellenlänge.

4.4 Gruppeneinteilung

Da in dieser Arbeit gezeigt werden soll, inwieweit der ABT ein aussagekräftiger Test ist, die Leberfunktion im septischen Verlauf zu beurteilen, wurden im Intervall von fünf bzw. zehn Stunden nach CASP wiederholt Messungen vorgenommen. Das in Abb. 9 dargestellte Letalitätsverhalten der Mäuse nach CASP im zeitlichen Verlauf zeigt, dass die Sepsis zwischen der 25. und 47. Stunde letal endet.

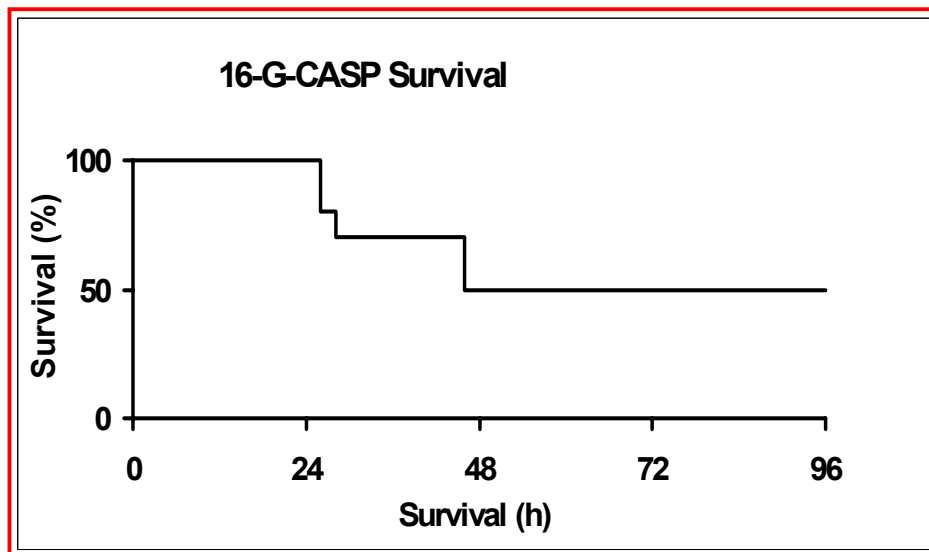


Abb. 9: Letalitätsverhalten nach CASP

Klinisch gesehen beginnt die Maus etwa zwölf bis fünfzehn Stunden nach CASP mit Symptomen der Sepsis. Die Mäuse zeigen ein febriles Erscheinungsbild, was durch das von der Transpiration stark durchnässte Fell und das apathische Verhaltensmuster deutlich wird. Auch die Schmerzempfindlichkeit bei Druck auf das Abdomen lässt auf eine bestehende Peritonitis schließen.

Die letzten ABT-Messungen erfolgten 25h postoperativ, zu einem Zeitpunkt, bei dem von einer bereits vorangeschrittenen Sepsis ausgegangen werden kann. Die Ergebnisse dieser „Sepsis-Gruppe“ wurden mit denen von Kontrolltieren aus der „sham-Gruppe“ verglichen.

4.5 Statistik

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

5. Ergebnisse

5.1 ABT im Mausmodell

In dieser Versuchsreihe sollte der septische Verlauf mit ABT-Messungen dokumentiert werden. Hierfür wurden 15 Tiere mit CASP operiert und in drei Gruppen zu je fünf Tieren eingeteilt. Bei den Tieren jeder Gruppe wurden daraufhin 5, 15 und 25 Stunden postoperativ ABT-Messungen vollzogen.

Zur Kontrolle erfolgte bei sham operierten Mäusen das gleiche Schema.

In Abb. 10 ist ersichtlich, dass es im septischen Verlauf zu einer kontinuierlichen Erniedrigung der ABT-Messwerte kommt. Der 25 Stunden postoperativ erhobene Wert ist dabei auf 64% des Kontrollwertes gesunken.

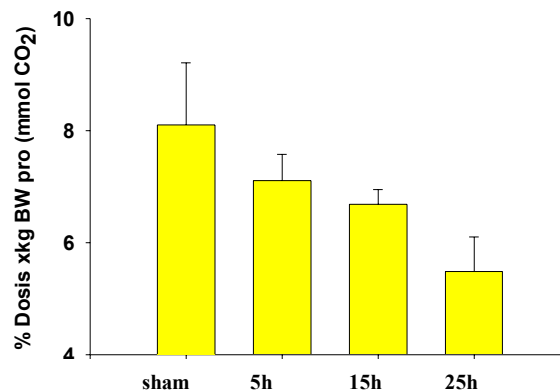


Abb. 10: Abfall des ABT im septischen Verlauf

5.2 ABT beim Patienten

Die Detoxifikationsleistung der Leber wurde beim Patienten präoperativ und später täglich, der Entwicklung der Sepsis folgend, gemessen. In die Auswertung gingen die ABT-Werte der ersten drei und der letzten fünf Tage der Sepsis ein. In Abb. 11 wird deutlich, dass präoperativ noch keine Differenzierung zwischen Überlebenden und an einer Sepsis erliegenden Patienten möglich ist. In der initialen Phase der Sepsis wird die Demethylierung von Aminopyrin bei beiden Gruppen gehemmt. Jedoch zeigt sich dieser Effekt bei denjenigen Patienten signifikant deutlicher, welche schließlich an der Sepsis versterben. Im Verlauf der Sepsis kommt es in der späten Phase bei den die Sepsis überlebenden Patienten zu einer Erholung der Leberfunktion, was sich in einer Wiederherstellung der ABT-Werte auf das Ausgangsniveau verdeutlicht. Im Gegensatz dazu verbleibt die hepatische Detoxifikationskapazität bei den die Sepsis nicht überlebenden Patienten auf einem stark reduzierten Level ($p < 0.001$).

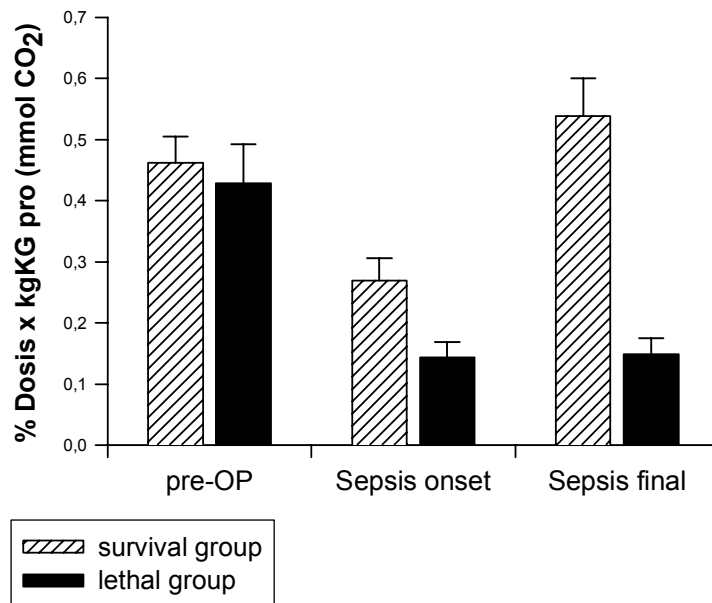


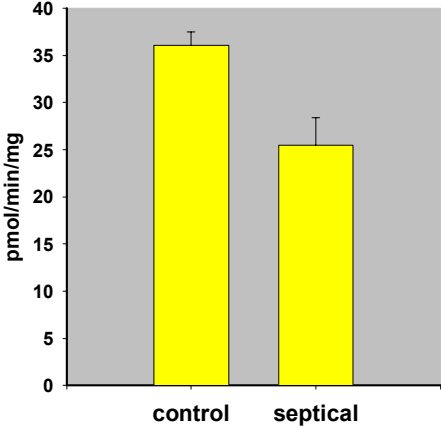
Abb. 11: ABT als prognostischer Indikator

5.3 Fluorometrie

Die in vivo Daten, die durch das ABT bei der Maus erhoben wurden, sollten ferner durch in vitro Messungen der Aktivität von Isoenzymen des Cytochroms P₄₅₀ überprüft werden. Dadurch sollte die Validität des ABT sichergestellt und seine Aussagekräftigkeit fundiert werden. Aus Abb. 12 wird ersichtlich, wie sich die Aktivität der drei Isoenzyme 1A1, 1A2 und 3A4 bei gesunden Mäusen von derer septischer Mäuse unterscheidet. Die Isoenzyme 1A1 und 1A2 der septischen Maus sind auf 68%, beziehungsweise 70% des Ausgangswertes zurückgefallen. Die Ergebnisse spiegeln damit nahezu exakt die Verhältnisse aus

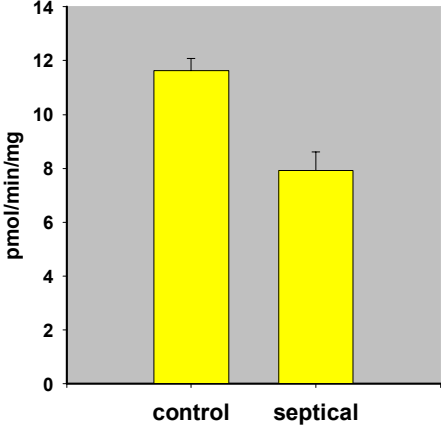
dem ABT wider. Das Isoenzym 3A4 zeigt eine vergleichsweise hohe Sensibilität und sinkt sogar auf 38% der früheren Aktivität herab (s.Abb.12 a,b,c).

Isoenzym 1A1



a

Isoenzym 1A2



b

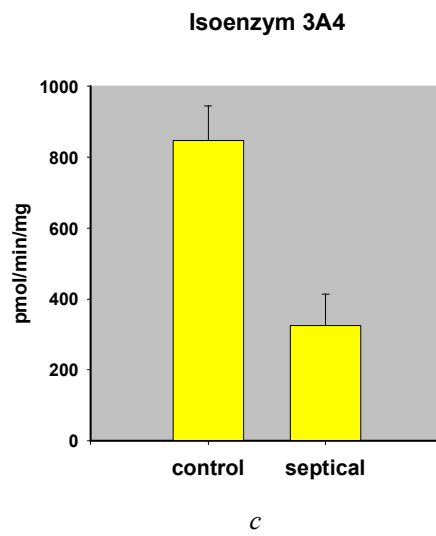


Abb. 12: Fluorometrie-Ergebnisse der Isoenzyme 1A1, 1A2 und 3A4 von sham-CASP operierten Mäusen und Mäusen 25h post-CASP

5.4 ELISA

Die nach den ABT-Messungen bei der Maus erfolgten Leberexplantationen ermöglichten neben den durch Fluorometrie erhobenen Aktivitäten der Isoenzyme weiter reichende Datenerhebung. So wurden mittels ELISA die Veränderungen des TNF- α Spiegels während des septischen Verlaufs ermittelt. Wie zu erwarten, bestätigte sich der aus der Literatur bekannte Anstieg von TNF- α während der Sepsis.

In Abb. 13 wird veranschaulicht, dass der TNF- α Spiegel kontinuierlich zunimmt, um zum Zeitpunkt des präfinalen septischen Schocks schließlich sein Maximum zu erreichen.

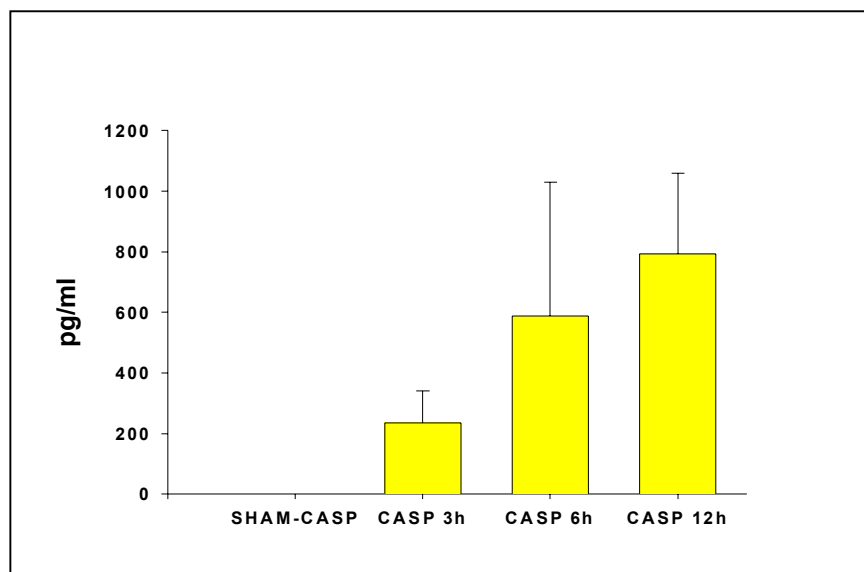


Abb. 13: TNF α -Spiegel im septischen Verlauf

6. Diskussion

Diese Studie beschreibt die Möglichkeit, die hepatische Funktion während des septischen Verlaufs mittels des Aminopyrin-Atemtests zu beurteilen. Um die klinische Situation einer Anastomoseninsuffizienz widerzuspiegeln, wurde das Sepsismodell „CASP“ gewählt, welches eine kontinuierliche Verbreitung von Bakterien im Abdomen bewirkt und damit eine fortschreitende Peritonitis und schließlich eine Sepsis zur Folge hat.

So kommt es im septischen Verlauf unter anderem zu einem kontinuierlichen Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen und bakteriellem Endotoxin, die für die gesteigerte Aktivität der NO-Synthetase verantwortlich gemacht werden (82, 122). Das durch dieses Enzym synthetisierte NO spielt eine Schlüsselrolle bei Kreislauf regulierenden und immunologischen Vorgängen. Neben der Beeinträchtigung der zellulären Immunabwehr und der Ausbildung einer ausgeprägten arteriellen Hypotonie, bewirkt NO in der Leber eine Hemmung der hepatozellulären Proteinsynthese. Der genaue Mechanismus dieses Vorganges ist noch ungeklärt. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass NO auch direkt zur Schädigung der Leber beiträgt (51). Bekannt ist auch die Eigenschaft von NO, das Detoxifikationsenzym Cytochrom P₄₅₀ wirksam zu blockieren (47, 84, 104, 111). Diesen Effekt veranschaulicht der ABT, indem er die Detoxifikationskapazität der Leber quantitativ misst.

Der ABT ist seit langem ein gut etabliertes Untersuchungsverfahren, um die Leberfunktion zu beurteilen. Auch die Übertragbarkeit des Tests vom Menschen auf Ratten konnte ausführlich belegt werden (83). Da mehrere Isoenzyme des Cytochrom P₄₅₀ für die Metabolisierung von Aminopyrin verantwortlich sind, ist

der Test nicht nur spezifisch für eine Subgruppe des Enzyms. Der inhibierende Einfluss von NO auf Cytochrom P₄₅₀ ist schon mehrfach beschrieben worden. Dieser wird durch die Blockierung der NO-Synthese mittels L-NAME, einem NOS-Inhibitor belegt, die sich in einer Verbesserung der Cytochrom P₄₅₀-Aktivität deutlich machte (1, 10, 126). Hierbei fand sich außerdem eine signifikante Korrelation zwischen der ABT-Aktivität und Serum Konzentrationen von Nitrit und Nitrat, den stabilen Produkten der Oxidation von NO. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass NO als ein Hauptfaktor der Suppression der hepatischen Detoxifikationsleistung bei entzündlichen Vorgängen zu gelten hat. So wurde die Inhibierung von iNOS bereits mit einer potentiell die Sepsisletalität senkenden Wirkung in Verbindung gebracht (121). Interessanterweise geht die Hemmung der NO-Synthese beim entzündlichen Geschehen zwar mit einem verbesserten Detoxifikationsvermögen der Leber, nicht aber zwingend auch mit einer erniedrigten Mortalität einher. Es wurde gezeigt, dass iNOS Knockout Mäuse nach CLP eine höhere Mortalität aufweisen, als Mäuse vom Wildtyp (29). NO hat also neben der die Leberfunktion schädigenden, auch für das Überleben einer Sepsis nützliche Eigenschaften. Die genauen Mechanismen dieser NO-Wirkung sind noch nicht geklärt. Diskutiert wird unter anderem die hemmende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation, sowie die vasodilatierende Eigenschaft von NO. So bewirkt NO unter anderem eine vorübergehend verbesserte Perfusion der mesenterialen Gefäße (62). Außerdem scheint NO eine exzessive Ausschüttung von TNF α zu verhindern (124). Hohe Serumspiegel dieses Zytokins gehen ebenfalls mit einer hohen Mortalität einher.

Die Zusammenhänge von Zytokinen, NO und Cytochrom P₄₅₀ sind wichtig für das Verständnis des ABT.

Teil dieser Arbeit waren ABT-Messungen an Mäusen des Typs C57 Black 6. Dabei wurden die Werte von sham-operierten, nicht septischen Mäusen mit septischen Mäusen verglichen. Im postoperativen, septischen Verlauf zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall der Cytochrom P₄₅₀-Aktivität im ABT. Das Minimum der während Sepsis gemessenen Cytochrom P₄₅₀-Aktivität betrug 25h postoperativ ca. 64% des Ausgangswertes. Um die Validität des ABT zu bestätigen und die bisher bekannten Zusammenhänge einer erniedrigten Leberfunktion während Sepsis zu erhärten, wurden weitere Tests hinzugezogen. In der Fluorometrie zeigte sich ein nahezu identischer Aktivitätsabfall einiger Isoenzyme des Cytochrom P₄₅₀ wie beim ABT. Dies verdeutlicht, inwieweit der ABT als in vivo Test mit in vitro Aktivitätsmessungen des Cytochrom P₄₅₀ vergleichbar ist. Außerdem konnte mit dem ABT bei zunehmender Schwere der Sepsis auch eine kontinuierliche Verschlechterung der Detoxifikationsleistung der Leber gezeigt werden. Dieser Verlauf korreliert mit während der Sepsis ansteigenden TNF α -Spiegeln. Somit bestätigte sich der bekannte Zusammenhang von während bei einer Sepsis ansteigenden proinflammatorischen Zytokinen und damit verbundener verstärkter NO-Synthese und damit einhergehender Hemmung der Cytochrom P₄₅₀-Aktivität.

Auch die bei Patienten erhobenen Daten sprechen sehr für eine klinische Anwendbarkeit des ABT. Es ließ sich zeigen, dass persistierend niedrige ABT-Werte mit einer erhöhten Letalität septischer Patienten einhergehen. Somit ist im ABT auch ein prognostischer Parameter im Verlauf einer Sepsis zu sehen.

Der ABT spiegelt die durch die Sepsis hervorgerufene Hemmung der Leberfunktion quantitativ wider. Von großem Vorteil ist die hohe Sensitivität der

Messung und die Möglichkeit, sie beliebig oft zu wiederholen. Die radioaktive Belastung liegt unter 1mrem pro Messung und lässt sich auch bei wiederholten Tests vernachlässigen. Ein weiterer prägnanter Vorteil ist die Möglichkeit, schnell Zugriff zu den aktuellen Daten zu erlangen. Damit lassen sich Veränderungen der Leberfunktion gut verfolgen. Wesentlich schneller als durch Ergebnisse klinisch-chemischer Parameter lässt sich die Wirksamkeit einer Therapie nachvollziehen. Im Falle des septischen Krankheitsbildes ist dies von hervorgehobener Bedeutung, da die therapeutischen Möglichkeiten mit progredienter Schwere und Komplikationen naturgemäß stark abnehmen.

7. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Möglichkeit, die hepatische Detoxifikationskapazität während des septischen Verlaufs mittels ABT zu beurteilen, untersucht. Um die klinischen Verhältnisse einer durch Anastomoseninsuffizienz hervorgerufenen Sepsis zu imitieren, wurde das bakterielle Peritonitismodell CASP in der Maus angewandt. Dabei wird durch ein chirurgisch herbeigeführtes Leck im Colon der Maus eine bakterielle Peritonitis erzeugt. Die sich in der Folge entwickelnde Sepsis geht mit einer starken Schädigung vieler Organe einher. Die Leber zählt in diesem Zusammenhang zu den stark betroffenen Organen. Bisher ließ sich dies durch eine Reihe klinisch-chemischer Parameter und anderer zum Teil recht aufwendiger Tests nachweisen. Praktisch jedoch stand die Beurteilung der Leberfunktion und damit die Möglichkeit, frühzeitig auf eine Schädigung zu reagieren, vor einer Reihe von Problemen. So reagieren klinisch-chemische Parameter erst verhältnismäßig spät auf eine Beeinträchtigung der hepatischen

Funktion. Außerdem verhalten sie sich im komplexen Geschehen der Sepsis mitunter uneinheitlich zueinander und können so einen etwaigen Schaden verschleiern. Andere Tests, wie zum Beispiel Clearance-Untersuchungen mit Indocyaningrün oder Galactose fanden wegen zu hohen Kosten oder enormen Aufwand keine Anwendung im klinischen Alltag. Demgegenüber besticht der ABT durch eine Reihe von Vorteilen. Seine Durchführung ist ohne großen zeitlichen und personellen Aufwand zu ermöglichen. Die Messungen können beliebig oft wiederholt werden und schon nach wenigen Minuten kann auf die Ergebnisse zurückgegriffen werden. Weiterhin ist für den ABT kein besonders geschultes Personal vonnöten. Die Anwendung am Patienten ist einfach durchführbar und die Auswertung erfolgt automatisch im β -Counter. Lediglich die Notwendigkeit von radioaktiv markiertem CO_2 und eines β -Counters lässt eine Anwendung in kleineren Häusern nur bedingt zu. Der ABT zeichnet sich weiterhin durch seine Nicht-Invasivität aus. Beim Menschen wird das Aminopyrin nicht zwingend wie bei der Maus intravenös appliziert, sondern kann ebenso oral, in Form einer Kapsel gegeben werden. Auch bei beatmeten Patienten kann die Leberfunktion durch den ABT gemessen werden.

Um die bisherigen Kenntnisse über den ABT zu belegen, wurden in dieser Arbeit einige Tests dem ABT hinzugezogen. So konnte bei in vitro Messungen der Aktivität von Isoenzymen von Cytochrom P₄₅₀ ein den Daten des ABT nahezu gleichwertiger Rückgang im septischen Verlauf nachgewiesen werden. Für die bei der Sepsis auftretende Hemmung des Cytochrom P₄₅₀ wird die Induktion des Enzyms iNOS verantwortlich gemacht, die wiederum durch hohe TNF α -Spiegel hervorgerufen wird. Der schon länger bekannte Anstieg dieses proinflammatorischen Zytokins während der Sepsis wurde hier bestätigt. Es

zeigte sich eine negative Korrelation zwischen TNF α -Spiegeln und der im ABT gemessenen Detoxifikationskapazität der Leber.

Des Weiteren ergab sich durch die Anwendung des ABT die Möglichkeit, eine Aussage über die Prognose eines septischen Patienten zu treffen. So deuten persistierend niedrige ABT-Werte auf eine stark eingeschränkte Leberfunktion hin. Damit verbunden sind negative Auswirkungen auf die Entgiftung und Ausscheidung toxischer Stoffe, die gestörte Synthese von Proteinen und Gerinnungsfaktoren und die fehlende Aufrechterhaltung der Homöostase von Stoffwechselfvorgängen, die entscheidend für die Prognose des Patienten sind.

Eine essenzielle Verbesserung der Therapiechancen wird mit der Entwicklung von Screeningmethoden einhergehen, die den behandelnden Arzt frühzeitig auf ein septisches Geschehen hinweisen. Um eine möglichst rasche Unterstützung der Leberfunktion bei einer aufkommenden Sepsis zu gewährleisten, ist unserer Erkenntnis nach das Hinzuziehen des ABT zu empfehlen.

8. Literaturverzeichnis

1. Aaron S.D., Valenza F., Volgyesi G., Mullen J.B., Slutsky A.S., Stewart T.E. Inhibition of exhaled nitric oxide production during sepsis does not prevent lung inflammation. *Crit Care Med.* 1998;26(2):309-14.
2. Äbelö., Andersson T.B., Antonsson M., Knuts Naudot A., Skanberg I., Weidolf L. Stereoselective metabolism of omeprazole by human Cytochrome P450 enzymes. *Drug Metabol. Disp.* 2000; 28: 966-972
3. Adolf J., Martin W.G., Müller D.F., Beckurts K.T.E., Schneider-Eicke J., Wittekind C., Heidecke C.-D. Einfluß der akuten zellulären Abstoßung auf die Leberfunktion nach orthotoper Lebertransplantation. *Dtsch med. Wschr.* 1992;117:1823-1828
4. Adrie C., Pinsky M.R. The inflammatory balance in human sepsis. *Intens Care Med* 2000;26:364-375
5. Alejandria M.M., Lansang M.A., Dans L.F., Mantaring J.B. Intravenous immunoglobulin for treating sepsis and septic shock. *Cochrane Database Syst Rev.* 2000;(2):CD001090
6. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med.* 1992 Jun;20(6):864-74
7. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troche G, Chaumet-Riffaut P, Bellissant E. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA.* 2002;288(7):862-71
8. Angelov E.T., Murat J., Georgiev N., Nicolov N. Endotoxin inhibitory effect on the liver cytochrome P-450-monoxygenase system. *Z. med. Labor.-Diagn.* 1983;24:259-263
9. Asseman Ch., Mauze S., Leach M.W., Coffman R.L., Powrie F. An essential role for Interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 1999; 190:995-1003
10. Avontuur J.A.M., Stam T.C., Jongen-Lavrencic M., van Amsterdam J.G.C., Eggermont A.M.M., Bruining H.A. Effect of L-NAME, an inhibitor of nitric oxide synthesis, on plasma levels of Il-6, il-8, TNF- α and nitric/nitrate in human septic shock. *Intensive Care Med* 1998;24: 673-679.
11. Baker C.C., Huynh M.D. Sepsis in the critically ill patient. *Curr Probl Surg* 1995;32:331-335
12. Barthlen W., Stadler J., Lehn N.L., Miethke T., Bartels H., Siewert J.R. Serum levels of end products of nitric oxide synthesis correlate positively with tumor necrosis factor alpha and negatively with body temperature in patients with postoperative abdominal sepsis. *Shock.* 1994;2(6):398-401
13. Barthlen W., Zantl N., Pfeffer K., Heidecke C.-D., Holzmann B., Stadler J. Impact of experimental peritonitis on bone marrow cell function. *Surgery* 1999;126:41-7
14. Becker M. ¹³C breath tests for measurement of liver function. *Gut* 1998;43(suppl):25-27
15. Bellingan G. Inflammatory cell activation in sepsis. *Brit. Med. Bulletin* 1999;55:12-29
16. Benjamim C.F., Ferreira S.H., Cunha F.Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. *J Infect Dis.* 2000;182(1):214-23. *Epub* 2000 Jun 29
17. Bernard G.R., Vincent J.L., Laterre P.F., LaRosa S.P., Dhainaut J.F., Lopez-Rodriguez A., Steingrub J.S., Garber G.E., Helterbrand J.D., Ely E.W., Fisher C.J. Jr; Recombinant human protein C

- Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) study group. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med.* 2001 Mar 8;344(10):699-709
18. Bohn E., Sing A., Zumbihl R., Bielfeldt C., Okamura H., Kurimoto M., Heesemann J., Autenrieth I.B. Il-18 (IFN- γ -inducing factor) regulates early cytokine production in, and promotes resolution of, bacterial infection in mice. *J. Immunology* 1998;160:299-307
 19. Bone RC. The sepsis syndrome. Definition and general approach to management. *Clin Chest Med.* 1996;17(2):175-81
 20. Bone R.C. The pathogenesis of sepsis. *Annals Int Med* 1991;115:457-469
 21. Bone R.C., Balk R.A., Cerra F., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M.H., Sibbald W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992;101:1644-55
 22. Bosscha K., van Vroonhoven T.J., van der Werken C. Surgical management of severe secondary peritonitis. *Br J Surg* 1999;86:1371-1377
 23. Boucher J.L., Moali C., Tenu J.P. Nitric oxide biosynthesis, nitric oxide synthase inhibitors and arginase competition for L-arginine utilization. *Cell Mol Life Sci* 1999;55(8-9):1015-28
 24. Brouckaert P., Fiers W. Tumor necrosis factor and the systemic inflammatory response syndrome. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;216:167-87
 25. Calandra T., Echtenacher B., Roy D.L., Pugin J., Metz C.N., Hultner L., Heumann D., Mannel D., Bucala R., Glauser M.P. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med.* 2000;6(2):164-70
 26. Caspary W.F. Atemanalytische Tests in der Leberfunktionsdiagnostik. *Zeitschr. Gastroenterol.* 1978;3:188-197
 27. Chalasani N., Roman J., Jurado R.L. Systemic inflammatory response syndrome caused by chronic salicylate intoxication. *South Med J.* 1996;89(5):479-82
 28. Chen T., Zamora R., Zuckerbraun B., Billiar T.R. Role of nitric oxide in liver injury. *Curr Mol Med.* 2003;3(6):519-26
 29. Cobb J.P., Hotchkiss R.S., Swanson P.E., Chang K., Qiu Y., Laubach V.E., Karl I.E., Buchman T.G. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene deficiency increases the mortality of sepsis in mice. *Surgery.* 1999;126(2):438-42.
 30. Cronin L., Cook D.J., Carlet J., Heyland D.K., King D., Lansang M.A., Fisher C.J. Jr. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med.* 1995;23(8):1430-9
 31. Cunha F.Q., Assreuy J., Moss D.W., Rees D., Leal L.M.C., Moncada S., Carrier M., O'Donnel C.A., Liew F.Y. Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF- α and Il-1- β . *Immunology* 1994;81:211-215
 32. Dal Nogare A.R. Septic shock. *Am J Med Sci.* 1991;302(1):50-65
 33. Davies M.G., Hagen P.O. Systemic inflammatory response syndrome. *Brit J Surg* 1997;84:920-935
 34. Dehring D.J., Crocker S.H., Wismar B.L., Steinberg S.M., Lowery B.D., Cloutier C.T., Comparison of live bacteria infusions in a porcine model of acute respiratory failure. *J Surg Res* 1983;34:151-158
 35. van Dervort A.L., Yan L., Madara P.J., Cobb J.P., Wesley R.a., Corivea C.C., Tropea M.M., Danner R.L. Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF- α production by human neutrophils. *Journal of Immunology* 1994;152:4102-9
 36. Dhainaut J.F., Marin N., Mignon A., Vinsonneau C. Hepatic response to sepsis: interaction between coagulation and inflammatory processes. *Crit Care Med.* 2001 Jul;29(7 Suppl):S42-7.
 37. Dinarello Ch.A. Role of pro- and anti-inflammatory cytokines during inflammation: experimental and clinical findings. *J Biol Regul Homeost Agents* 1997;11:91-103
 38. Dinarello Ch.A. Proinflammatory Cytokines. *Chest* 2000;118:503-508
 39. Donato M.T., Guillen M.I., Jover R., Castell J.V., Gomez-Lechon M.J. Nitric oxide-mediated inhibition of Cytochrome P450 by Interferon- γ in human hepatocytes. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 1997;281: 484-490
 40. Ebong S., Call C., Nemzek J., Bolgos G., Newcomb D., Remick D. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun* 1999;67(12):6603-6610
 41. Echtenacher B., Hultner L., Mannel D.N. Cellular and molecular mechanisms of TNF protection in septic peritonitis. *J Inflamm.* 1995-96;47(1-2):85-9

42. Echtenacher B., Urbaschek R., Weigl K., Freudenberg M.A., Mannel D.N. Treatment of experimental sepsis-induced immunoparalysis with TNF. *Immunobiology* 2003;208(4):381-9
43. Echtenacher B., Weigl K., Lehn N., Mannel D.N. Tumor necrosis factor-dependent adhesions as a major protective mechanism early in septic peritonitis in mice. *Infect Immun.* 2001;69(6):3550-5.
44. Eskandari M. K., Bolgos G., Miller C., Nguyen D.T., De Forge L.E., Remick D.G. Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. *J. Immunol.* 1992;148:2724
45. 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* 1992;60:4133-39
46. Fink M.P., Heard S.O., Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 1990;49:186-196
47. Gergel D., Misik V., Riesz P., Cederbaum A. I. Inhibition of rat and human cytochrome P450 2E1 catalytic activity and reactive oxygen radical formation by nitric oxide. *Arch Biochem. Biophys* 1997;15:239-250
48. Gill R.A., Goodman M.W., Golfud G.R., Onstad G.R., Bubrick M.P. Aminopyrine Breath Test predicts surgical risk for patients with liver disease. *Ann Surg* 1983;198:701-704
49. Groeneveld P.H., Kwappenberg K.M., Langermans J.A., Nibbering P.H., Curtis L. Relation between pro- and anti-inflammatory cytokines and the production of nitric oxide (NO) in severe sepsis. *Cytokine* 1997;9(2):138-42
50. Hangen D.H., Bloom R.J., Stevens J.H., O'Hanley P., Ranchod M., Collins J., Raffin T.A. Adult respiratory distress syndrome. A live E. coli septic primate model. *Am J Pathol* 1987;126:396-400
51. Han X., Fink M.P., Uchiyama T., Yang R., Delude R.L. Increased iNOS activity is essential for hepatic epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004;286(1):G126-36
52. Hart D.W., Gore D.C., Rinehart A.J., Asimakis G.K., Chinkes D.L. Sepsis-induced failure of hepatic energy metabolism. *J Surg Res.* 2003 Nov;115(1):139-47
53. Haustein K.-O., Hüller G., Sensing H., The determination of aminopyrin elimination for control of the metabolic capacity of the liver in man. *Europ J Clinic Invest* 1982;12:157-164
54. Haustein K.-O., Schenker E. A simple method for routine determination of the metabolic liver capacity: the aminopyrine breath test. *Int J Clin Pharmacol, Therpy Toxicol.* 1985;23:190-196
55. Heidecke C.-D., Martin W.G., Müller D.F., Beckurts K.T.E., Schneider-Eicke J., Wittekind C., Adolf J., Siewert J.R. Acute liver allograft rejection and liver function: quantitative evaluation using the [¹⁴C]Aminopyrine Breath Test. *Transplant Proceed.* 1993;25 :2640-2641
56. Hensler T., Heidecke C.-D., Hecker H., Heeg K., Bartels H., Zantl N., Wagner H., Siewert J.-R., Holzmann B. Increased susceptibility to postoperative sepsis in patients with impaired monocyte IL-12 production. *J. Immunology* 1998;161:2655-2659
57. Hollenberg S.M., Easington C.R., Osman J., Broussard M., Parrillo J.E. Effects of nitric oxide synthase inhibition on microvascular reactivity in septic mice. *Shock* 1999;12(4):262-7
58. Huber T.S., Gaines G.C., Welborn M.B.^{3rd}, Rosenberg J.J., Seeger J.M., Moldawer L.L., Anticytokine therapies for acute inflammation and the systemic inflammatory response syndrome: IL-10 and ischemia/reperfusion injury as a new paradigm. *Shock* 2000;13:425-434
59. Hwang T.L., Han M.L. The changes of hepatic sinusoidal microcirculation and effects of nitric oxide synthase inhibitor during sepsis. *Hepatology*. 2003;50(49):213-6.
60. Igonin A.A., Armstrong V.W., Shipkova M., Kukes V.G., Oellerich M. The monoethylglycinexylidide (MEGX) test as a marker of hepatic dysfunction in septic patients with pneumonia. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38(11):1125-8.
61. Jarrar D., Chaudry I.H., Wang P. Organ dysfunction following hemorrhage and sepsis: mechanisms and therapeutic approaches (Review). *Int J Mol Med.* 1999;4(6):575-83
62. Javle P., Yates J., Kynaston H.G., Jenkins S.A. Hepatosplanchnic haemodynamics and renal blood flow and function in rats with liver failure. *Gut* 1998;43:272-279
63. Jin H., Yang R., Marsters S.A., Bunting S.A., Wurm F.M., Chamow S.M., Ashkenazi A. Protection against rat endotoxic shock by p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor immunoadhesion: comparison with anti-TNF monoclonal antibody. *J. Infect. Dis.* 1994;170:1323

64. Jones G.R., Lowes J.A. The systemic inflammatory response syndrome as a predictor of bacteraemia and outcome from sepsis. *QJM*. 1996;89(7):515-22
65. Kim P.K., Deutschman C.S. Inflammatory responses and mediators. *Crit Care Trauma Pat*. 2000;80:885-894
66. Kimura S., Yoshioka T., Shibuya M., Sakano T., Tanaka R., Matsuyama S. Indocyanine green elimination rate detects hepatocellular dysfunction early in septic shock and correlates with survival. *Crit Care Med*. 2001;29(6):1159-63
67. Koerner T.J., Adams D.O., Hamilton Th.A. Regulation of Tumor Necrosis Factor (TNF) expression: Interferon- γ enhances the accumulation of mRNA for TNF induced by Lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages. *Cell Immunol* 1987;109: 437-443
68. Kox W.J., Volk T., Kox S.N., Volk H.D. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intens. Care Med*. 2000;26:124
69. Kreymann G., Wolf M. History and definition of sepsis--do we need new terminology? *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 1996;31(1):9-14
70. Kumar A., Creery W.D. The therapeutic potential of interleukin 10 in infection and inflammation. *Arch Immunol Ther Exp* 2000;48:529-538
71. Kumar A., Haery C., Parillo J.E. Myocardial dysfunction in septic shock. *Crit Care Clin* 2000;16(2):251-87
72. Kurtz H.J., Quast J. Effects of continuous intravenous infusion of Escherichia coli endotoxin into swine. *Am J Vet Res* 1982;43:262-268
73. Larsen R. Sepsis, SIRS, MODS, neue Erkenntnisse, ungelöste Fragen (Editorial). *Anaesthesist* 1996;45:311
74. Levy M.M., Fink M.P., Marshall J.C., Abraham E., Angus D., Cook D., Cohen J., Opal S.M., Vincent J.L., Ramsay G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 2003;31(4):1250-6.
75. Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 2001;104:487-501
76. Mannel D.N., Echtenacher B. TNF in the inflammatory response. *Chem Immunol* 2000;74:141-161
77. Marletta M.A. Nitric Oxide Synthase: Aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78:927-930
78. Marshall J.C., Cook D.J., Christou N.V., Bernard G.R., Sprung C.L., Sibbald W.J. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. *Crit. Care Med*. 1995;23:1638
79. Mc Lauchlan G.J., Anderson I.D., Grant I.S., Fearon K.C. Outcome of patients with abdominal sepsis treated in an intensiv care unit. *Brit. J.Surg.*, 1995,82:524
80. Mc Namara M.J., Norton J.A., Nauta R.J., Alexander H.R. Interleukin-1 receptor antibody (IL-1rab) protection and treatment against lethal endotoxemia in mice. *J. Surg. Res*. 1993 ;54 :316
81. Mead P.S., Guo J.P., Lefer A.M., Pierce S., Palladino M., Protective effects of a monoclonal antibody against lipid A in endotoxic shock. *Exp. Clin. Pharmacol*. 1994;16:405
82. Mehta S., Javeshghani D., Datta P., Levy R.D., Magder S. Porcine endotoxemic shock is associated with increased expired nitric oxide. *Crit Care Med* 1999;27(2):385-93
83. Miyazaki M., Sugawara T., Itoh H., Kaiho T., Ando K., Anbiru S., Ohtawa S., Ogata A., Yasuda N., Hayashi S., Gohchi E., Takanishi K., Nagai M., Tgawa A., Ohtsuka M., Nakajima N. Significance of aminopyrine breath test as a parameter of hepatic functional reserve in 40% hepatectomy of rats with CCl₄- induced liver injury. *Res Exp Med* 1995;195:69-75
84. Minamiyama Y., Takemura S., Imaoka S., Funae Y., Tanimoto Y., Inoue M. Irreversible inhibition of Cytochrome P450 by nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut*. 1997;283: 1479-1485
85. Mion J., Queneau P.-E., Rousseau M., Brazier C.-L., Paliard P., Minaire Y. Aminopyrine Breath Test : development of a ¹³C-breath test for quantitative Assessment of liver function in humans. *Hepato-Gastroenterology* 1995;42:931-938
86. Mohler K.M., Torrance D.S., Smith C.A., Goodwin R.G., Stremmler K.E., Fung V.P., Madani H., Widmer M.B. Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists. *J Immunol* 1993;151:1548-1561

87. Müller M., Scierka A., Stiller R.L., Kim J.Y., Cook D.R., Lancaster J.R., Buffington C.W., Watkins W.D. Nitric oxide mediates hepatic cytochrome P450 dysfunction induced by endotoxin. *Anesthesiology* 1996;84(6):1435-1442
88. Müller-Werdan U., Prondzinsky R., Witthaut R., Stache N., Heinroth K., Kuhn C., Schmidt H., Busch I., Werdan K. Das Herz bei Sepsis und MODS. *Wien Klein Wochenschr* 1997 (Suppl 1):3-24
89. Müller-Werdan U., Werdan K. End-organ damage in inflammation and sepsis. *Internist (Berl)*. 2003;44(7):864-71
90. Nathan C., Xie Q. Nitric oxide synthases: roles, tolls, controls. *Cell*, 1994, 78:915-918
91. Nebert D.W., Gonzalez F. J. P450 Genes: structure, evolution and regulation. *Ann. Rev. Biochem.* 1987; 56:945-993
92. Neumann B., Zantl N., Veihelmann A., Emmanuilidis K., Pfeffer K., Heidecke C.-D., Holzmann B. Mechanisms of acute inflammatory lung injury induced by abdominal sepsis. *Int Immunol* 1999;11:217-27
93. Nussler A.K., Heeckt P.F., Stadler J. Metabolismus und Funktion von Nitric oxide in der Leber. *Z Gastroenterol* 1994;32:24-30
94. Onderdonk A.B., Weinstein W.M., Sullivan N.M., Bartlett J.G., Gorbach S.L., Experimental intra-abdominal abscesses in rats: quantitative bacteriology of infected animals. *Infect Immun* 1974;10:1256-1259
95. Opal S.M. Clinical trial design and outcomes in patients with severe sepsis. *Shock*. 2003;20(4):295-302
96. Opal S.M. Severe sepsis and septic shock: defining the clinical problem. *Scand J Infect Dis*. 2003;35(9):529-34
97. Opal S.M. Therapeutic rationale for antithrombin III in sepsis. *Crit Care Med* 2000;28(9 Suppl):S34-7
98. Opal S.M., DePalo V.A. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000;117(4):1162-72
99. Opekun A.R., Klein P.D., Graham D.Y. [¹³C]Aminopyrine Breath Test detects altered liver metabolism caused by low-dose oral contraceptives. *Dig Dis Sci* 1995;40:2417-2422
100. Parker S.J., Watkins P.E. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg* 2001;88:22-30
101. Pauwels S., Geubel A.P., Dive Ch., Beckers CH. Breath ¹⁴CO₂ after intravenous administration of [¹⁴C] Aminopyrine in liver diseases. *Digest. Diseases and Sciences* 1982;27:49-56
102. Pittet D., Rangel-Frausto S., Tarara D., Costigan M., Rempe L., Jebson P., Wenzel R. P., Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: incidence, morbidities and outcomes in surgical ICU patients. *Intens. Care Med.* 1995;21:302
103. van der Poll T., Marchant A., Buurman W.A., German L., Keogh Ch.V., Lazarus D.D., Nguyen L., Goldman M., Moldawer L.L., Lowry S.F. Endogenous Il-10 protects mice from death during septic peritonitis. *Immunology* 1995; 155:5397-5401
104. Puntarulo S., Cederbaum A.I. Inhibition of ferritin-stimulated microsomal production of reactive oxygen intermediates by nitric oxide. *Arch. Biochem Biophys* 1997;340: 19-26
105. Quezado Z.M., Natanson C. Systemic hemodynamic abnormalities and vasopressor therapy in sepsis and septic shock. *Am J Kidney Dis* 1992;20:214-222
106. Rank N., Michel C., Haertel C., Lenhart A., Welte M., Meier-Hellmann A., Spies C. N-acetylcysteine increases liver blood flow and improves liver function in septic shock patients: results of a prospective, randomized, double-blind study. *Crit Care Med* 2000;28(12):3799-807
107. Reinhart K., Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med.* 2001;29(7 Suppl):S121-5
108. Remick D.G., Garg S.J., Newcomb D.E., Wollenberg G., Huie T.K., Bolgos G.L. Exogenous Il-10 fails to decrease the mortality or morbidity of sepsis. *Crit. Care Med.* 1998;26:895
109. Remick D.G., Kunkel S.L. Pathophysiologic alterations induced by tumor necrosis factor. *Int Rev Exp Pathol.* 1993;34 Pt B:7-25
110. Remick D. G., Strieter R.M., Eskandari M.K., Nguyen D.T., Genord M.A., Raiford C. L., Kunkel S. L. Role of Tumor Necrosis Factor- α in Lipopolysaccharide-induced pathologic alterations. *Am J Pathol.* 1990;136:49-60
111. Romeo C., Eaton S., Spitz L., Pierro A. Nitric oxide inhibits neonatal hepatocyte oxidative metabolism. *J Pediatr Surg.* 2000;35(1):44-8

112. Rongione A.J., Kusske A.M., Ashley S.W., Reber H.A., Mc Fadden D.W. Interleukin-10 prevents early cytokine release in severe intraabdominal infection and sepsis. *J. Surgic Research* 1997;70:107-112
113. Rongione A.J., Kusske A.M., Kwan K., Ashley S.W., Reber H.A., Mc Fadden D.W. Interleukin-10 protects against lethality of intra-abdominal infection and sepsis. *J Gastrointest Surg* 2000 ;4 :70-6
114. Scherlis D.A., Cymering C.B., Estrin D.A. Nitric oxide binding to ferric cytochrome P450: a computational study. *Inorg Chem* 2003;39:2352-9
115. Schmidt H.H.H.W., Walter U. NO at work. *Cell* 1994;78:919-925
116. Shedlowsky S.I., Israel B.C., Mc Clain C.J., Hill D.B., Blouin R.A. Endotoxin administration to humans inhibits hepatic P450-mediated drug metabolism. *J Clin Invest* 1994;94(6):2209-14
117. Shi Y., Li H.Q., Shen C.K., Wang J.H., Pan J., Qin S.W., Liu R. Association between protective efficacy of antibodies to tumor necrosis factor and suppression of nitric oxide production in neonatal rats with fatal infection. *Pediatr Res.* 1993;34(3):345-8
118. Steinhäuser M.L., Hogaboam C.M., Lukacs N.W., Strieter R.M., Kunkel S.L. Multiple roles for IL-12 in a model of acute septic peritonitis. *J. Immunology* 1999; 162:5437-5443
119. Stylianou E., Saklatvala J. Interleukin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 1998;30:1075-1079
120. Sundrani R., Easington C.R., Mattoo A., Parrillo J.E., Hollenberg S.M. Nitric oxide synthase inhibition increases venular leukocyte rolling and adhesion in septic rats. *Crit Care Med.* 2000;28(8):2898-903
121. Szabo C., Southan G.J., Thiemermann C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiourea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Dec 20;91(26):12472-6
122. Takemura S., Minamiyama Y., Imaoka S., Funae Y., Hirohashi K., Inoue M., Kinoshita H. Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. *J Hepatol* 1999;30:1035-44
123. Takahide T., Masuhiro T., Akemi I., Eiichi M., Kenji S. Failure of Germinal Center Formation and Impairment of Response to Endotoxin in Tumor Necrosis Factor α -Deficient Mice. *Lab Invest* 1997; 77:647-658.
124. Tiao G., Rafferty J., Ogle C., Fischer E. J., Hasselgren P.-O. Detrimental effect of nitric oxide synthase inhibition during endotoxemia may be caused by high levels of tumor necrosis factor and interleukin-6. *Surgery* 1994; 116:332.8
125. Tu W., Sato S., Zhang Z., Kitade H., Okumura T., Kwon A.H., Kamiyama Y. Hepatocellular dysfunction induced by nitric oxide production in hepatocytes isolated from rats with sepsis. *Shock.* 2003;19(4):373-7 These results demonstrate that enhancement of NO production by IL-1 β stimulation is involved in cellular failure through mitochondrial dysfunction in the liver of septic rats.
126. Veihelmann A., Brill Th., Blobner M., Scheller I., Mayer B., Pröller M. Himpel S., Stadler J. Inhibition of nitric oxide synthesis improves detoxification in inflammatory liver dysfunction in vivo. *Am. J. Physiol.* 1997;273:G530-536
127. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. [No authors listed] *N Engl J Med.* 2000 4;342(18):1301-8
128. Villa P., Sartor G., Angelini M., Sironi M., Conni M., Gnocchi P., Isetta A.M., Grau G., Buurman W., van Tits L.J. Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995;2(5):549-53
129. Walley K.R., Lukacs N.W., Standiford Th.J., Strieter R.M., Kunkel S.L. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 1996;64:4733-4738
130. Wang D., Wei J., Hsu K., Jau J., Lieu M.W., Chao T.J., Chen H.I. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on systemic hypotension, cytokines and inducible nitric oxide synthase expression and lung injury following endotoxin administration in rats. *J Biomed Sci.* 1999;6(1):28-35
131. Wang J.H., Redmond H.P., Wu Q.D., Bochier-Hayes D. Nitric oxide mediates hepatocyte injury. *Gastrointest. Liver Physiol* 1998;38:G1117-1126
132. Warren H.S. Strategies for the treatment of sepsis. *New Engl. J. Med.* 1997;13:952-953
133. Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, Chalupa P, Atherstone A, Penzes I, Kubler A, Knaub S, Keinecke HO, Heinrichs H, Schindel F, Juers M, Bone RC, Opal SM; KyberSept Trial

- Study Group. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2001;286(15):1869-78
134. Wenzel R.P., Pinsky M.R., Ulevitch R.J., Young L. Current understanding of sepsis. *Clin Infect Dis* 1996;22:407-13
135. Wittmann D.H., Schein M., Condon R.E. Management of secondary peritonitis. *Ann Surg* 1996;224:10-18
136. Young LS. Therapy of sepsis. *Clin Microbiol Infect*. 1997;3 Suppl 4:S60
137. Zantl N., Holzmann B., Pfeffer K., Heidecke C.-D. Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP): a novel surgical model for the induction of bacterial peritonitis/sepsis in mice.
138. Zantl N., Uebe A., Neumann B., Wagner H., Siewert J.-R., Holzmann B., Heidecke C.-D., Pfeffer K. Essential role of Gamma Interferon in survival of Colon Ascendens Stent Peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infection and Immunity* 1998;66:2300-2309

9. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

- Abb. 1: Eröffnen der Linea alba
- Abb. 2: Darstellung des Colon ascendens
- Abb. 3: Punktion des Colon mit Stent
- Abb. 4: Fixierter, mit Fäces gefüllter Stent
- Abb. 5: Naht von Peritoneum, Muskulatur und Faszien
- Abb. 6: Hautnaht
- Abb. 7: Versuchsaufbau der ABT-Messung
- Abb. 8: Kollektiv der septischen Patienten
- Abb. 9: Letalitätsverhalten nach CASP
- Abb. 10: Abfall des ABT im septischen Verlauf
- Abb. 11: ABT als prognostischer Indikator
- Abb. 12: Fluorometrie-Ergebnisse der Isoenzyme 1A1, 1A2 und 3A4 von sham- CASP operierten Mäusen und Mäusen 25h post-CASP

Abb. 13: TNF α -Spiegel im septischen Verlauf

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Holzmann der durch sein tatkräftiges Engagement dieses interessante Projekt ermöglichte, mich stets förderte und durch seine fachliche Kompetenz und Hilfsbereitschaft mit wissenschaftlichem Rat unterstützte. Dabei schuf er eine freundliche Atmosphäre für die ich ihm ebenfalls sehr dankbar bin.

Besonders bedanke ich mich auch bei Univ.-Prof. Dr. med. C.-D. Heidecke, der mir stets mit seinem außerordentlichen Fachwissen beratend zur Seite stand.

Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. med. K. Emmanuel, der mich in das gesamte Projekt, von der Planung, über die mikrochirurgischen Arbeitsweisen hinweg, bis hin zur Auswertung der Ergebnisse einwies. Durch seine außergewöhnliche klinische und wissenschaftliche Kompetenz, aber auch durch sein humorvolles und entgegenkommendes Wesen trug er viel zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Ich danke meinen ehemaligen Mitdoktoranden, Hr. Dr. med. M. Entleutner, Hr. Dr. med. K. Gerauer, Hr. Dr. med. S. Maier, Hr. Dr. med. E. Matevossian, Hr. Dr. med. M. Veit und Fr. Dr. med. A. Westerholt für die kollegiale

Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Ganz besonders danke ich Hr. Dr. med. T. Traeger, der mir die OP-Fotos zur Verfügung stellte.

Weiterhin gilt mein Dank der gesamten klinischen Forschergruppe Sepsis. Besonders bedanke ich mich hier bei Fr. S. Himpel und Fr. T. Fleischmann für ihren Einsatz bei der Aufarbeitung der Organe und der Durchführung der Fluorometrie.

Ebenso möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Frau für die stete Unterstützung und Beistand bedanken.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum /-ort: 19.06.1975, Erlangen
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schulbildung:

08/82 - 06/86: Grundschule in Neubiberg
08/86 - 06/95: Gymnasium Ottobrunn
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

11/1995 - 09/1998: Vorklinischer Studienabschnitt an der Universität München
10/1996 - 03/1997: ERASMUS Stipendium in Alicante/ Spanien
11/1998 - 08/2002: Klinischer Studienabschnitt an der Technischen Universität München

Tätigkeiten als AiP/ Assistenzarzt (seit 07/04):

01/03 - 04/03: Chirurgie im Klinikum Rechts der Isar, München
05/03 - 04/04: Chirurgie in der Chirurgischen Klinik Seefeld
04/04 - 08/06: Chirurgie in der Maria-Theresia-Klinik, München
seit 09/06 : Chirurgie im Klinikum Dachau