

**Der Effekt von Insulin auf die hepatische inflammatorische Reaktion bei
Trauma und Sepsis**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV – Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie II
Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Dagmar Klein
aus Bitterfeld
Regensburg 2004

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von April 2001 bis April 2004 an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie des Klinikums der Universität Regensburg.

Die externe Betreuung übernahm Herr PD Dr. med. M. Jeschke. Fakultätsintern wurde die Arbeit von Herrn Prof. Dr. A. Göpferich (Institut für Pharmazie der Universität Regensburg) betreut.

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender	Prof. Dr. Claudia Steinem
	1. Prüfer (Erstgutachten)	Prof. Dr. Achim Göpferich
	2. Prüfer (Zweitgutachten)	PD Dr. med. Marc G. Jeschke
	3. Prüfer	Prof. Dr. Hans-Helmut Kohler

„Nicht von Anfang an haben die Götter den Sterblichen alles enthüllt, sondern mit der Zeit finden sie suchend das Bessere.“

Xenophanes von Kolophon (ca. 580 – 490 v. Chr.)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	6
1.1.	Hypermetabolismus und Katabolie bei kritisch Kranken	6
1.2.	Die Rolle der Leber bei einem Trauma	7
1.3.	Pro- und anti-inflammatorische Zytokine	8
1.4.	Forschungsansätze	9
1.5.	Insulin	11
1.6.	Problemstellung	13
2.	MATERIAL	15
2.1.	Geräte	15
2.2.	Chemikalien und Reagenzien	15
2.3.	Kits	17
2.4.	Antikörper	17
2.4.1.	Primärantikörper	17
2.4.2.	Sekundärantikörper	18
2.5.	Oligonukleotide	18
2.5.1.	Oligonukleotide für humane Sequenzen	18
2.5.2.	Oligonukleotide für Rattensequenzen	19
2.6.	Puffer und Lösungen	21
2.7.	Zellkulturmedien und Zusätze	23
2.8.	Tiere	24
2.9.	Computerprogramme und Datenbanken	24
3.	METHODEN	25
3.1.	Zellkultur	25
3.1.1.	Isolierung primärer humaner Hepatozyten	25
3.1.2.	Aussaat und Kultivierung von primären humanen Hepatozyten	25
3.1.3.	LPS-Stimulierung der Zellen	25
3.1.4.	Insulinbehandlung der Zellen	26
3.1.5.	RNA-Isolierung aus Zellen	26
3.1.6.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	27
3.1.7.	Reverse Transkription der mRNA (cDNA-Synthese)	27
3.1.8.	PCR	28
3.1.9.	Bestimmung der Zytokinkonzentration mittels ELISA	29

3.2.	Tierversuche	29
3.2.1.	Verbrennungsmodell	29
3.2.2.	Sepsismodell	30
3.2.3.	Bestimmung von konstitutiven und Akute-Phase-Proteinen im Serum	31
3.2.4.	Herstellung von Leberhomogenaten	31
3.2.5.	Bestimmung der Zytokinkonzentration mittels ELISA	31
3.2.6.	Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration	31
3.2.7.	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels WesternBlot	32
3.2.8.	RNA-Isolierung aus Lebergewebe	33
3.2.9.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA	33
3.2.10.	Reverse Transkription der mRNA (cDNA-Synthese)	33
3.2.11.	<i>Real Time PCR</i>	33
3.3.	Versuche mit humanem Material	34
3.3.1.	Modell	34
3.3.3.	Bestimmung der Zytokinkonzentrationen mittels ELISA	35
3.4.	Auswertung und Statistik	36
3.5.	Versuchsstrategie	36
3.5.1.	<i>In vitro</i>	36
3.5.2.	<i>In vivo</i>	36
3.5.3.	Studie mit humanem Material	37
4.	ERGEBNISSE	38
4.1.	<i>In vitro</i> Versuche	38
4.1.1.	Dosisfindungsstudie für LPS-Gabe <i>in vitro</i>	38
4.1.2.	Dosisfindungsstudie für Insulingabe <i>in vitro</i>	39
4.1.3.	Bestimmung der mRNA pro-inflammatorischer Zytokine	40
4.1.4.	Bestimmung der mRNA anti-inflammatorischer Zytokine	42
4.2.	<i>In vivo</i> Versuche	43
4.2.1.	<i>In vivo</i> Versuche mit thermaler Verletzung	43
4.2.1.1.	<i>Dosisfindung für Insulinapplikation</i>	43
4.2.1.2.	<i>Bestimmung von serumkonstitutiven und Akute-Phase-Proteinen</i>	43
4.2.1.3.	<i>Bestimmung pro-inflammatorischer Zytokine im Serum</i>	45
4.2.1.4.	<i>Bestimmung der hepatischen mRNA pro-inflammatorischer Zytokine</i>	48
4.2.1.5.	<i>Bestimmung hepatischer pro-inflammatorischer Zytokine</i>	50
4.2.1.6.	<i>Bestimmung der hepatischen mRNA pro-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktoren</i>	51
4.2.1.7.	<i>Bestimmung anti-inflammatorischer Zytokine im Serum</i>	53
4.2.1.8.	<i>Bestimmung der hepatischen mRNA anti-inflammatorischer Zytokine</i>	55
4.2.1.9.	<i>Bestimmung hepatischer anti-inflammatorischer Zytokine</i>	57
4.2.1.10.	<i>Bestimmung der hepatischen mRNA anti-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktoren</i>	59
4.2.1.11.	<i>Bestimmung von Apoptosemarkern mittels WesternBlot</i>	60
4.2.2.	<i>In vivo</i> Versuche mit LPS-Gabe	62
4.2.2.1.	<i>Bestimmung serumkonstitutiver und Akute-Phase-Proteine</i>	62
4.2.2.2.	<i>Bestimmung pro-inflammatorischer Zytokine im Serum</i>	64
4.2.2.3.	<i>Bestimmung der hepatischen mRNA pro-inflammatorischer Zytokine</i>	67
4.2.2.4.	<i>Bestimmung hepatischer pro-inflammatorischer Zytokine</i>	69
4.2.2.5.	<i>Bestimmung der hepatischen mRNA pro-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktoren</i>	72

4.2.2.6.	<i>Bestimmung anti-inflammatorischer Zytokine im Serum</i>	74
4.2.2.7.	<i>Bestimmung der hepatischen mRNA anti-inflammatorischer Zytokine</i>	75
4.2.2.8.	<i>Bestimmung hepatischer anti-inflammatorischer Zytokine</i>	76
4.2.2.9.	<i>Bestimmung der hepatischen mRNA anti-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktoren</i>	78
4.2.2.10.	<i>Bestimmung von Apoptosemarkern mittels WesternBlot</i>	79
4.3.	Versuche mit humanem Serum	81
4.3.1.	Patientendaten	81
4.3.2.	Bestimmung Akute-Phase-Proteine	83
4.3.3.	Bestimmung pro-inflammatorischer Zytokine im Serum	83
4.3.4.	Bestimmung anti-inflammatorischer Zytokine im Serum	85
5.	DISKUSSION	87
6.	ZUSAMMENFASSUNG	95
7.	LITERATURVERZEICHNIS	97
8.	PUBLIKATIONEN	102
8.1.	Journale und Zeitschriften	102
8.2.	Poster und Vorträge	103
9.	DANKSAGUNG	105

Abkürzungen

Abb	Abbildung
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bp	Basenpaar
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-diamylammonio]-1-propanesulfonate
C/EBP	<i>CCAAT-enhancer binding protein</i>
CRP	C-reaktives Protein
DEPC	<i>diethyl pyrocarbonate</i>
dl	Deziliter
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>dimethyl sulfoxide</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
EBSS	<i>Earle's balanced salt solution</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Fötale Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
for	<i>forward</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HCl	Salzsäure
HEPES	Hydroxyethyl-Piperazin-Ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
I.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin
IL	Interleukin
kcal	Kilokalorien
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kont	kontinuierlich

Abkürzungen

LC	Light Cycler
M	molar (mol/l)
Mg	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
min	Minute
Mio	Million
MOPS	<i>3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid</i>
MOV	Multiorganversagen
n	Anzahl
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
pg	Pikogramm
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T-cell-expressed and secreted</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transkription</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor
Trizma	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
Tween 20	<i>polyoxyethylenesorbitan monolaurate</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>

1. Einleitung

1.1. Hypermetabolismus und Katabolie bei kritisch Kranken

Trauma oder Schock sind heute immer noch ein grosses intensivmedizinisches Problem. Die Mehrheit der Patienten auf Intensivstationen erfüllen Kriterien der systemischen Entzündungsreaktion. Diese wird häufig durch nicht-infektiöse Ursachen, wie Trauma oder Verbrennung hervorgerufen [1]. In einer Kohorten-Studie haben 26% der 2527 Patienten mit systemischer Entzündungsreaktion eine Sepsis entwickelt [2]. Prinzipiell hat die Sepsisinzidenz in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich zugenommen. In Europa sterben jährlich 150 000 Patienten an einer schweren Sepsis [3]. Das lässt sich darauf zurückführen, dass häufiger Operationen und invasivere Eingriffe an älteren Patienten mit schwereren Grunderkrankungen durchgeführt werden. Ausserdem nimmt die Anzahl immunsupprimierter Patienten, die natürlich infektionsgefährdeter sind, zu [1].

Charakteristisch für kritisch Kranke sind Hypermetabolismus und Katabolismus verbunden mit einem Proteinverlust und einer negativen Stickstoffbalance [4]. Dieser Hypermetabolismus beeinträchtigt Struktur und Funktion lebenswichtiger Organe wie Leber, Haut, periphere Muskulatur oder das Immunsystem [5]. Der Hypermetabolismus kann indirekt zur Ausbildung einer Infektion und dann zu einem septischen Krankheitsbild führen. Sepsis ist eine besonders schwerwiegende Erkrankung, bei der der Körper auf eine massive Infektion reagieren muss. Es werden zwar multiple symptomatische Therapieansätze in der Praxis eingesetzt, allerdings haben sie häufig nicht den gewünschten Erfolg, eine Verhinderung des septischen Organversagens. Die Sepsis ist heute immer noch eine Erkrankung mit hoher Letalität. Die Mortalität der Sepsis hat sich während der letzten 25 Jahre trotz lebenserhaltender Massnahmen nicht wesentlich verbessert [1].

Eine wichtige Rolle spielt dabei die Ausprägung des Uni- oder Multiorganversagens. Wenn nur ein Organ betroffen ist, beträgt die Letalität 20 – 40 %, bei zwei Organen schon 60 – 80 % und bei 3 und mehr Organen nahezu 100 %. Das septische Krankheitsbild wird von einer hypermetabolischen Kaskade begleitet. Diese ist durch ein erhöhtes Herz-Zeit-Volumen, erhöhtem Sauerstoffverbrauch, beeinträchtigt Immunsystem und eine gesteigerte Protein- und Fettkatabolie gekennzeichnet. In

mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass dabei die Darm-Leber-Achse eine zentrale Rolle spielt [6].

1.2. Die Rolle der Leber bei einem Trauma

Unter physiologischen Bedingungen produziert die Leber hauptsächlich konstitutive Proteine, wie Prä-albumin, Albumin, Retinol-bindendes Protein und Transferrin [7-10]. Nach einem Trauma bzw. einer Sepsis werden hauptsächlich die sogenannten Akute-Phase-Proteine produziert. Konstitutive hepatische Proteine werden hingegen kaum noch synthetisiert und können sogar bis zu 70 % vermindert sein [7, 8, 11]. Da diese Proteine eine physiologische Funktion besitzen, wird ihre Abnahme als potentiell schädlich angesehen [8, 11-13]. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Albumin- und Transferrinspiegel im Serum die Syntheseleistung der Leber sowie die Intensität des Traumas und Stressses widerspiegeln und so als Marker für Morbidität und Mortalität herangezogen werden können [12, 14]. Eine Hauptaufgabe der Akute-Phase-Reaktion sind die Wiederherstellung der Homöostase und die Regeneration. Allerdings wurde in mehreren Studien gezeigt, dass eine vermehrte und verlängerte Expression von Akute-Phase-Proteinen den Hypermetabolismus verstärkt und somit das Risiko der Katabolie und der Organfunktion erhöht, [15, 16]. In ersten experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Verbrennungsverletzung von ca. 40 % der Körperoberfläche zu einer morphologischen und funktionellen Änderung der Leber führt [17]. Nach einem thermalen Trauma sind konstitutive hepatische Proteine vermindert und Akute-Phase-Proteine erhöht. So konnte auch gezeigt werden, dass die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF oder IL-6 vermehrt war und somit die Katabolie und den Substratverlust der Leber verstärken. Die gesteigerte Expression pro-inflammatorischer Zytokine führt zu einer Hepatozytenschädigung. Unmittelbar nach einem Trauma kommt es zu einer drastischen Erhöhung bestimmter Leberenzyme, wie Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) oder Glutamat-Dehydrogenase (GLDH). Ausserdem kann schon 24 h nach einer thermalen Verletzung eine gesteigerte Apoptose von Hepatozyten nachgewiesen werden [17]. Die genauen Mechanismen, wodurch nach einem Verbrennungstrauma die hepatische Apoptose bzw. die Leberschädigung

induziert werden, sind noch nicht ausreichend bekannt. Man nimmt an, dass der Blutfluss unmittelbar nach einem Trauma zur Leber vermindert ist. Ausserdem sind pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF auch pro-apoptotische Signale, die bereits kurze Zeit nach dem Trauma erhöht sind [18, 19]. Die Zunahme im Fettgehalt der Leber ist ein häufiges Problem nach einem Verbrennungstrauma, welches aber meist im Stadium der Rehabilitation reversibel sein kann. Es konnte experimentell nachgewiesen werden, dass es zur Ausbildung einer Leberverfettung kommt, die aus einer gesteigerten peripheren Lipolyse mit einer gleichzeitig einhergehenden Verminderung der Transportfähigkeit für Fette resultiert [17, 20].

1.3. Pro- und anti-inflammatorische Zytokine

Mediatoren der Hypermetabolie und auch der hepatischen Akute-Phase-Reaktion sind pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, MIF und TNF, die von Kupfferschen Sternzellen und anderen Zelltypen sezerniert werden. Diese pro-inflammatorischen Zytokine verstärken den Proteinverlust und steuern die Synthese von Akute-Phase-Proteinen [13]. Nach einem massiven Trauma, einer Operation oder während einer Sepsis sind diese pro-inflammatorischen Zytokine erhöht, um eine Regeneration zu initiieren. Allerdings gilt für diese Zytokine wie für die Akute-Phase-Proteine, dass eine überschüssende Freisetzung dieser Proteine mit einer erhöhten Inzidenz für MOV, Hypermetabolismus, Sepsis und sogar Letalität einhergeht [15, 16, 21].

Gegenspieler der pro-inflammatorischen Zytokine sind anti-inflammatorische Zytokine wie IL-2, IL-4, IL-10 und IFN- γ [22]. Diese Zytokine wirken einer überschüssenden Produktion von inflammatorischen Mediatoren entgegen, um so ein Gleichgewicht zu halten. Dieses Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen ist, wie von mehreren klinischen Studien gezeigt, von äusserst wichtiger Bedeutung [9, 23].

Die Expression von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen werden über verschiedene Signaltranskriptionsfaktoren gesteuert. Für die Leber und die hepatische Akute-Phase-Reaktion spielen mehrere Signaltranskriptionsfaktoren eine besondere Rolle. Die pro-inflammatorischen Zytokine werden über C/EBP- β , STAT-3

und STAT-5 reguliert, die anti-inflammatorischen Zytokine über RANTES, SOCS-1, -2 und -3 [24-26]

1.4. Forschungsansätze

Ein Ziel der Forschung ist die Hemmung der pro-inflammatorischen Kaskade und die Wiederherstellung des Gleichgewichts zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen. Desweiteren soll auch das Gleichgewicht zwischen Akute-Phase-Proteinen und konstitutiven hepatischen Proteinen eingestellt werden. *In vitro*, das heisst in der Zellkultur, ergaben sich erfolgreiche Ansätze mit Antikörpern gegen TNF [27] und IL-1 β [28] oder deren Rezeptoren. Andere Studien starteten mit anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 [22, 28]. In der Klinik eingesetzt zeigte sich allerdings, dass diese experimentellen Ansätze nicht auf den Menschen übertragen werden konnten. Auch andere *in vitro* Versuche mit viel versprechenden Ansätzen, wie z.B. Therapie mit Immunostimulantien (*granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF)) oder anti-inflammatorischen Agentien (Prostaglandinsynthesehemmer) blieben in der Klinik relativ erfolglos [6].

Verschiedene Arbeitsgruppen haben über die letzten Jahre einen anderen Ansatz verfolgt. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine Therapie mit anabolen Wachstumsfaktoren die Hypermetabolie und Katabolie vermindern könnte. Eine verminderte Katabolie bedeutet Erhaltung der Organstruktur und -funktion und könnte somit eine Präventivmassnahme gegen die Entwicklung von Infektion und Sepsis sein. Für diesen Therapieansatz wurden anabole Wachstumsfaktoren gewählt, weil die negative Stickstoffbilanz bei kritisch kranken Patienten mit einer Wachstumshormonresistenz, einer verminderten Produktion von Wachstumshormon (GH) sowie *insulin-like growth factor* I (IGF-I) und einer Postrezeptor-Insulinresistenz assoziiert wurde [29]. Aus diesem Grund wurden klinisch schwerstkranken Patienten anabole Wachstumshormone verabreicht, um die Katabolie zu verbessern. Tatsächlich konnte die Überlebensrate hypermetabolischer Patienten durch Gabe von rekombinantem Wachstumshormon (*recombinant human growth hormone* (rhGH)) verbessert werden. Nach diesen anfänglich positiven Ergebnissen wurden eine europaweite Multizenterstudie in Intensivstationen durchgeführt, bei der der Effekt von rhGH auf schwerste Erkrankungen untersucht werden sollte [5]. Dabei

zeigte sich aber, dass die Gabe von rhGH bei kritisch Kranken die Mortalität erhöht. Die genaue Ursache der erhöhten Letalität ist derzeit Gegenstand zahlreicher experimenteller Untersuchungen. Es existieren mehrere Hypothesen, die sich alle mit der durch rhGH induzierte Hyperglykämie befassen. Es wurde nachgewiesen, dass rhGH den Blutzuckerspiegel auf supraphysiologische Werte erhöht. Hyperglykämie verschlechtert die Wundheilung und erhöht stark die Inzidenz einer Sepsis [30]. In klinischen Studien konnte zwar durch die Gabe von rhGH eine Verbesserung der konstitutiven hepatischen Proteinsynthese sowie eine Verminderung von Akute-Phase-Proteinen und pro-inflammatorischer Zytokine festgestellt werden. Allerdings fand man dabei auch eine Erhöhung von Serum- und Leberfetten [31]. Aus diesem Grund wurde dann ein anderer anaboler Wachstumsfaktor, IGF-I, getestet, der eventuell anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt, aber nicht zur Lipolyse führt. So wurde die Wirkung von IGF-I auf die hepatische Akute-Phase-Reaktion erst im Tiermodell und später am Menschen untersucht [11, 32]. Dabei stellte sich heraus, dass IGF-I in Dosen, die einen positiven Effekt auf Wundheilung, Darmmukosa und Muskulatur hatten, grosse Nebenwirkungen aufwies. Da IGF-BP-3 85 – 90 % des IGF-I transportiert und wahrscheinlich auch eine intravaskuläre Speicherfunktion für IGF-I hat [33], wurde in einem weiteren Schritt der Komplex von IGF-BP-3 mit IGF-I getestet. In ersten Studien zeigte sich, dass IGF-I/BP-3 in therapeutisch wirksamen Dosen keine Nebenwirkungen hat [11]. Im Tiermodell konnte die Verbesserung der Lebermorphologie durch die Gabe von IGF-I/BP-3 nachgewiesen werden. Es wurde weiterhin beobachtet, dass IGF-I/BP-3 die Ödembildung in der Leber und die hepatische Fettkonzentration vermindert, die hepatische Proteinkonzentration erhöht und zusätzlich auch die Apoptose in der Leber verringert. Es wurde dann eine klinische Studie an Kindern mit einem Verbrennungstrauma durchgeführt. Deren Ergebnisse zeigten, dass IGF-I/BP-3 teilweise zur Verminderung der pro-inflammatorischen Kaskade führt [32].

Da IGF-I eine fast 50 %-ige Homologie in der Aminosäuresequenz zu Insulin aufweist, stellte sich die Frage, ob Insulin ein mögliches Therapeutikum nach einem Trauma wäre. Eine Insulintherapie hätte viele Vorteile, Insulin ist leicht verfügbar, gut applizierbar, kostengünstig, einfach in grosser Menge herzustellen und wird seit vielen Jahren bei Diabetes melitius eingesetzt.

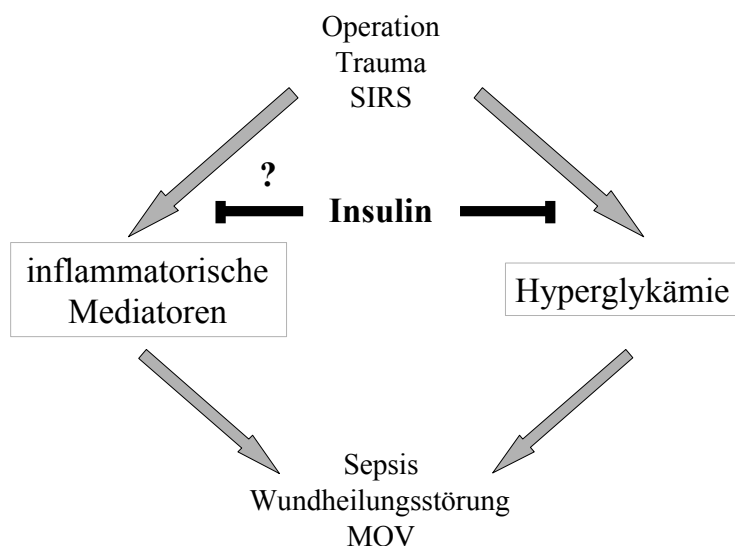


Abb. 1: Forschungsansatz mit Insulin

Nach Operation oder Trauma kommt es zu Hyperglykämie sowie zur Veränderung inflammatorischer Mediatoren. Dies wiederum führt zur vermehrten Inzidenz von Sepsis, Wundheilungsstörung und Multiorganversagen. Bekannt ist bereits, dass Insulin einer Hyperglykämie entgegenwirkt. In dieser Arbeit soll die Frage geklärt werden, ob Insulin Einfluss auf die inflammatorischen Mediatoren hat, um Sepsis, Hypermetabolismus und Multiorganversagen vorzubeugen.

1.5. Insulin

Insulin ist ein Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 5800 und setzt sich aus zwei Peptidketten zusammen. Die A-Kette besteht aus 21 Aminosäuren und die B-Kette aus 30 Aminosäuren. Beide Ketten sind über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Im Körper wird zunächst von den B-Zellen der Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse das so genannte Proinsulin produziert. Proinsulin ist eine Vorstufe des Insulins und enthält zusätzlich zur A- und B-Kette noch eine dritte Aminosäurekette, das so genannte C-Peptid. Das C-Peptid ist für die Strukturbildung des Insulins und für die Ausbildung der Disulfidbrücken verantwortlich. Vor der Sekretion in die Blutbahn wird das C-Peptid abgespalten. Die Bauchspeicheldrüse

1. Einleitung

enthält insgesamt etwa 80 I.E. Insulin, von denen täglich etwa die Hälfte sezerniert werden. Insulin ist ein lebenswichtiges, wachstumförderndes und anaboles Hormon. Es verbessert die Aufnahme von Glukose und Aminosäuren in die Zellen der meisten Gewebe. Insulin steigert den oxidativen Glukoseabbau und erhöht die Glykogenbildung in der Leber sowie den Muskeln und verhindert ausserdem den Glykogenabbau. Durch Insulin wird die Bildung von Fetten aus Glukose stimuliert und die Umwandlung von Proteinen zu Glukose gehemmt [34]. Insulin fördert den Transport von Glukose zu allen Zellen des Körpers und hat zusätzlich einen wachstumsfördernden Effekt. Ausserdem fördert Insulin die Bildung von Proteinen, indem es die Aufnahme von Aminosäuren in die Zellen unterstützt.

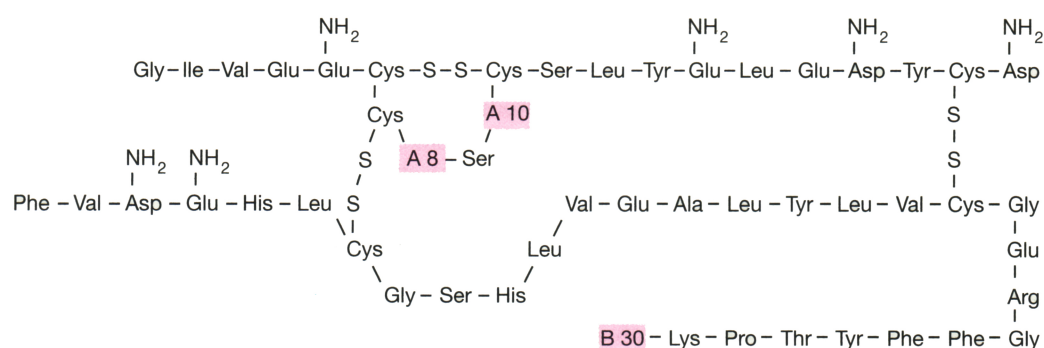


Abb. 2: Aminosäuresequenz von Human-, Schweine-, Rinderinsulin (Mensch: A8 = Thr, A10 = Ile, B30 = Thr; Schwein: A8 = Thr, A10 = Ile, B30 = Ala; Rind: A8 = Ala, A10 = Val, B30 = Ala) [34]

In der Akuten Phase, die unmittelbar nach einem schweren Trauma eintritt, werden alle Stoffwechselfvorgänge so umgestellt, dass schnell verfügbare Energieträger bereitgestellt werden. Diese Energieträger sind vor allem Glukose und freie Fettsäuren (FFS). Glukose wird durch den Abbau der Speicher-Kohlenhydrate über die Glykogenolyse, als auch durch den Aufbau aus Aminosäuren über die Glukoneogenese gewonnen. Die Aminosäuren stammen aus dem Abbau von Muskelproteinen. Die Stickstoffbilanz wird negativ. Aus dem Aminosäurepool des Plasmas entnimmt die Leber Aminosäuren sowohl zur Glukoneogenese, als auch zur Bildung von Funktionsproteinen. In der Klinik zeigt sich, dass kritisch kranke Patienten einen erhöhten Blutglukosewert aufwiesen [29]. Insulin, als wichtigstes „anaboles Hormon“, wird vom Körper nicht adäquat den erhöhten Blutglukosewerten ins Plasma ausgeschüttet. Man spricht von „ausbleibender Insulin-Antwort“ oder von

„Insulin-Unterdrückung“ [23]. Von aussen zugeführte Nährstoffe können in dieser Phase nur verstoffwechselt werden, wenn gleichzeitig Insulin zugeführt wird.

Diese und andere Erkenntnisse haben die Gruppe um van den Berghe dazu veranlasst, den Effekt von Insulin auf das Überleben kritisch kranker Patienten in der chirurgischen Intensivstation zu untersuchen [35]. In die Studie wurden insgesamt 1548 Patienten eingeschlossen. Ein Teil der Patienten erhielt eine konventionelle Insulintherapie, bei der der Blutzuckerspiegel auf einen Wert von 180 – 200 mg/dl eingestellt wurde. Bei dem anderen Teil der Patienten wurde eine intensivierete Insulintherapie durchgeführt, mit dem Ziel den Blutzuckergehalt auf einen Wert von 80 – 110 mg/dl einzustellen. Die intensivierete Insulintherapie mit einem Blutzuckergehalt von 80 – 110 mg/dl führte zu einem Anstieg der Überlebensrate.

1.6. Problemstellung

In dieser Arbeit sollte der Effekt von Insulin auf die systemische Inflammation nach einem Trauma untersucht werden. Dafür musste als erstes ein geeignetes *in vitro* Modell in Zellkultur gefunden werden. Für dieses Zellkultursystem mussten die entsprechenden Stimulationsbedingungen bestimmt und die dazugehörige Insulindosis etabliert werden. An diesem Modell sollte dann der Effekt von Insulin auf die Expression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine untersucht werden, wobei ein besonderes Augenmerk auf der transkriptionellen Regulation, also der mRNA, dieser Zytokine lag.

In einem zweiten Schritt dieser Arbeit sollte an einem bereits etablierten *in vivo* Modell, dem Verbrennungstrauma in Ratten, Untersuchungen über den Effekt von Insulin auf Lebermorphologie, konstitutive hepatische und Akute-Phase-Proteine, pro- und anti-inflammatorische Zytokine sowie deren Signaltranskriptionsfaktoren durchgeführt.

In einem nächsten Schritt sollte ein zweites *in vivo* Modell für die Induzierung eines Traumas gefunden werden. Da Sepsis eine grosse Rolle nach einem Trauma spielt, sollte in diesem Modell eine Sepsis induziert werden. Dazu musste die entsprechende Dosisfindung für eine LPS-Applikation sowie die dazugehörige Insulinkonzentration experimentell ermittelt werden. An diesem zweiten Modell für ein Trauma sollte ebenfalls der Effekt von Insulin auf Lebermorphologie, konstitutive

hepatische und Akute-Phase-Proteine, pro- und anti-inflammatorische Zytokine sowie deren Signaltranskriptionsfaktoren untersucht werden.

In einem letzten Schritt dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Insulinbehandlung nach einem thermalen Trauma in Kindern untersucht. Auch hier standen die Lebermorphologie, die Veränderung konstitutive hepatische und Akute-Phase-Proteine, pro- und anti-inflammatorische Zytokine nach einer Insulinbehandlung im Vordergrund.

2. Material

2.1. Geräte

Analysenwaage <i>LC210</i>	Labor Center, Nürnberg
Brutschrank <i>BB6220</i>	Heraeus/Kendro, Hanau
Heizblock <i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge <i>Megafuge 1.0R</i> (Ausschwingrotor 2704)	Heraeus/Kendro, Hanau
LightCycler II	Roche, Mannheim
Mikrowelle <i>Privileg 7533P</i>	Privileg, Fürth
Netzgerät <i>Power Pac 300</i>	BioRad, München
pH-Meter <i>pH525</i>	WTW, Augsburg
Reinwasseranlage <i>Milli-Q Water System</i>	Millipore, Eschborn
Röntgenfilm-Entwickler <i>M35 X-Omat</i>	Eastman KODAK Company, Rochester (USA)
Stickstoff-Tank <i>Chronos Biosafe</i>	Messer-Griesheim, Düsseldorf
Tischzentrifuge <i>Centrifuge 5415 D</i>	Eppendorf, Hamburg
Tisch-Kühlzentrifuge <i>EBA 12R</i>	Hettich, Tuttlingen
Ultraschall-Gerät <i>HD 2070</i>	Bandelin Electronic, Berlin
Ultraturrax <i>T25</i>	IKA-Labortechnik, Staufen
Western-Blot-Apparatur <i>XCell Sure Lock</i>	Invitrogen, Karlsruhe

2.2. Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid-Mix 30 % (37,5:1)	Sigma, St. Louis (USA)
Agarose	Roche, Mannheim
Ammoniumperoxodisulfat	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CHAPS	Sigma, St. Louis (USA)
Chloroform	Merck, Darmstadt
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Complete Mini (protease inhibitor tablets)	Roche, Mannheim

2. Material

DEPC	Sigma, St. Louis (USA)
DMEM	BioWhittaker, Verviers (Belgien)
DMEM	Sigma, St. Louis (USA)
DMSO	Sigma, St. Louis (USA)
EBSS	Sigma, St. Louis (USA)
EDTA	Sigma, St. Louis (USA)
Ethanol	J.T.Baker, Deventer (Niederlande)
Glucagon	Novo Nordisk, Mainz
Glycerin	Sigma, St. Louis (USA)
Glycin	Merck, Darmstadt
HEPES	Invitrogen, Karlsruhe
Hydrocortison	Pharmacia & Upjohn, Erlangen
Insulin, H- (40 I.E./ml)	Aventis, Frankfurt (Main)
Insuman Rapid (100 I.E./ml)	Aventis, Frankfurt (Main)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma, St. Louis (USA)
Magermilchpulver "Naturaflor"	Töpfer, Dietmannsried
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS	Sigma, St. Louis (USA)
Narcoren (Pentobarbital-Natrium)	Merial, Hallbergmoos
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Merck, Darmstadt
PBS	BioWhittaker, Verviers (Belgien)
Penicillin	Biochrom AG, Berlin
Percoll	Amersham Biosciences, Upsala (Schweden)
Ringerlösung <i>DAB 7 Braun</i>	Braun, Melsungen
SDS	Merck, Darmstadt
Sodium Bicarbonat	Sigma, St. Louis (USA)

2. Material

Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
Succrose	Sigma, St. Louis (USA)
TEMED	Sigma, St. Louis (USA)
Temgesic (Buprenorphinhydrochlorid)	Essex Pharma, München
Tris Base	Merck, Darmstadt
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan	Merck, Darmstadt
Trizma-Hydrochlorid	Sigma, St. Louis (USA)
Trizol Reagent	Sigma, St. Louis (USA)
Tween 20	Sigma, St. Louis (USA)

2.3. Kits

BCA-Kit	Pierce, München
ECL Western blotting detection reagents	Amersham pharmacia, Freiburg
In Situ Cell Death Detection Kit, POD	Roche, Mannheim
LC Fast Start DNA Master SYBR Green I	Roche, Mannheim
Mini Elute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Super Script First-Strand Synthesis (for RT-PCR)	Invitrogen, Karlsruhe
human IL-6 ELISA (<i>in vitro</i>)	Bender MedSystems, Wien (Österreich)
Quantikine M rat (IL-6, IL-10, IL-4, IL-1 β , TNF)	R&D Systems, Minneapolis (USA)
ELISA für TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 (human)	Endogen, Woburn (USA)

2.4. Antikörper

2.4.1. Primärantikörper

Tabelle 1: Primärantikörper für WesternBlot

Antigen	Herkunft		Firma
Caspase-3 (H-277)	Kaninchen	polyclonal	Santa Cruz, Heidelberg

2. Material

Fortsetzung Tabelle 1

Antigen	Herkunft		Firma
Caspase-9 p35 (H-170)	Kaninchen	polyclonal	Santa Cruz, Heidelberg
BCL2 (C-2)	Maus	monoclonal	Santa Cruz, Heidelberg
Aktin (C-11)	Ziege	polyclonal	Santa Cruz, Heidelberg

2.4.2. Sekundärantikörper

Ziege anti-Kaninchen IgG HRP	Santa Cruz, Heidelberg
Ziege anti-Maus IgG HRP	Santa Cruz, Heidelberg
Affe anti-Ziege IgG HRP	Santa Cruz, Heidelberg

2.5. Oligonukleotide

Die Primer für die *Real Time PCR* wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Hilfe des Programmes DNASTar Lasergene ermittelt und bei TIB MOLBIOL (Berlin) bestellt.

2.5.1. Oligonukleotide für humane Sequenzen

In Tabelle 2 sind die Sequenzen der humanen Vorwärtsprimer (for) und der dazugehörigen Rückwärtsprimer (rev) sowie alle für die PCR benötigten Daten aufgeführt.

2. Material

Tabelle 2: Oligonukleotide für humane Sequenzen

	Sequenz 5' – 3'	Produkt- länge	Mg- Konzentration	Annealing- temperatur
β-Aktin	for AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC rev CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT	138 bp	3 mM	62°C
GAPDH	for GCG GGG CTC TCC AGA ACA TCA T rev CCA GCC CCA GCG TCA AAG GTG	301 bp	3 mM	64°C
IL-1β	for CAG GCC GCG TCA GTT GTT GT rev CCG GAG CGT GCA GTT CAG TG	195 bp	3 mM	60°C
TNF-α	for CGC CAC CAC GCT CTT CTG C rev ACG GCG ATG CGG CTG ATG	354 bp	2 mM	64°C
IL-6	for CCC AGT ACC CCC AGG AGA AGA rev GTT GGG TCA GGG GTG GTT ATT G	426 bp	3 mM	60°C
IL-10	for GAC CCA GCC CCT TGA GAA ACC T rev GCC CCA AGC CCA GAG ACA AGA T	359 bp	3 mM	64°C
MIF	for CGC AGA ACC GCT CCT ACA G rev CCG TTT ATT TCT CCC CAC CAG	243 bp	3 mM	60°C
IFN-γ	for GGG TTC TCT TGG CTG TTA CT rev TTG GCT CTG CAT TAT TTT TC	166 bp	3 mM	58°C

2.5.2. Oligonukleotide für Rattensequenzen

In Tabelle 3 sind die Sequenzen der Rattenvorwärtsprimer (for) und der dazugehörigen Rückwärtsprimer (rev) sowie alle für die PCR benötigten Daten aufgeführt.

2. Material

Tabelle 3: Oligonukleotide für Rattensequenzen

	Sequenz 5' – 3'	Produkt- länge	Mg- Konzentration	Annealing- temperatur
18S	for TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG rev GGA CAT CTA AGG GCA TCA CA	493 bp	3 mM	60°C
GAPDH [26]	for TGC CTT CTC TTG TGA CAA AGT GG rev CAT TGC TGA CAA TCT TGA GGG AG	385 bp	2 mM	60°C
IL-1 β [36]	for CTT CCT TGT GCA AGT GTC TGA AGC rev AAG AAG GTC CTT GGG TCC TCA TCC	305 bp	2 mM	70°C
TNF- α	for TGC CTC AGC CTC TTC TCA TT rev GCT TGG TGG TTT GCT ACG AC	209 bp	3 mM	60°C
IL-6	for AGC CCA CCA GGA ACG AAA GTC rev TGG AAG TTG GGG TAG GAA GGA	559 bp	3 mM	67°C
IL-10	for GAA CCA CCC GGC GTC TAC rev AGG GAT GAG GGC AAG TGA AA	417 bp	2 mM	65°C
MIF	for CGG CCG TCG TTC GCA GTC TC rev CCG GAA GGT GGC CAT CAT TAC G	470 bp	3 mM	65°C
IFN- γ	for GGC AAA AGG ACG GTA ACA CGA rev CGA CTC CTT TTC CGC TTC CTT	292 bp	3 mM	68°C
IL-2	for CAG CGT GTG TTG GAT TTG AC rev TGA TGC TTT GAC AGA TGG CTA	190 bp	3 mM	60°C
SOCS-3	for AAG ACC TTC AGC TCC AAG AGC rev CTT GAG TAC ACA GTC AAA GCG G	300 bp	3 mM	60°C
STAT-3	for TGG ACC AGA TGC GGA GAA G rev AAT TTG ACC AGC AAC CTG AC	436 bp	3 mM	60°C

2. Material

Fortsetzung Tabelle 3

	Sequenz 5' – 3'	Produkt- länge	Mg- Konzentration	Annealing- temperatur
STAT-5	for TCA TCA TCG AGA AGC AGC C rev TTC CGT CAC AGA CTC TGC AC	317 bp	3 mM	60°C
RANTES	for TGC CTC CCC ATA TGG CTC rev AAC CCA CTT CTT CTC TGG GTT G	178 bp	3 mM	60°C
C/EBP-β	for GAG CGA CGA GTA CAA GA rev CTG CTT GAA GTT CCG	190 bp	3 mM	60°C

2.6. Puffer und Lösungen

Agarosegel-Probenpuffer:

Bromphenolblau	0,04 (w/v)
Glycerin	50 % (v/v)
DEPC-Wasser	50 % (v/v)

10 x Laufpuffer:

Tris	0,5 M
Glycin	1,92 M
SDS	1 % (w/v)
pH 8,6	

Lysepuffer für Gewebehomogenate:

HEPES	100 mM
Succrose	10 %
CHAPS	0,1 %

Auf 10 ml dieser Lösung wurde 1 Tablette Complete Mini gegeben und auf Eis gelöst.

10 x MOPS:

MOPS	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM

2. Material

Sammelgel:	Acrylamid-Mix (37,5:1)	12 % (v/v)
	Tris-Stammlösung 2	125 mM
	SDS	2 % (w/v)
	Ammoniumperoxodisulfat	10 % (v/v)
	TEMED	0,1 % (v/v)
"Strip"-Lösung:	Tris-Base	62,5 mM
	SDS	2 % (w/v)
	pH 6,7	
50 x TAE	Tris	2 M
	Eisessig	1 M
	EDTA	50 mM
TBS:	Tris Base	20 mM
	NaCl	137 mM
	Tween 20	0,1 % (v/v)
	pH 7,6	
Transferpuffer:	Tris	31 mM
	Glycin	250 mM
	Methanol	33,4 % (v/v)
	pH 8,3 – 8,5	
Trenngel 12%:	Acrylamid-Mix (37,5:1)	12 % (v/v)
	Tris-Stammlösung 1	375 mM
	SDS	2 % (w/v)
	Ammoniumperoxodisulfat	10 % (v/v)
	TEMED	0,04 % (v/v)
Tris-HCl:	Tris	10 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	50 mM
	pH 8,0 mit HCl einstellen	

2. Material

Tris-Stammlösung 1:	Tris pH 8,8	1,5 M
---------------------	----------------	-------

Tris-Stammlösung 2:	Tris pH 6,8	1 M
---------------------	----------------	-----

2.7. Zellkulturmedien und Zusätze

Adhärenzmedium:	DMEM	BioWhittaker	
	FCS	Biochrom	10 %
	H-Insulin (40 I.E./ml)	Aventis	0,5 I.E./ml
	Glucagon	Novo Nordisk	7 ng/ml
	Hydrocortison	Pharmacia & Upjohn	7,5 µg/ml
	Penicillin	Biochrom	100 I.E./ml
	Streptomycin	Biochrom	100 µg/ml
	L-Glutamin	Biochrom	1 %

Dauerkultiviermedium:	DMEM	Bio-Whittaker	
	H-Insulin (40 I.E./ml)	Aventis	0,5 I.E./ml
	Glucagon	Novo Nordisk	7 ng/ml
	Hydrocortison	Pharmacia & Upjohn	7,5 µg/ml
	Penicillin	Biochrom	100 I.E./ml
	Streptomycin	Biochrom	100 µg/ml
	L-Glutamin	Biochrom	1 %

10 x DMEM:	DMEM	Sigma	
	NaHCO ₃	Merck	3,7 g/l

2.8. Tiere

Für die Tierversuche wurden männliche Ratten vom Stamm Sprague Dawley mit einem Gewicht von 350 – 375 g der Firma Harlan verwendet (Tierversuchsantrag von Dr. Marc G. Jeschke an die Regierung der Oberpfalz unter AZ 621/2531.1-1601).

2.9. Computerprogramme und Datenbanken

Die Konstruktion von Oligonukleotiden, Sequenzauswertung und Sequenzvergleich wurden mit Hilfe des Programmes DNASTar Lasergene (DNASTAR Inc., Madison, USA) durchgeführt.

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Isolierung primärer humaner Hepatozyten

Die Zellen wurden vom „Zentrum für Leberzellforschung“ (Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Regensburg) aus Leberteilresektaten durch eine EGTA/Kollagenase-Perfusion isoliert und anschliessend fraktioniert gereinigt [37]. Die Experimente wurden nach den Richtlinien der gemeinnützigen und staatlich kontrollierten Stiftung HTCR (*Human Tissue and Cell Research*) mit der Einverständniserklärung der Patienten in Absprache mit der örtlichen Ethikkommission der Klinik der Universität Regensburg durchgeführt [38].

3.1.2. Aussaat und Kultivierung von primären humanen Hepatozyten

Die Aussaat und Kultivierung der frisch isolierten primären Hepatozyten erfolgte in 6-*well*-Zellkulturplatten, die mit je 0,5 ml Kollagen beschichtet waren. Dazu wurde lyophilisiertes Rattenschwanz-Kollagen in vorgekühlter 1 mM Salzsäure gelöst und 1:10 mit 10-fach DMEM auf Eis verdünnt. Die Platten wurden zum Ausgelieren des Kollagens für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurde das Kollagen mit 1 ml Adhärenzmedium für 20 min bei ebenfalls 37°C äquilibriert. Das Äquilibrierungsmedium wurde entfernt und die Hepatozytensuspension in einer Konzentration von 1,5 Mio Zellen/*well* vorsichtig in die *wells* verteilt. Dabei wurde auf eine gleichmässige Zellverteilung geachtet. 24 h nach Aussaat wurde das Medium durch das Dauerkultiviermedium ersetzt.

3.1.3. LPS-Stimulierung der Zellen

Zur Induktion der Akute-Phase-Reaktion wurden die Leberzellen mit LPS stimuliert. Hierzu wurden die Zellen wie oben beschrieben in 6-*well*-Platten ausgesät, für 24 h adhären lassen und für weitere 24 h im Dauerkultiviermedium inkubiert.

3. Methoden

Anschliessend wurden die Leberzellen in FCS-freiem und insulinfreiem Medium für weitere 24 h inkubiert. Das LPS wurde als 20 %-ige Stammlösung im Medium gelöst, auf die entsprechenden Endkonzentrationen mit insulin- und FCS-freiem Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben.

Die optimale LPS-Konzentration wurde in einer Dosisfindungsstudie ermittelt. Hierzu wurden LPS-Konzentrationen von 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml oder 500 µg/ml dem Medium zugesetzt. Die daraus resultierende LPS-Konzentration mit dem grössten Effekt hinsichtlich der Zytokinproduktion wurde in den Hauptversuchen eingesetzt.

3.1.4. Insulinbehandlung der Zellen

Um den Effekt von Insulin bei einer Akute-Phase-Reaktion zu untersuchen, wurden die Primären Hepatozyten wie oben beschrieben mit LPS stimuliert. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde Insulin den eingesetzten Konzentrationen entsprechend direkt in die jeweiligen *wells* zugegeben. Nach einer Inkubation von 4, 8, 12 und 24 h wurden der Zellkulturüberstand für die Zytokinbestimmung mittels ELISA entnommen und die Zellen für die RNA-Isolierung (siehe 3.1.5.) präpariert.

Für die Ermittlung der optimalen Insulinkonzentration wurde eine Dosisfindungsstudie durchgeführt, in der Insulinkonzentrationen von 0,5 I.E./ml, 2,5 I.E./ml, 5 I.E./ml, 10 I.E./ml oder 50 I.E./ml dem Medium zugesetzt wurden. Die Insulinkonzentration mit dem optimalsten Effekt hinsichtlich der Zytokinproduktion wurde in den Hauptversuchen eingesetzt.

3.1.5. RNA-Isolierung aus Zellen

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus den primären Hepatozyten wurde zuerst das Medium vorsichtig abgenommen und sofort 1,5 ml vorgekühltes Trizol direkt auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1 – 2 min auf Eis wurden mit Hilfe eines Zellschabers die noch nicht lysierten Zellen inklusive der Kollagenschicht vom Boden der Zellkulturplatte gelöst. Durch mehrmaliges Aufziehen mittels einer Pipette wurde die Zellsuspension homogenisiert und anschliessend in 2 Eppendorf-Cup's

3. Methoden

gleichmässig verteilt. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro Cup wurde die Suspension für 15 s per Hand gemischt und anschliessend für 3 min bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation für 15 min bei 12000 x g und 4°C wurde vorsichtig die farblose obere Phase mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Cup überführt. Nach einer Zugabe von 500 µl Isopropanol, kurzem Mischen durch Schwenken per Hand und einer Inkubation von 10 min bei RT folgte eine weitere Zentrifugation für 10 min bei 12000 x g und 4°C. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet mit 75 %-igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei 7500 x g und 4°C wurde der Überstand nochmals dekantiert und das Pellet unter der Sterilbank für 15 – 30 min bei RT getrocknet. Je nach Pelletgrösse wurde die RNA in 20 – 100 µl DEPC-Wasser aufgenommen und auf Eis gelöst. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

3.1.6. Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Zur Ermittlung der Konzentration der isolierten Gesamt-RNA wurden die Proben in DEPC-Wasser verdünnt und in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm bei einer Wellenlänge von 260 nm im Spektralphotometer gemessen. Als Referenzprobe wurde DEPC-Wasser verwendet. Die Konzentration der RNA wurde dann unter der Annahme, dass eine Absorption von 1,0 bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration an RNA von 40 µg/ml entspricht, errechnet [39].

3.1.7. Reverse Transkription der mRNA (cDNA-Synthese)

Für die Umschreibung der mRNA in cDNA wurde der Kit *Super Script First-Strand Synthesis for RT-PCR* mit Oligo (dT)-Primern verwendet. Hierzu wurden alle Komponenten des Kits auf Eis aufgetaut, gemixt und kurz anzentrifugiert. Es wurden 1 µg RNA mit einer Konzentration von 500 ng/µl eingesetzt und zu jeder Probe je 1 µl dNTP-Mix, Oligo(dT)-Primer sowie 8 µl DEPC-Wasser zugegeben. Die so vorbereiteten Proben wurden für 5 min bei 65°C im Thermoblock denaturiert und anschliessend sofort auf Eis gestellt. Es wurden zu jeder Probe 2 µl 10-fach RT-

3. Methoden

Puffer, 4 µl MgCl₂-Puffer sowie 1 µl RNase Out Recombinant RNase Inhibitor zupipettiert. Nach einer Inkubation von 2 min bei 42°C im Thermoblock und einer Zugabe von je 1 µl Super Script II RT wurden die Proben bei 42°C für 50 min inkubiert. Es folgte ein weiterer Inkubationsschritt für 15 bei 70°C mit anschliessendem Abkühlen der Proben auf Eis. In einem letzten Schritt wurde jeder Probe 1 µl RNase H zugegeben und für 20 min bei 37°C inkubiert.

Da die Effektivität der Reversen Transkriptase nicht immer konstant ist, ist es allgemeine Praxis Mehrfachansätze zu benutzen. Jede Probe wurde deshalb im 4-fach Ansatz umgeschrieben und anschliessend gepoolt, um ein repräsentatives Ergebnis zu erzielen.

3.1.8. PCR

Die quantitative *Real Time PCR* wurde mit dem LightCycler I mittels LC Fast Start DNA Master SYBR Green I durchgeführt. Es wurden 2 µl cDNA jeder Probe in einem 20 µl-Ansatz in die PCR eingesetzt. Alle notwendigen Informationen zu den Primern sind in Tabelle 2 dargestellt. Der PCR-Ansatz wurde nach Herstellerangaben pipettiert. Das PCR-Programm wurde folgendermassen gewählt:

Denaturierung:	10 min	95°C
40 Zyklen:		
Denaturierung	15 s	95°C
Annealing	5 s	siehe Tabelle 1
Elongation	20 s	72°C
Schmelzkurve:	10 s	95°C
	10 s	60°C
	kont bei 0,1°C/s auf 99°C	
Kühlen:	60 s	40°C

3.1.9. Bestimmung der Zytokinkonzentration mittels ELISA

Die ELISA's zur Bestimmung der Proteinkonzentration von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Damit die Proteinkonzentration der Proben innerhalb der Standardkurve lagen wurde die Verdünnung der Proben vorher ausgetestet.

3.2. Tierversuche

3.2.1. Verbrennungsmodell

Männliche Sprague Dawley Ratten wurden unter standardisierten Bedingungen in einem klimatisierten Raum bei 20 – 21°C und einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere für 7 Tage akklimatisiert. Alle Tiere erhielten für die Dauer des Versuches Wasser ad libitum und eine proteinreiche, hoch-kalorische Diät (Fresubin, Fresenius Medical Care). Den Tieren aller Gruppen wurde während des Versuchs nach folgendem Fütterungsschema die Flüssigdiät zugeführt: 25 kcal am Tag der Verbrennung, 51 kcal am ersten Tag, 76 kcal am zweiten nach der Verbrennung und 101 kcal ab dem dritten Tag nach Trauma. Die Ratten wurden in drei Gruppen zu je 20 Tieren randomisiert. Die Ratten der ersten beiden Gruppen wurden analgesiert (Buprenorphin 1 mg/kg Körpergewicht) und anästhesiert (Pentobarbital 50 mg/kg Körpergewicht). Diese Tiere erhielten eine thermische Verletzung, die 30 % der gesamten Körperoberfläche umfasst. Anschliessend wurde den Tieren Ringerlösung (50 ml/kg Körpergewicht) intraperitoneal als Flüssigkeitsausgleich verabreicht. Den Tieren der ersten Gruppe wurde eine Stunde nach der Verletzung Insulin subkutan injiziert, den Ratten der zweiten Gruppe physiologische Kochsalzlösung. Die Injektionen wurden täglich zur gleichen Uhrzeit wiederholt. Die Ratten der dritten Gruppe erhielten zwar die gleiche Nahrung, es wurde ihnen aber kein Trauma und keine Injektion verabreicht. Proben dieser Tiere wurden zur Bestimmung der Normalwerte herangezogen. Die Ratten wurden über die gesamte Versuchsdauer täglich mehrmals beobachtet. Nach 1, 2, 5 und 7 Tagen wurden Ratten der jeweiligen Gruppen mittels Injektion einer Überdosierung von Ketanest euthanasiert, Blut durch Punktion der Vena cava und

die Leber zur Bestimmung der Parameter entnommen. Die Blutproben wurden für 10 min bei 700 g zentrifugiert und das Serum abgenommen. Serum sowie Leberproben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Die optimale Insulinmenge wurde in einer Dosisfindungsstudie ermittelt. Hierzu wurden den Tieren Insulinkonzentrationen von 0,5 I.E./kg KG, 1 I.E./kg KG, 2,5 I.E./kg KG, 5 I.E./kg KG oder 10 I.E./kg KG subkutan verabreicht. In den Hauptversuchen wurde die Insulinkonzentration eingesetzt, die hinsichtlich der Exprimierung pro-inflammatorischer Zytokine im Serum 24 h nach der Verbrennung den grössten Effekt erzielte.

3.2.2. Sepsismodell

Männliche Sprague Dawley Ratten wurden unter standardisierten Bedingungen in einem klimatisierten Raum bei $20 - 21^{\circ}\text{C}$ und einem 12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere für 7 Tage akklimatisiert. Alle Tiere erhielten für die Dauer des Versuches Wasser ad libitum und eine proteinreiche, hoch-kalorische Diät (Fresubin, Fresenius Medical Care). Die Ratten wurden in 3 Gruppen zu je 20 Tieren randomisiert. Die Tiere der ersten beiden Gruppen erhielten eine intraperitoneale Injektion von Buprenorphin (1 mg/kg Körpergewicht). Den Tieren der ersten Gruppe wurde LPS (3 mg/kg Körpergewicht) zur Induzierung einer Sepsis injiziert. Eine Stunde nach der LPS-Injektion wurde diesen Tieren Insulin subkutan appliziert. Die zu verabreichende Insulinmenge wurde aus der Dosisfindungsstudie des Verbrennungsmodells entnommen. Die Ratten der zweiten Gruppe bekamen physiologische Kochsalzlösung als Placebo intraperitoneal injiziert. Den Tieren der dritten Gruppe wurden keine Injektionen verabreicht. Proben dieser Tiere wurden zur Bestimmung der Normalwerte herangezogen. Die Tiere wurden über die gesamte Versuchsdauer täglich mehrmals beobachtet. Nach 1, 2, 5 und 7 Tagen wurden Ratten der jeweiligen Gruppen mittels Injektion einer Überdosierung von Ketanest euthanasiert, Blut durch Punktion der Vena cava und die Leber zur Bestimmung der Parameter entnommen. Die Blutproben wurden für 10 min bei 700 g zentrifugiert und das Serum abgenommen. Serum sowie Leberproben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

3.2.3. Bestimmung von konstitutiven und Akute-Phase-Proteinen im Serum

Die Bestimmung von konstitutiven Proteinen (Albumin) und Akute-Phase-Proteinen (CRP) erfolgte nach standardisierten Labormethoden (Roche, Mannheim) und wurde von der Abteilung „Klinische Chemie“ (Universität Regensburg) durchgeführt.

3.2.4. Herstellung von Leberhomogenaten

Der Lysepuffer zur Herstellung der Leberhomogenate wurde immer frisch vor Gebrauch angesetzt. Die Leberproben wurden gewogen und bis zur Zugabe von Lysepuffer weiter in flüssigem Stickstoff gelagert. Zu jeder Probe wurde in Bezug auf das Gewicht die 6 fache Menge des Lysepuffer zugegeben und auf Eis gestellt. Die Zerkleinerung der Lebergewebe erfolgte zuerst mit einem Pistill und anschliessend durch Ultraschall (10 Schläge bei 1 Schlag/ sek). Die so zerkleinerten Proben wurden bei 14000 U /min bei 4°C für 10 min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig dekantiert, aliquotiert und bis zur Bestimmung der Zytokine bei -20°C gelagert.

3.2.5. Bestimmung der Zytokinkonzentration mittels ELISA

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration pro- und anti-inflammatorischer Zytokine mittels ELISA wurden Leberhomogenate und Serumproben verwendet. Die Durchführung der ELISA's erfolgte nach Herstellerangaben. Damit die Proteinkonzentration der Proben innerhalb der Standardkurve lagen wurde die Verdünnung der Proben vorher ausgetestet.

3.2.6. Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteingesamtkonzentration aus Leberhomogenaten wurde ein BCA-Kit verwendet. Die Durchführung der Bestimmung der Proteingesamtkonzentration erfolgte nach Herstellerangaben. Alle Proben wurden im 3-fach Ansatz bestimmt.

3.2.7. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels WesternBlot

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Western-Blot wurden fertige Gelkassetten und eine Tankplot-Apparatur verwendet. Der Proteingröße entsprechend wurde ein 10 %-iges Trenngel eingesetzt. Jede Probe wurde auf eine Proteingesamtkonzentration von 50 µg bei einem Volumen von 20 µl eingestellt. Für die Denaturierung wurden die Proben mit 1:2 mit Laemmlipuffer verdünnt, 5 min bei 95°C inkubiert und anschliessend sofort auf Eis gestellt. Nach dem Auftragen der Proben wurde die Elektrophorese bei 25 mA durchgeführt. Der Transfer der aufgetrennten Proteine erfolgte bei 120 mA für 40 min auf eine Nitrozellulosemembran. Anschliessend wurde die Membran in der für den Antikörper entsprechenden Blockierlösung (siehe Tabelle 4) 1 h bei RT inkubiert. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach einem Waschschrift in TBS wurde der sekundäre Antikörper aufgetragen und die Membran für 1 h bei RT inkubiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels *enhanced chemoluminescence*-Färbung (ECL) nach Herstellerangaben.

Als Nachweis der Gleichbeladung aller Proben wurde anschliessend ein Aktin-Blot durchgeführt. Die noch gebundenen Antikörper des ersten WesternBlots wurden mit der Stripplösung bei RT für 1,5 h heruntergewaschen. Die Detektion der Banden erfolgte ebenfalls mit einer *enhanced chemoluminescence*-Färbung (ECL) nach Herstellerangaben.

Tabelle 4: WesternBlot-Antikörper

	Primärantikörper- verdünnung	Sekundärantikörper- verdünnung	Blockierlösung
Caspase-3	1:500	1:5000	BSA 3 % Trockenmilch 5 % in TBS
Caspase-9	1:600	1:2000	Trockenmilch 2,5 % in TBS
BCI 2	1:500	1:1000	Trockenmilch 3,5 % in TBS

3. Methoden

Fortsetzung Tabelle 4

	Primärantikörper- verdünnung	Sekundärantikörper- verdünnung	Blockierlösung
Aktin	1:500	1:500	Trockenmilch 5 % in TBS

3.2.8. RNA-Isolierung aus Lebergewebe

Die Gesamt-RNA aus Lebergewebe wurde mittels Trizol isoliert. Hierzu wurde direkt auf die gefrorene Leberprobe von ca 40 – 60 mg 1 ml Trizol gegeben und sofort mit dem Ultraturrax homogenisiert. Die Probe wurde anschliessend auf Eis für 5 min inkubiert. Die weitere Isolierung der Gesamt-RNA wurde dann wie unter 3.1.6. beschrieben durchgeführt.

3.2.9. Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Gesamt-RNA aus Leberproben wurde wie unter 3.1.7. beschrieben durchgeführt.

3.2.10. Reverse Transkription der mRNA (cDNA-Synthese)

Die Umschreibung der mRNA in cDNA für die Bestimmung der hepatischen mRNA-Konzentration wurde wie unter 3.1.8. beschrieben mit dem gleichen Kit durchgeführt. Als Primer wurden allerdings für die *in vivo* Versuche *Random Hexamere* verwendet.

3.2.11. *Real Time PCR*

Die quantitative PCR wurde mit dem LightCycler I mittels LC Fast Start DNA Master SYBR Green I durchgeführt. Es wurden 2 µl cDNA jeder Probe in einem 20 µl-Ansatz

3. Methoden

in die PCR eingesetzt. Der PCR-Ansatz wurde nach Herstellerangaben pipettiert. Alle notwendigen Informationen zu den Primern sind in Tabelle 3 dargestellt. Das PCR-Programm wurde folgendermassen gewählt:

Denaturierung:	10 min	95°C
40 Zyklen:		
Denaturierung	15 s	95°C
Annealing	5 s	siehe Tabelle 2
Elongation	20 s	72°C
Schmelzkurve:		
	10 s	95°C
	10 s	60°C
	kont bei 0,1°C/s auf 99°C	
Kühlen:	60 s	40°C

3.3. Versuche mit humanem Material

3.3.1. Modell

Die Studie wurde am *Shriners Hospital for Children and Department of Surgery, University Texas Medical Branch, Galveston (Texas, USA)* durchgeführt. Die Genehmigung der Studie wurde von IRB (*Institutional Review Board*), *University of Texas Medical Branch, Galveston (Texas, USA)* erteilt. Die Serumproben wurden uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Abnahme der Serumproben erfolgte nach den Richtlinien der örtlichen Ethikkommission und mit Einverständnis der Patienten, bzw. deren Angehörigen.

In die Studie wurden Kinder im Alter von 1 bis 18 Jahren und einer Verbrennung dritten Grades, die 40 % der Gesamtkörperoberfläche (*Total Body Surface Area (TBSA)*) entsprach, aufgenommen. Zwischen Verbrennung und stationärer Aufnahme durften nicht mehr als 3 Tage liegen. Die Sepsis der Patienten wurde als

systemische Inflammation (*Systemic Inflammation Responds Syndrom (SIRS)*) mit einem identifizierbaren Infektionsherd definiert.

Die Patienten wurden in 2 Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe, mit 13 Patienten, erhielt eine Insulinbehandlung, bei der der Blutglukosegehalt von 120 bis 180 mg/dl nicht überschritten werden sollte. Das Insulin wurde entweder kontinuierlich oder als Einzeldosis verabreicht. Die zweite Gruppe, mit 15 Patienten, bekam kein Insulin, da bei dieser Patientengruppe der Blutglukosespiegel im normalen Bereich von 120 – 180 mg/dl lag.

Das Gewicht der Patienten wurde wöchentlich gemessen. Die Nahrungsgabe erfolgte nach einem bestimmten Protokoll und war mit Hilfe der Curreri-Formel kalkuliert. Pro Tag erhielten die Kinder 25 kcal/kg KG zuzüglich 40 kcal/%TBSA. Die Nahrung wurde enteral verabreicht.

Die Serumalbuminkonzentration wurde täglich zur gleichen Zeit gemessen. War die Konzentration von Serumalbumin unter einem Wert von 2,0 g/dl wurde den Kindern exogenes Albumin alters- und gewichtsabhängig verabreicht. Kinder unter 2 Jahren mit einem Gewicht unter 20 kg erhielten 6,25 g Albumin/Tag, Kinder zwischen 2 und 9 Jahren und einem Gewicht zwischen 20 und 40 kg 12,5 g Albumin/Tag und Kinder über 10 Jahren und einem Gewicht über 40 kg wurde 25 g Albumin/Tag verabreicht.

3.3.2. Bestimmung serumkonstitutiver und Akute-Phase-Proteine

Die Bestimmung von konstitutiven Proteinen (Albumin) und Akute-Phase-Proteinen (CRP) erfolgte nach standardisierten Labormethoden (Böhringer, Ingelheim).

3.3.3. Bestimmung der Zytokinkonzentrationen mittels ELISA

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration pro- und anti-inflammatorischer Zytokine mittels ELISA wurden Serumproben verwendet. Die Durchführung der ELISA's erfolgte nach Herstellerangaben. Damit die Proteinkonzentration der Proben innerhalb der Standardkurve lagen wurde die Verdünnung der Proben vorher ausgetestet.

3.4. Auswertung und Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels *Analysis of variance* (ANOVA) und dem *Student's-t test* mit dem dazugehörigen Korrelationsquotienten nach Bonferroni. Die Daten wurden als arithmetisches Mittel±Standardabweichung (SD) oder als arithmetisches Mittel±*Standard error of the mean* (SEM) angegeben. Eine mindestens 95 %-ige Aussagewahrscheinlichkeit ($P < 0,05$) wurde als signifikant angesehen.

3.5. Versuchsstrategie

3.5.1. *In vitro*

- Dosisfindungsstudie für LPS *in vitro* in primären Hepatozyten
- Dosisfindungsstudie für Insulin *in vitro* nach einer LPS-Applikation in primären Hepatozyten
- Effekt von Insulin auf pro- und anti-inflammatorische Zytokine in primären Hepatozyten

3.5.2. *In vivo*

- Dosisfindungsstudie für Insulin *in vivo* nach einer thermalen Verletzung in Ratten
- Einfluss von Insulin auf die Leber nach einer thermalen Verletzung
- Einfluss von Insulin auf die Leber nach LPS-Gabe
- Effekt von Insulin auf pro- und anti-inflammatorische Zytokine in Ratten nach einer thermalen Verletzung
- Effekt von Insulin auf pro- und anti-inflammatorische Zytokine in Ratten nach LPS-Gabe

3.5.3. Studie mit humanem Material

- Einfluss von Insulin auf konstitutive hepatische Proteine in Serumproben von Kindern nach einer thermalen Verletzung
- Effekt von Insulin auf pro- und anti-inflammatorische Zytokine in Serumproben von Kindern nach einer thermalen Verletzung

4. Ergebnisse

4.1. *In vitro* Versuche

4.1.1. Dosisfindungsstudie für LPS-Gabe *in vitro*

Für die Beurteilung der Wirkung von LPS auf primäre Hepatozyten wurde repräsentativ die Veränderung der IL-6 Expression gewählt. Insgesamt wurden 5 unabhängige Versuche durchgeführt. Es wurden LPS-Konzentrationen von 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml und 500 µg/ml getestet. LPS erhöht über den gesamten Zeitraum der Studie IL-6 dosisabhängig. Bei einer Gabe von 100 µg/ml LPS wurde die höchste Expression von IL-6 gegenüber unbehandelten Zellen erzielt. (Abb. 3). Für alle weiteren Zellversuche wurde deshalb eine LPS-Dosis von 100 µg/ml verwendet.

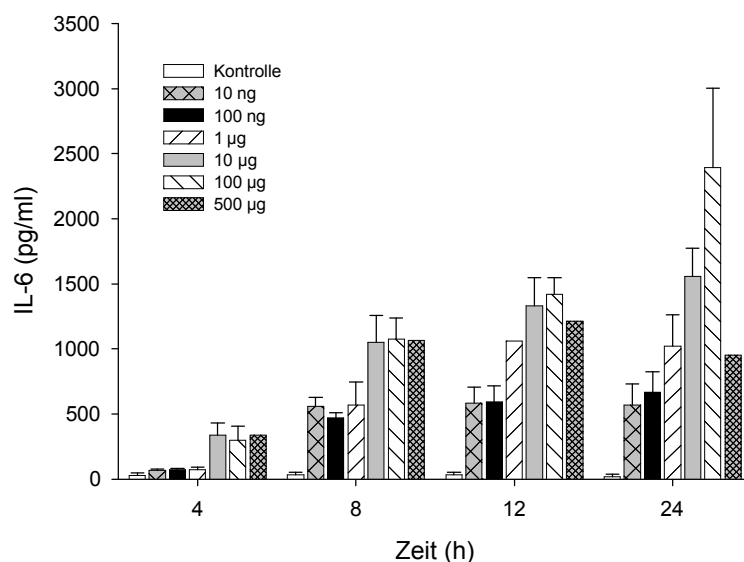


Abb. 3: Dosisfindungsstudie von LPS *in vitro* bei primären humanen Hepatozyten (Mittelwert \pm SEM, n = 5)

4. Ergebnisse

4.1.2. Dosisfindungsstudie für Insulingabe *in vitro*

Für die Beurteilung des Effektes von Insulin auf LPS-stimulierte Hepatozyten wurde ebenfalls IL-6 gewählt. Insgesamt wurden 4 unabhängige Versuche durchgeführt. Nach einer Applikation von LPS ist IL-6 im Zellüberstand erhöht. Es wurden Insulinkonzentrationen von 0,5 I.E./ml, 2,5 I.E./ml, 5 I.E./ml, 10 I.E./ml und 50 I.E./ml getestet. Insulin vermindert zu allen Zeitpunkten die Expression von IL-6 dosisabhängig nach einer LPS-Gabe von 100 µg/ml Insulin. Der grösste Effekt auf die Verminderung der Expression von IL-6 nach 24 h wurde bei einer Gabe von 10 I.E./ml Insulin erzielt (Abb. 4). Es zeigte sich bei 50 I.E./ml Insulin, dass die IL-6 Konzentration ähnlich der IL-6 Konzentration von unbehandelten Zellen ist. Allerdings war zu beobachten, dass nach Anfärbung der Zellen mit Trypanblau ein grosser Teil der Zellen nicht mehr vital waren. In allen weiteren Versuchen mit humanen primären Hepatozyten wurde deshalb eine Insulinkonzentration von 10 I.E./ml eingesetzt.

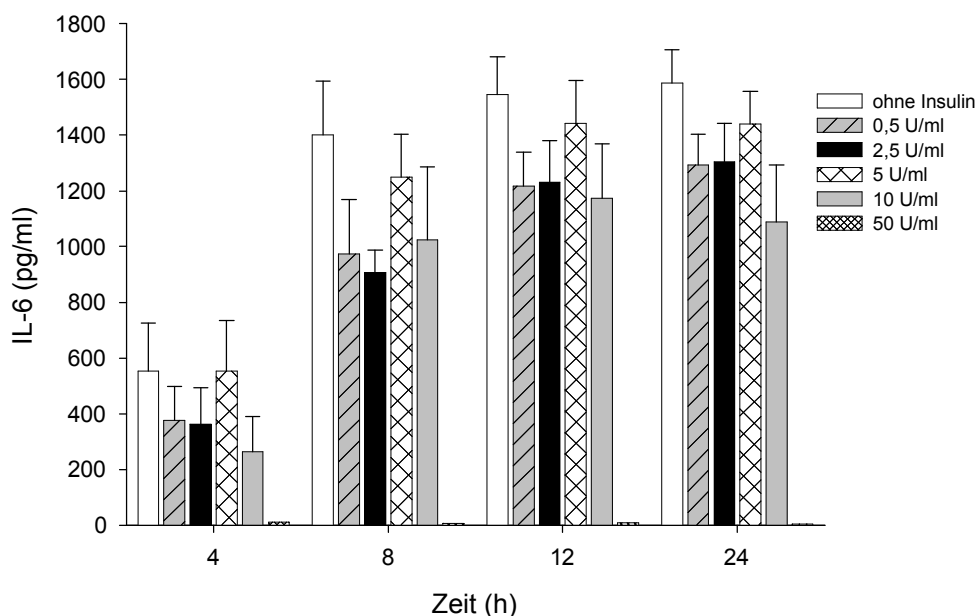


Abb. 4: Dosisfindungsstudie für Insulin *in vitro* mit primären humanen Hepatozyten (Mittelwert \pm SEM, n = 4)

4. Ergebnisse

4.1.3. Bestimmung der mRNA pro-inflammatorischer Zytokine

Die Konzentration der mRNA pro-inflammatorischer Zytokine ist nach LPS-Gabe im Vergleich zur mRNA Konzentration unbehandelter Zellen erhöht und wird nach einer Insulinbehandlung vermindert.

So zu sehen bei mRNA Konzentration von TNF. Die Konzentration der TNF mRNA ist bei den Zellen nach LPS-Stimulierung gegenüber der mRNA-Konzentration von TNF unbehandelter Zellen erhöht. Insulin vermindert die mRNA Konzentration von TNF signifikant 24 h nach der LPS-Gabe im Vergleich zu Zellen, die kein Insulin erhielten; $P < 0,05$ (Abb. 5).

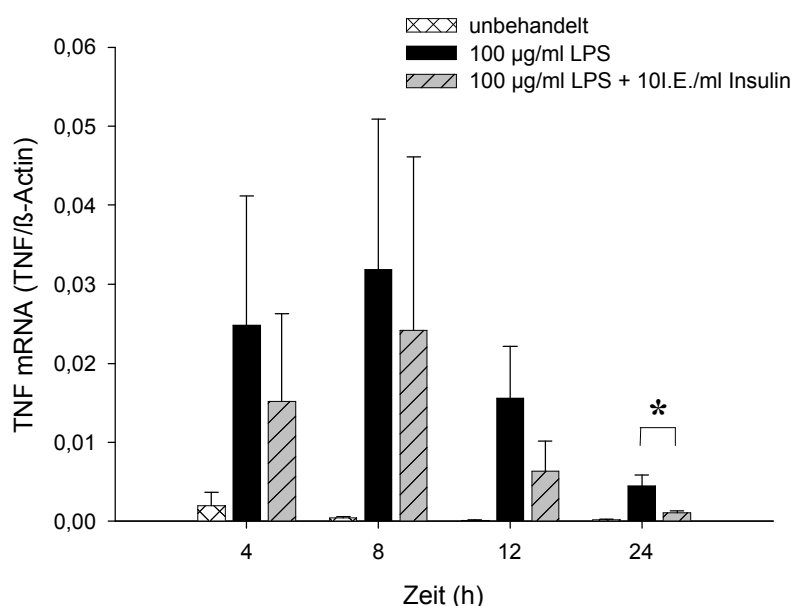


Abb. 5: mRNA Konzentration von TNF normiert zu β -Aktin mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Mittelwert \pm SEM, $n = 3$, * = signifikanter Unterschied zwischen Zellen mit LPS und Zellen mit LPS + Insulin, $P < 0,05$)

Ein ähnlicher Effekt war auch bei IL-1 β zu beobachten. Nach einer LPS-Stimulierung der Zellen fand sich eine Erhöhung der mRNA Konzentration von IL-1 β gegenüber unbehandelten Zellen. Eine Insulinbehandlung der Zellen vermindert die mRNA Konzentration von IL-1 β signifikant 24 h nach der LPS-Gabe im Vergleich zu Zellen, die keine Insulinbehandlung erhielten; $P < 0,05$ (Abb. 6). Die mRNA Konzentration von

4. Ergebnisse

IL-6 ist nach der LPS-Gabe ebenso erhöht. Insulin vermindert die Expression der mRNA von IL-6 signifikant 12 h nach der LPS-Stimulierung gegenüber der Expression unbehandelter Zellen; $P < 0,05$ (Abb. 7). Zu einem späteren Zeitpunkt hat Insulin keinen signifikanten Effekt auf die mRNA Konzentration von IL-6. Die mRNA Konzentration von MIF ist nach einer LPS-Stimulierung der Zellen gegenüber unbehandelten Zellen erhöht, allerdings hat Insulin keinen signifikanten Effekt auf die mRNA Konzentration von MIF.

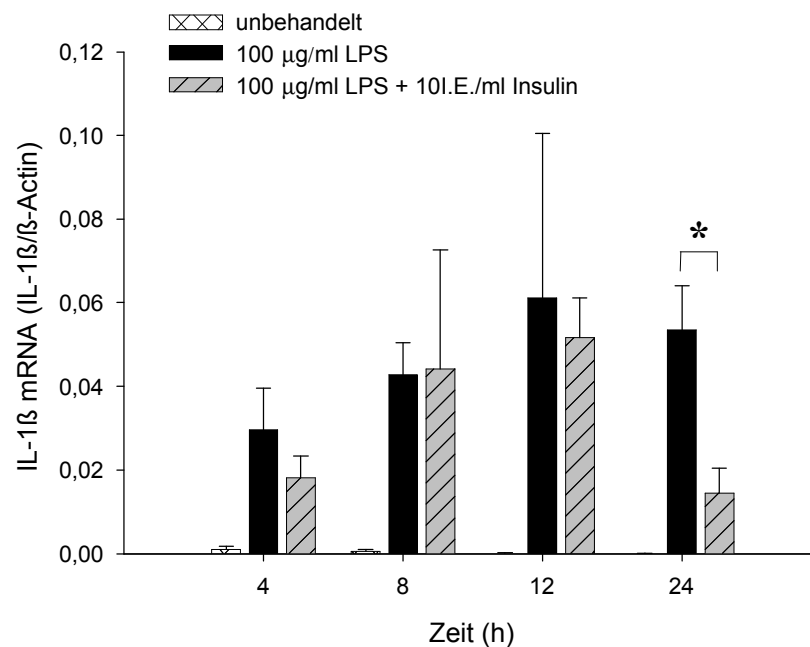


Abb. 6: mRNA Konzentration von IL-1 β normiert zu β -Aktin mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Mittelwert \pm SEM, $n = 3$, * = signifikanter Unterschied zwischen Zellen mit LPS und Zellen mit LPS + Insulin, $P < 0,05$)

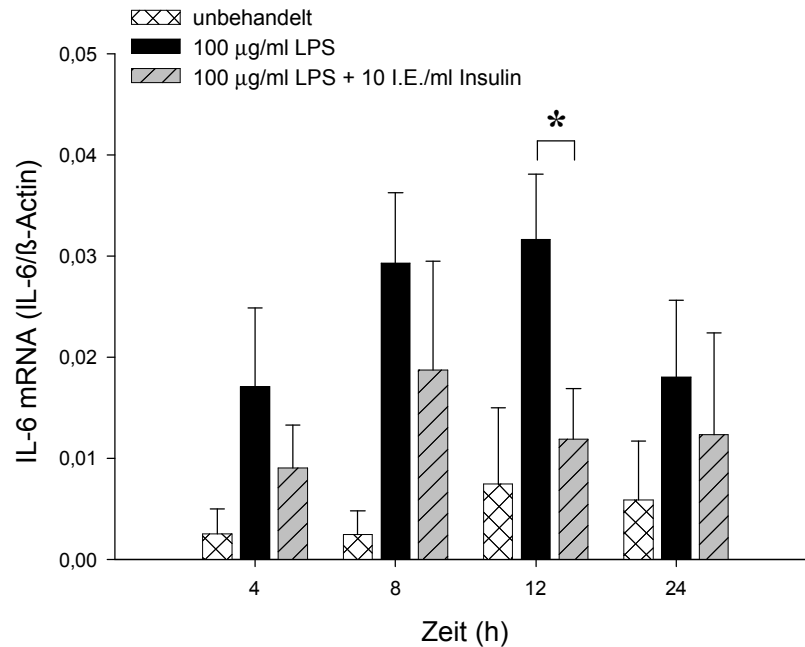


Abb. 7: mRNA Konzentration von IL-6 normiert zu β -Aktin mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Mittelwert \pm SEM, $n = 3$, * = signifikanter Unterschied zwischen Zellen mit LPS und Zellen mit LPS + Insulin, $P < 0,05$)

4.1.4. Bestimmung der mRNA anti-inflammatorischer Zytokine

Die mRNA Konzentrationen anti-inflammatorischer Zytokine sind nach einer LPS-Applikation in primären humanen Hepatozyten zytokinabhängig vermindert oder nur schwach erhöht. Nach einer Insulinbehandlung werden die mRNA Konzentrationen anti-inflammatorischer Zytokine erhöht.

Nach einer LPS-Gabe steigt die mRNA Konzentration von IL-10 im Vergleich zur mRNA Konzentration unbehauelter Zellen an. Allerdings konnte kein signifikanter Effekt von Insulin auf die Konzentration der mRNA von IL-10 beobachtet werden.

Ein Anstieg der mRNA Konzentration von IFN- γ nach einer LPS-Gabe gegenüber unbehauelten Zellen war zwar zu verzeichnen. Jedoch konnte Insulin keine signifikante Verminderung der mRNA Konzentration von IFN- γ im Vergleich zu Zellen ohne Insulinbehandlung erzielen.

4.2. *In vivo* Versuche

4.2.1. *In vivo* Versuche mit thermaler Verletzung

4.2.1.1. Dosisfindung für Insulinapplikation

Nach einem Trauma sind pro-inflammatorische Zytokine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Insulin vermindert 24 h nach einer thermalen Verletzung IL-1 β , IL-6, MIF und TNF dosisabhängig im Serum, wobei eine Gabe von 5 I.E./kg KG die grösste Wirkung erzielte (Abb. 8). Für alle weiteren Tierversuche wurde deshalb eine Insulindosis von 5 I.E./kg KG subkutan verwendet.

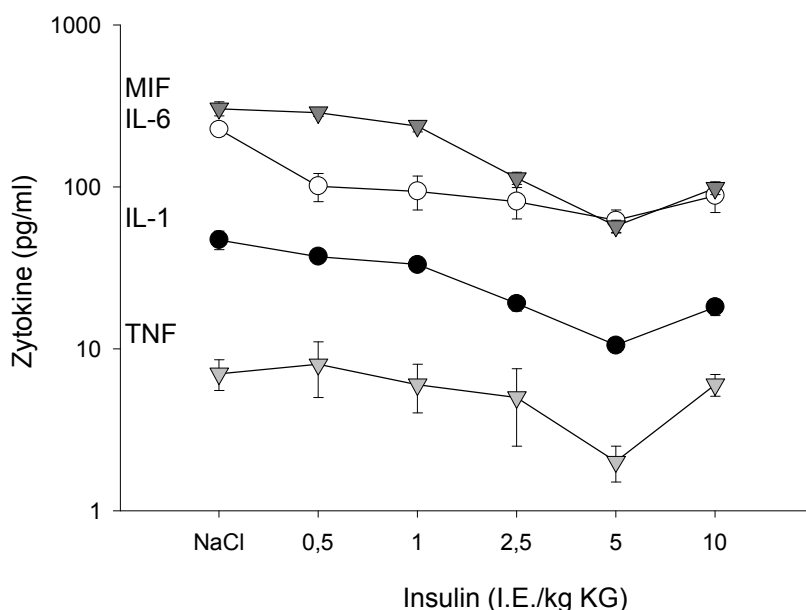


Abb. 8: Dosisfindung für Insulinapplikation nach thermaler Verletzung *in vivo* (Mittelwert \pm SEM; n=4)

4.2.1.2. Bestimmung von serumkonstitutiven und Akute-Phase-Proteinen

Serumkonstitutive Proteine, wie Albumin werden unmittelbar nach einer thermalen Verletzung vermindert und blieben während der gesamten Studie erniedrigt. Insulin

4. Ergebnisse

erhöht Serumalbumin an Tag 1, 5 und 7 nach einem thermischen Trauma im Vergleich zur Kontrollgruppe; $P < 0,05$ (Abb. 9).

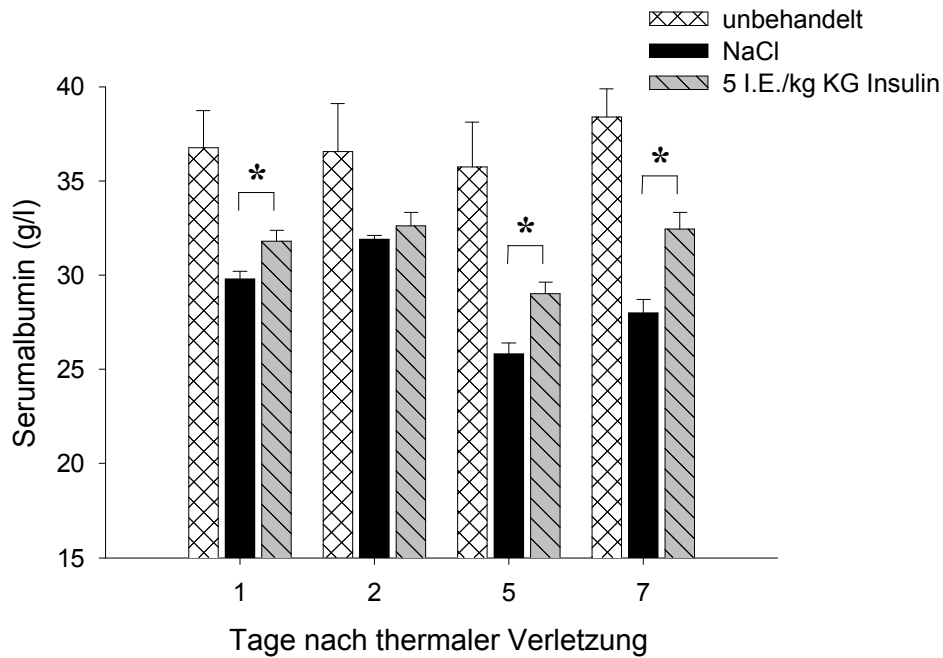


Abb.: 9 Serumalbumin mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu Normalwerten nach thermaler Verletzung *in vivo* (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

Im Gegensatz dazu sind Akute-Phase-Proteine, wie CRP nach einer thermalen Verletzung erhöht und bleiben auch bis zu 7 Tagen nach dem Trauma erhöht. Eine Insulinbehandlung vermindert CRP signifikant an Tag 1 und 7 nach einem Trauma im Vergleich zu den Tieren, die NaCl erhielten; $P < 0,05$ (Abb. 10).

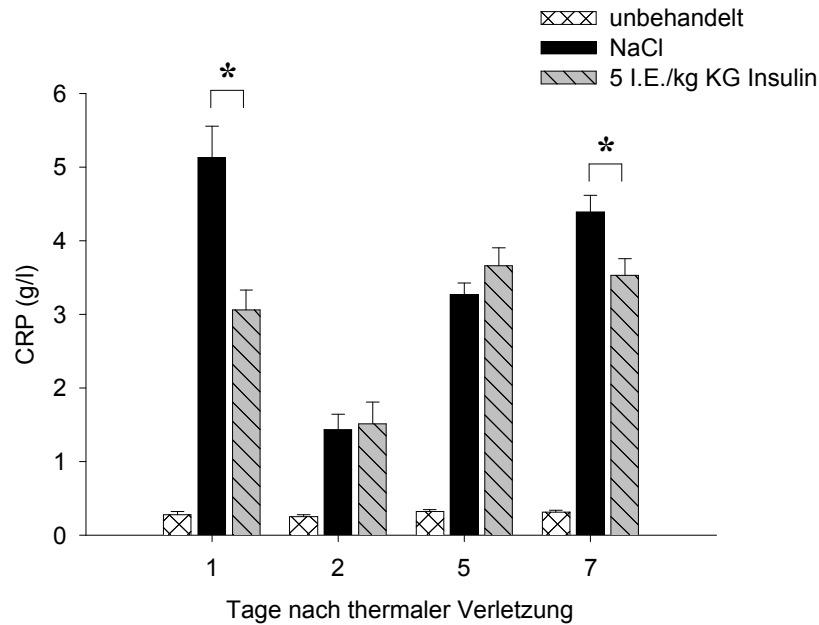


Abb. 10: Serum-CRP mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu Normalwerten nach thermaler Verletzung *in vivo* (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.2.1.3. Bestimmung pro-inflammatorischer Zytokine im Serum

Nach einer thermalen Verletzung sind auch im Serum pro-inflammatorische Zytokine gegenüber der unbehandelten Gruppe erhöht. Insulin vermindert im Serum TNF signifikant an Tag 1 und 2 nach einem Trauma im Vergleich zur NaCl-Gruppe; $P < 0,05$ (Abb. 11). Zu späteren Zeitpunkten konnte kein Unterschied festgestellt werden. Auch die Zytokinkonzentration von IL-1 β ist nach einer thermalen Verletzung im Vergleich zur unbehandelten Gruppe im Serum erhöht und bleibt auch über den gesamten Zeitraum der Studie höher, als die Zytokinkonzentration im Serum un behandelter Tiere. Insulin vermindert signifikant an Tag 1, 5 und 7 die Serumkonzentration an IL-1 β gegenüber der von Tieren mit NaCl-Applikation; $P < 0,05$ (Abb. 12).

4. Ergebnisse

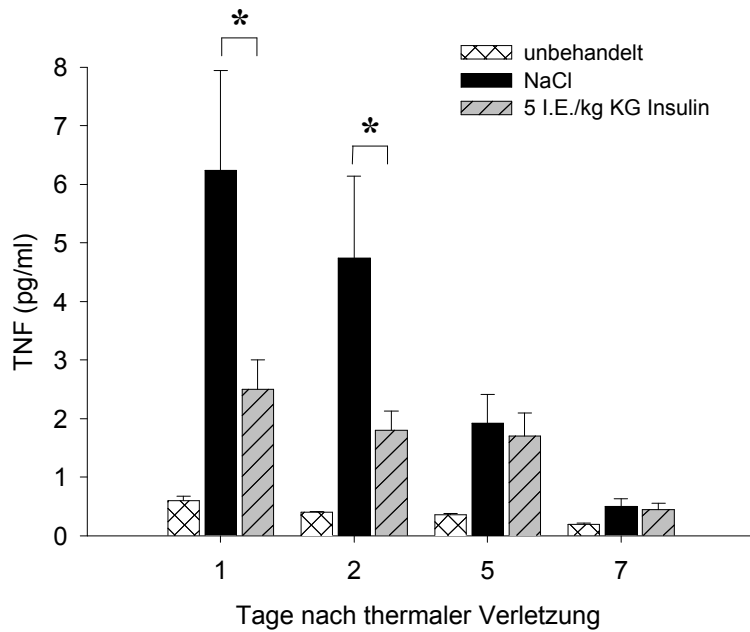


Abb. 11: Proteinkonzentration von TNF im Serum mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

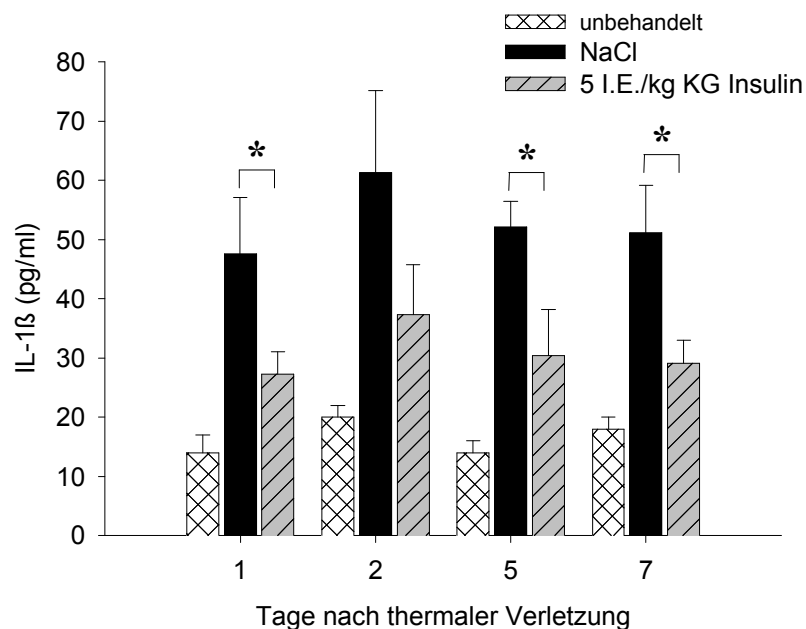


Abb. 12: Proteinkonzentration von IL-1 β im Serum mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4. Ergebnisse

Die Serumkonzentration von IL-6 ist nach einer thermalen Verletzung gegenüber unbehandelten Tieren ebenfalls erhöht. Durch die Gabe von Insulin wird die Konzentration von IL-6 im Serum signifikant am ersten Tag nach dem Trauma im Vergleich zur NaCl-Gruppe erniedrigt; $P < 0,05$ (Abb. 13). Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei MIF beobachtet. Die Konzentration von MIF im Serum ist nach einem Trauma gegenüber den Normalwerten erhöht und wird durch eine Insulinapplikation signifikant an Tag 5 und 7 im Kontrast zu Tieren mit NaCl-Applikation vermindert; $P < 0,05$ (Abb. 14).

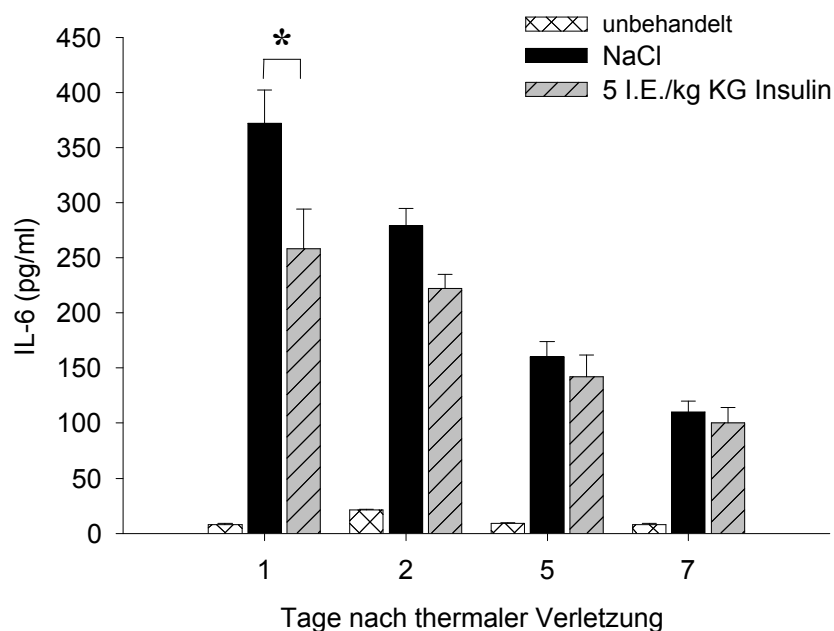


Abb. 13: Proteinkonzentration von IL-6 im Serum mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

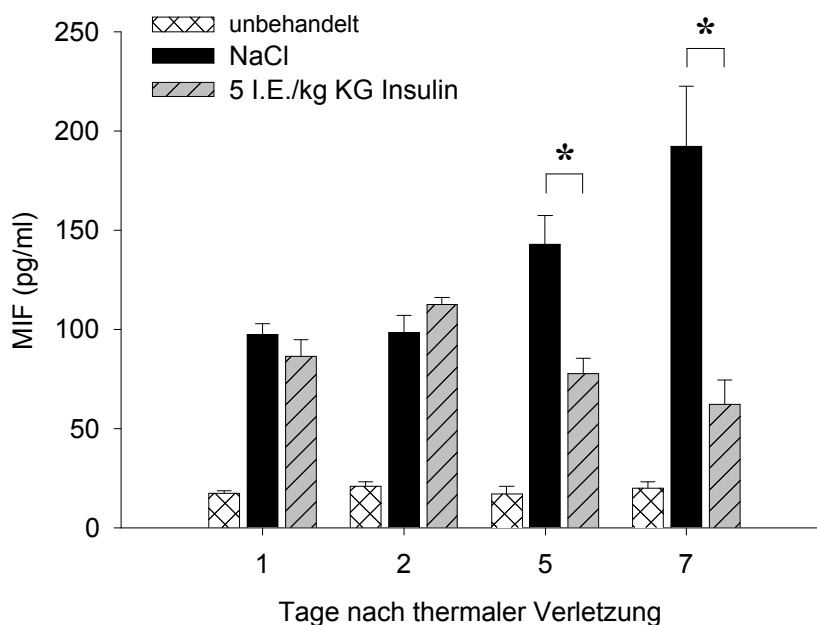


Abb. 14: Proteinkonzentration von MIF im Serum mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.2.1.4. Bestimmung der hepatischen mRNA pro-inflammatorischer Zytokine

Die Expression der hepatischen mRNA pro-inflammatorischer Zytokine ist nach einer thermalen Verletzung stark erhöht. So ist die Konzentration der hepatischen mRNA von IL-1 β im Verlauf der gesamten Studie höher als die der Kontrollgruppe. Durch eine Insulinbehandlung wird das Level an hepatischer mRNA von IL-1 β signifikant an Tag 1, 5 und 7 im Vergleich zur NaCl-Gruppe vermindert; $P < 0,05$ (Abb. 15). Ein ähnlicher Effekt war auch bei der Expression der hepatischen mRNA von TNF zu beobachten. Nach einer thermalen Verletzung war die mRNA von TNF in der Leber gegenüber den unbehandelten Tieren erhöht. Insulin vermindert die mRNA-Konzentration von TNF in der Leber signifikant an Tag 2 und 5 nach einem Trauma im Vergleich zur Gruppe, die mit NaCl behandelt wurde; $P < 0,05$ (Abb. 16). Bei der Expression der hepatischen Konzentration von IL-6 und MIF konnte durch eine Insulinbehandlung kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

4. Ergebnisse

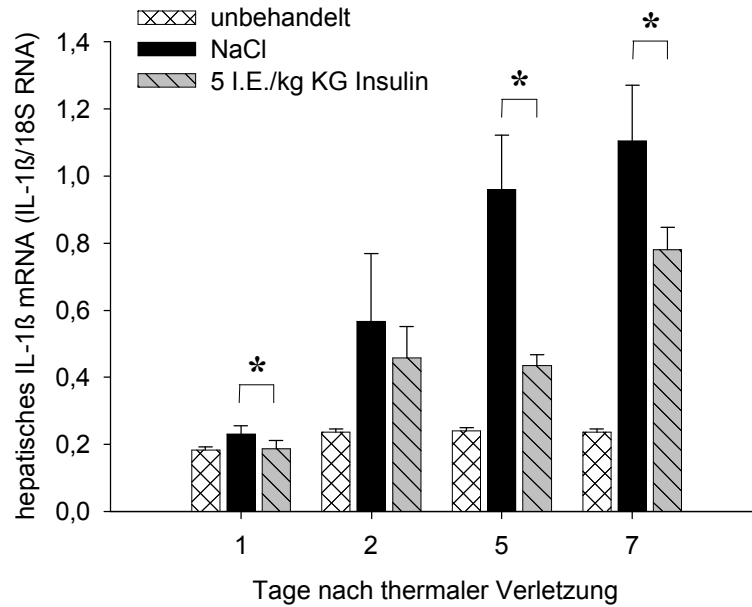


Abb. 15: hepatische mRNA Konzentration von IL-1 β mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, P < 0,05)

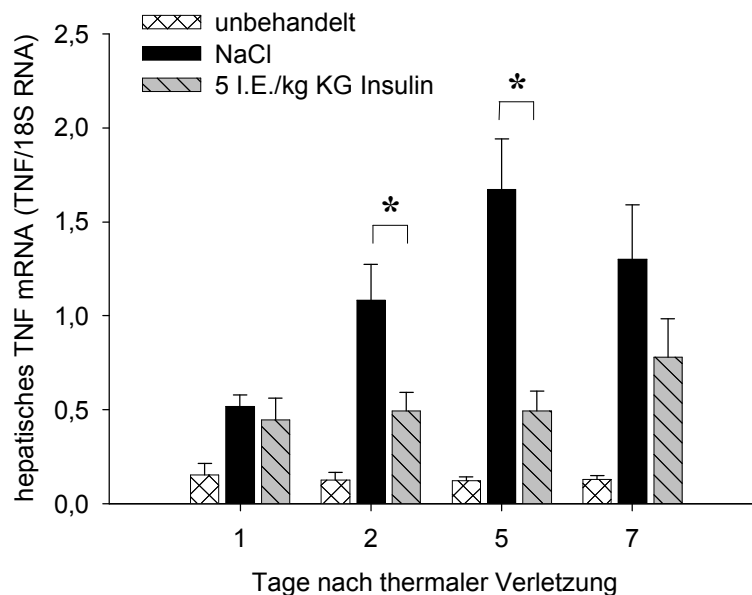


Abb. 16: hepatische mRNA Konzentration von TNF mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, P < 0,05)

4.2.1.5. Bestimmung hepatischer pro-inflammatorischer Zytokine

Nach einer thermalen Verletzung sind pro-inflammatorische Zytokine im Vergleich zu den Normalwerten in der Leber erhöht. Das ist auch deutlich bei der Expression der Proteinkonzentration von IL-1 β sichtbar. Insulin vermindert gegenüber der NaCl-Gruppe IL-1 β signifikant an Tag 1 nach einem Trauma; $P < 0,05$ (Abb. 17). Auch die Expression der Proteinkonzentration von TNF ist gegenüber den Normalwerten nach einer thermalen Verletzung vermehrt. Nach einer Insulinapplikation sinkt die Konzentration von TNF in der Leber im Vergleich zu den Tieren, die NaCl erhielten signifikant an den Tagen 2 und 5 nach einem Trauma; $P < 0,05$ (Abb. 18). Auf die Konzentration von IL-6 und MIF in der Leber hat Insulin nach einer thermalen Verletzung gegenüber den Kontrollgruppen keinen Einfluss.

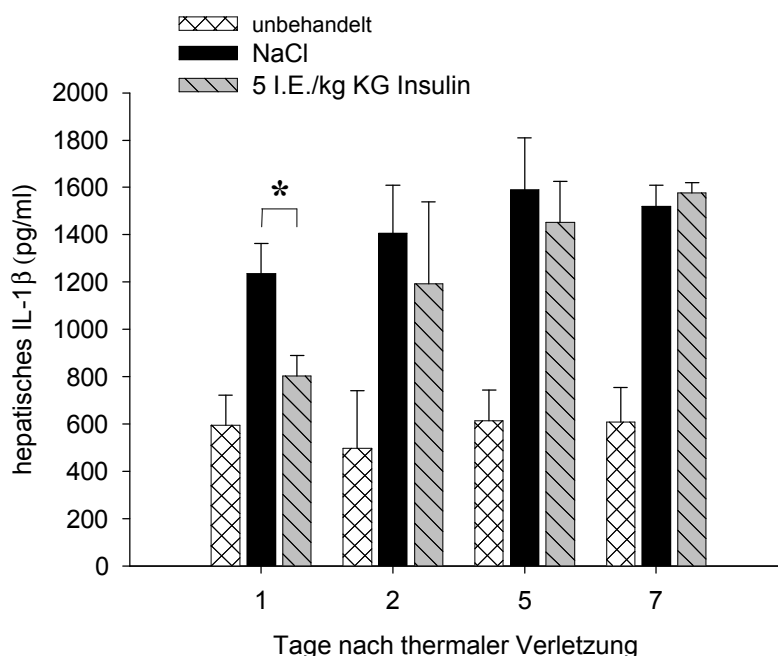


Abb. 17: hepatische Proteinkonzentration von IL-1 β mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

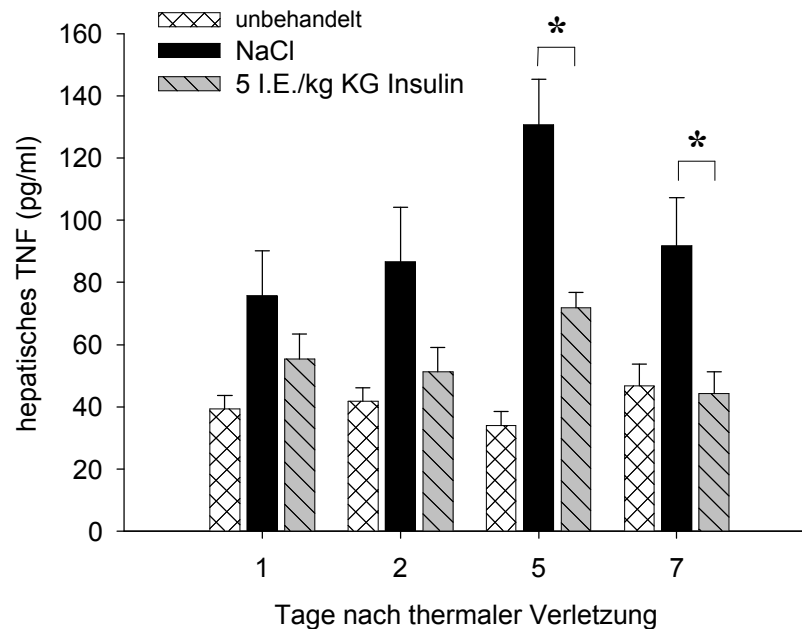


Abb. 18: hepatische Proteinkonzentration von TNF mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, P<0,05)

4.2.1.6. Bestimmung der hepatischen mRNA pro-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktoren

Die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wird über die Expression pro-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktoren reguliert.

Die hepatische Expression der mRNA von C/EBP- β ist nach einer thermalen Verletzung im Vergleich zur unbehandelten Gruppe erhöht. Insulin vermindert die mRNA Expression des pro-inflammatorischen Signaltransduktionsfaktors C/EBP- β an Tag 1 nach dem Trauma im Vergleich zur Gruppe, der NaCl appliziert wurde; P<0,05 (Abb. 19). Auch die mRNA-Expression von STAT-5 ist im Vergleich zur unbehandelten Gruppe erhöht. Insulin vermindert die mRNA von STAT-5 an den Tagen 1, 2 und 7 nach der thermalen Verletzung im Vergleich zur NaCl-behandelten Gruppe; P<0,05 (Abb. 20). Als letzter hepatischer pro-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktor wurde STAT-3 betrachtet. Die mRNA-Expression ist auch hier nach einem Trauma im Vergleich zur unbehandelten Gruppe erhöht. Allerdings

4. Ergebnisse

hat Insulin keinen signifikanten Einfluss auf die Expression der mRNA von STAT-3. Die mRNA von STAT-3 nach einer Insulinbehandlung der Tiere ist ebenso erhöht, wie die der Tiere mit NaCl-Applikation.

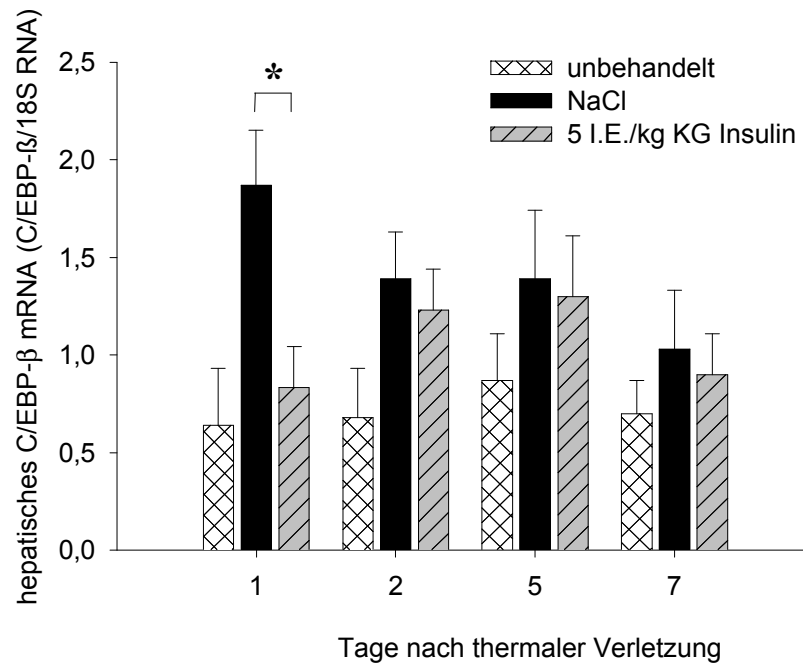


Abb. 19: Konzentration der mRNA von C/EBP-β mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung normiert zu 18S (Mittelwert ± SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, P<0,05)

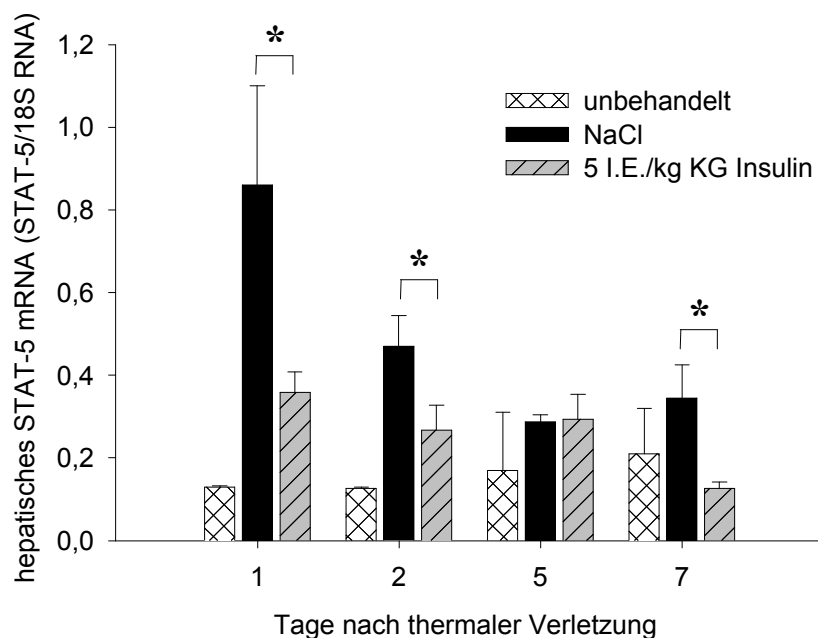


Abb. 20: Konzentration der mRNA von STAT-5 mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, P<0,05)

4.2.1.7. Bestimmung anti-inflammatorischer Zytokine im Serum

Um den Effekt von Insulin auf die systemische Homöostase zu untersuchen, wurden auch anti-inflammatorische Zytokine im Serum bestimmt. Ähnlich wie pro-inflammatorische Zytokine sind auch einige anti-inflammatorische Zytokine nach einer thermalen Verletzung erhöht.

Die Zytokinkonzentration von IL-10 im Serum steigt nach einem Trauma gegenüber den Normalwerten an. Insulin erhöht signifikant an Tag 2, 5 und 7 nach einer thermalen Verletzung die Konzentration an IL-10 im Serum im Vergleich zu der Gruppe, die NaCl erhielt; P<0,05 (Abb. 21). Auch die Konzentration von IL-2 ist im Gegensatz zu den Normalwerten nach einem Trauma erhöht. Nach einer Insulingabe wird die Konzentration von IL-2 signifikant an Tag 5 und 7 im Serum im Vergleich zur NaCl-Gruppe zusätzlich erhöht, P<0,05 (Abb. 22). Nur bei IL-4 ist die Zytokinkonzentration im Serum nach einer thermalen Verletzung gegenüber der Kontrollgruppe vermindert. Insulin erhöht die Konzentration von IL-4 signifikant an

4. Ergebnisse

Tag 5 und 7 nach einem Trauma gegenüber den Tieren, die nicht mit Insulin behandelt wurden; $P < 0,05$ (Abb. 23).

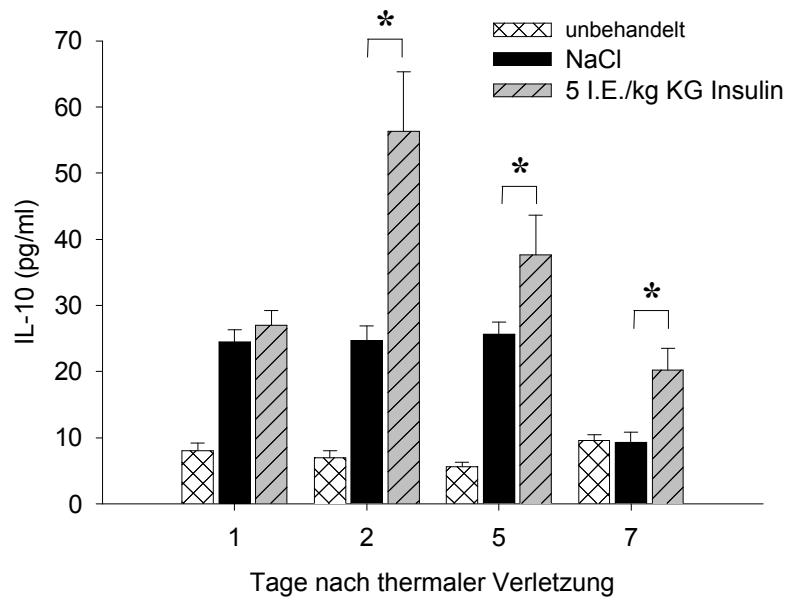


Abb. 21: Proteinkonzentration von IL-10 im Serum mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

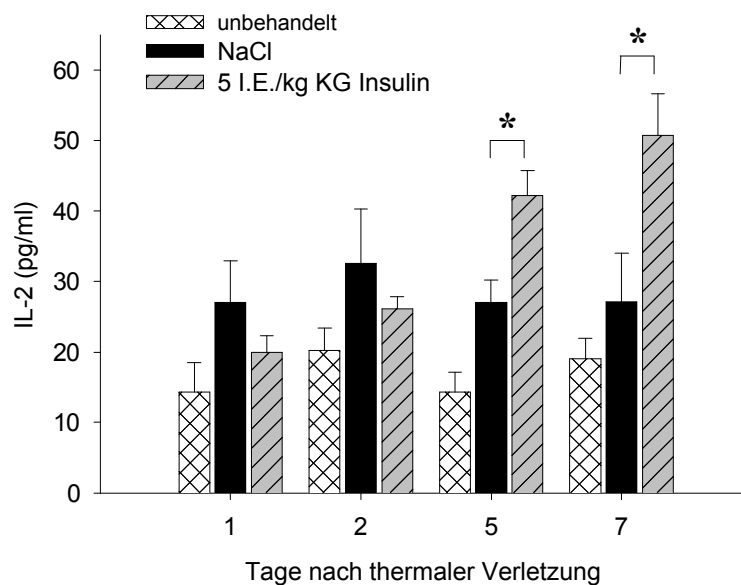


Abb. 22: Proteinkonzentration von IL-2 im Serum mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

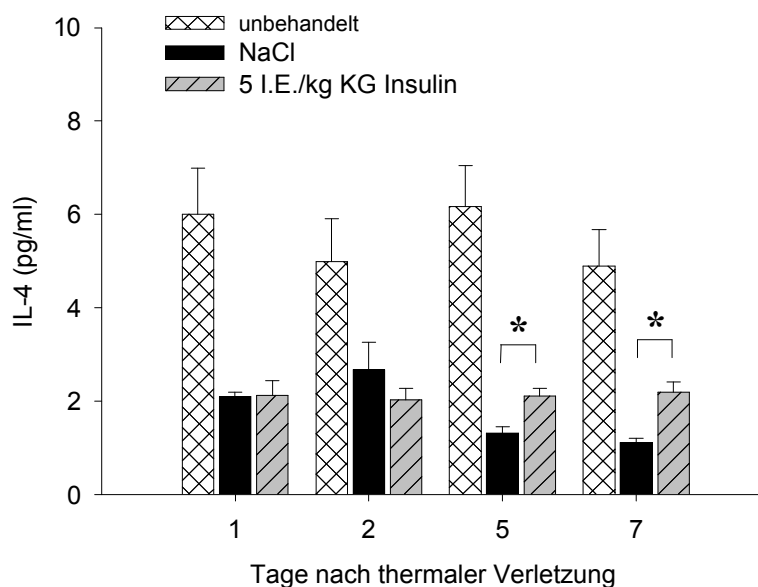


Abb. 23: Proteinkonzentration von IL-4 im Serum mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.2.1.8. Bestimmung der hepatischen mRNA anti-inflammatorischer Zytokine

Die Expression der hepatischen Konzentration von IL-2 ist entgegengesetzt zu den pro-inflammatorischen Zytokinen. Nach einer thermalen Verletzung ist die Konzentration von IL-2 in der Leber im Vergleich zu den unbehandelten Tieren vermindert. Insulin erhöht die hepatische Konzentration der mRNA von IL-2 signifikant an Tag 1 und 2 nach dem Trauma gegenüber der NaCl-Gruppe; $P < 0,05$ (Abb. 24). Die Expression der hepatischen Konzentration von IL-10 verhält sich nach einer thermalen Verletzung im Vergleich zu den Normalwerten etwas anders. Nach einem Trauma ist der Level der Konzentration von IL-10 in der Leber annähernd dem der Normalgruppe. Insulin erhöht die Konzentration der hepatischen mRNA von IL-10 signifikant an Tag 2 nach dem Trauma gegenüber den Tieren, die mit NaCl behandelt wurden; $P < 0,05$ (Abb. 25). Auf die Expression der hepatischen mRNA von IL-4 und IFN- γ konnte nach einer thermalen Verletzung durch Insulin kein Effekt beobachtet werden.

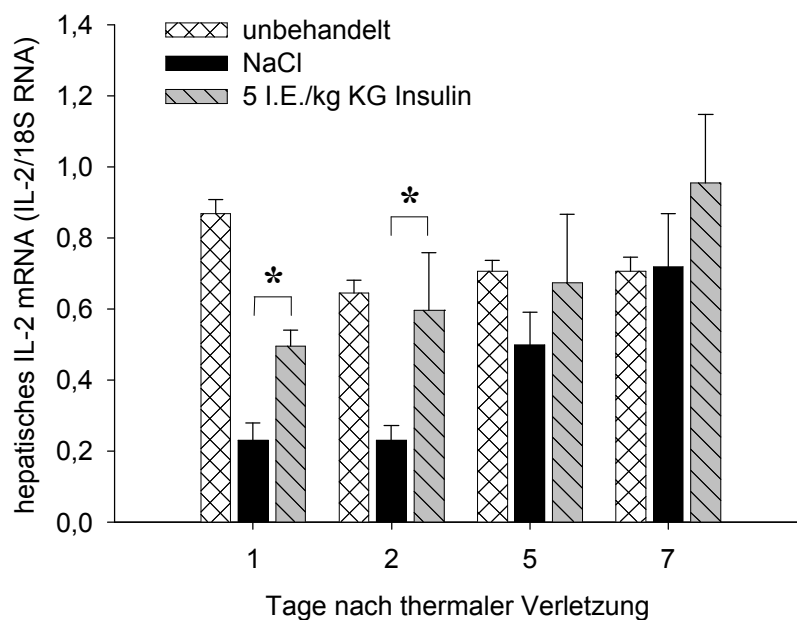


Abb. 24: hepatische mRNA Konzentration von IL-2 mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, P<0,05)

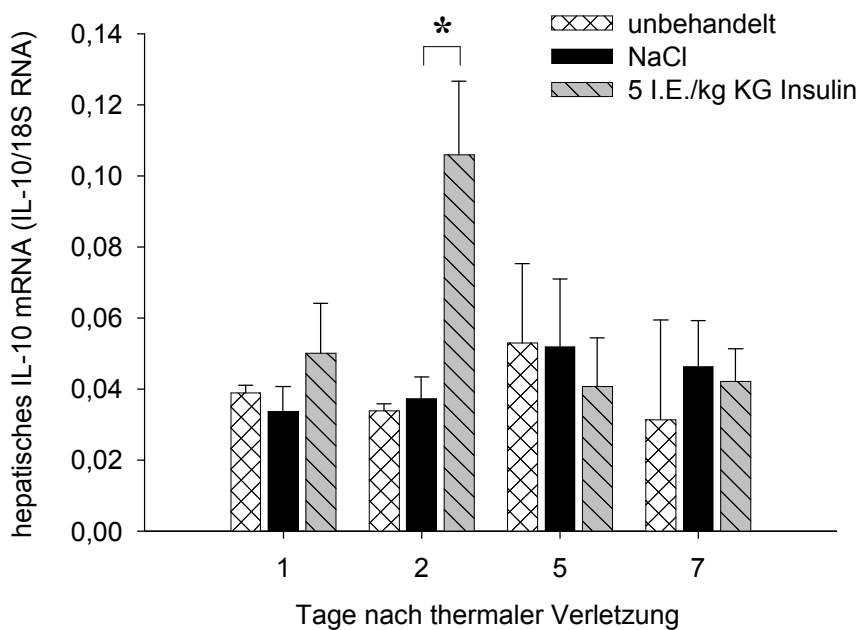


Abb. 25: hepatische mRNA Konzentration von IL-10 mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, P<0,05)

4.2.1.9. Bestimmung hepatischer anti-inflammatorischer Zytokine

Auch die Proteinkonzentrationen hepatischer anti-inflammatorischer Zytokine sind nach einer thermalen Verletzung erhöht. Der IL-2-Level in der Leber ist nach einem Trauma höher als das der Normalgruppe. Insulin erhöht die IL-2-Konzentration in der Leber signifikant an Tag 1 und 2 nach einer thermalen Verletzung gegenüber der NaCl-Gruppe; $P < 0,05$ (Abb. 26). Zu einem späteren Zeitpunkt der Studie ist kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen feststellbar. Ein ähnlicher Effekt war für das anti-inflammatorische Zytokin IL-4 zu verzeichnen. Nach einer thermalen Verletzung war die hepatische Konzentration von IL-4 gegenüber den unbehandelten Tieren erhöht. Durch eine Insulinapplikation konnte die Konzentration von IL-4 in der Leber im Vergleich zu den Tieren, die kein Insulin erhielten an Tag 1 und 2 nach dem Trauma erhöht werden; $P < 0,05$ (Abb. 27). Bei der hepatischen Konzentration von IL-10 war eine drastische Verminderung nach einer thermalen Verletzung gegenüber den Normalwerten zu beobachten. Insulin erhöht die hepatische IL-10-Konzentration signifikant an Tag 5 und 7 nach einem Trauma im Vergleich zur NaCl-Gruppe; $P < 0,05$ (Abb. 28).

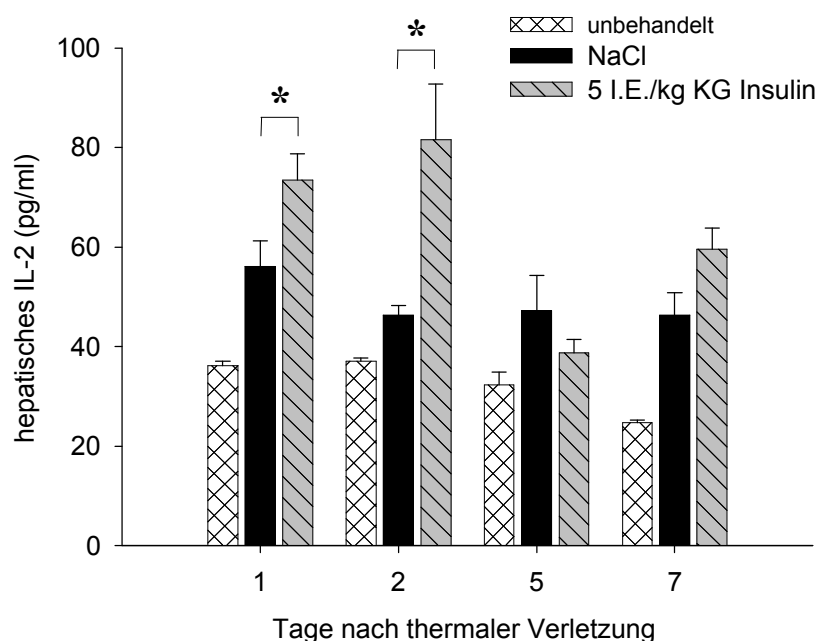


Abb. 26: hepatische Proteinkonzentration von IL-2 mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

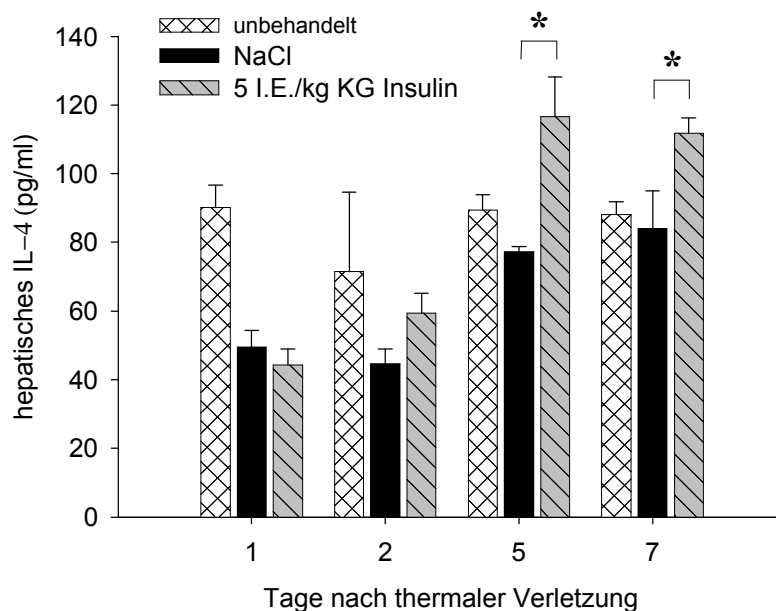


Abb. 27: hepatische Proteinkonzentration von IL-4 mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, P<0,05)

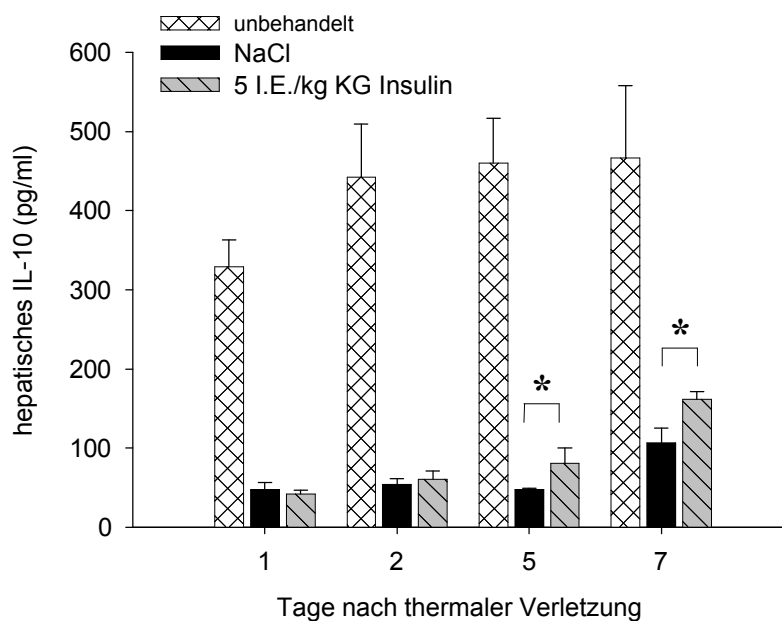


Abb. 28: hepatische Proteinkonzentration von IL-10 mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, P<0,05)

4.2.1.10. Bestimmung der hepatischen mRNA anti-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktoren

Die Expression anti-inflammatorischer Zytokine wird über die Expression anti-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktoren reguliert.

Die mRNA anti-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktoren verhalten sich entgegengesetzt zu pro-inflammatorischen Signaltranskriptionsfaktoren. Die hepatische mRNA von RANTES ist nach einer thermalen Verletzung vermindert. Insulin erhöht die mRNA-Expression von RANTES signifikant am Tag 7 nach dem Trauma; $P < 0,05$ (Abb. 29). Die hepatische mRNA von SOCS-3 ist zwar unmittelbar nach einer thermalen Verletzung erhöht, sinkt aber stark bis zum 7. Tag nach dem Trauma im Vergleich zur unbehandelten Gruppe ab. Insulin erhöht signifikant die mRNA-Expression von SOCS-3 an den Tagen 2, 5 und 7 nach der thermalen Verletzung im Vergleich zur Gruppe mit NaCl-Behandlung; $P < 0,05$ (Abb. 30).

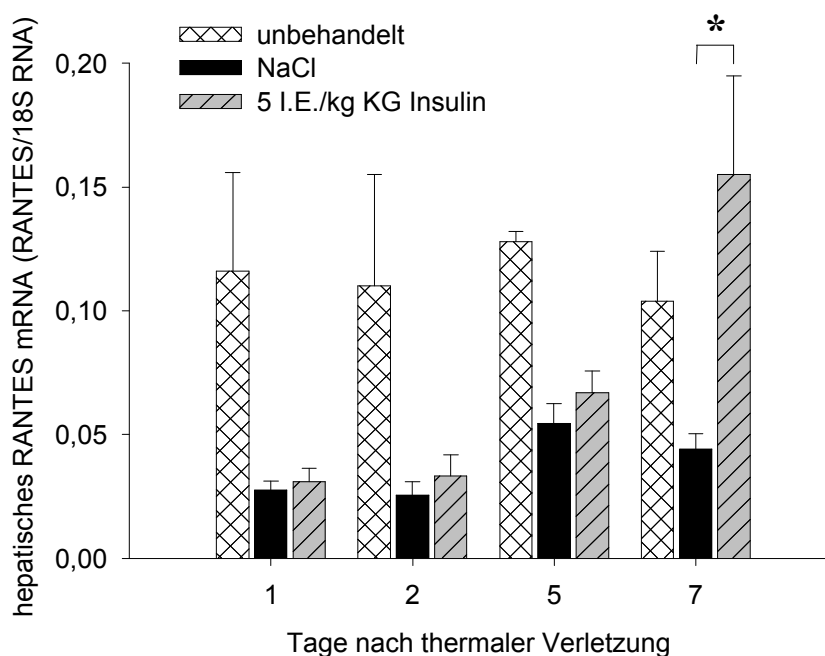


Abb. 29: hepatische mRNA von RANTES mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

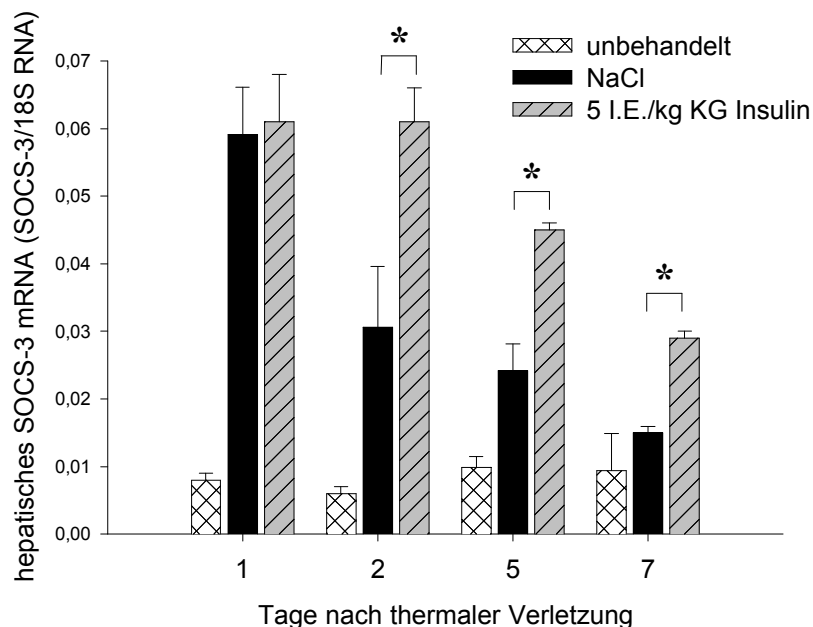


Abb. 30: hepatische mRNA von SOCS-3 mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.2.1.11. Bestimmung von Apoptosemarkern mittels WesternBlot

Für die Beurteilung der hepatischen Apoptose wurden Apoptosemarker, wie hepatische Caspase 3 und 9 und als anti-apoptotisch BCL-2 gemessen.

Die hepatische Caspase 3 ist nach einer thermalen Verletzung gegenüber den Normalwerten stark erhöht. Insulin vermindert signifikant das Level an hepatischer Caspase 3 gegenüber der NaCl-Gruppe am ersten Tag nach dem Trauma; $P < 0,05$ (Abb. 31). Ein ähnlicher Effekt ist auch bei der hepatischen Caspase 9 zu verzeichnen. Nach einer thermalen Verletzung ist die hepatische Caspase 9 gegenüber den Normalwerten erhöht. Durch eine Insulinapplikation wird die Caspase 9 in der Leber gegenüber den Tieren, die kein Insulin erhielten am ersten Tag nach der thermalen Verletzung vermindert; $P < 0,05$ (Abb. 32). Im Gegensatz dazu wird BCL-2 nach einem Trauma im Vergleich zu den Normalwerten vermindert. Insulin erhöht die Konzentration an hepatischem BCL-2 gegenüber den mit NaCl-behandelten Tieren signifikant an Tag 5 und 7 nach der thermalen Verletzung; $P < 0,08$ (Abb. 33).

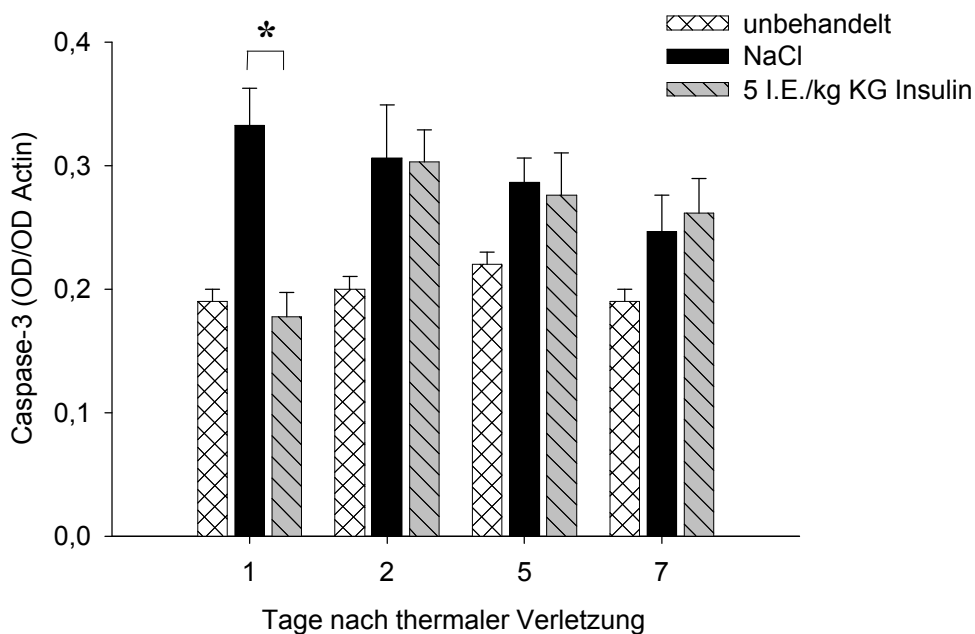


Abb. 31: Gehalt an Caspase 3 normiert zur optischen Dichte von Aktin mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

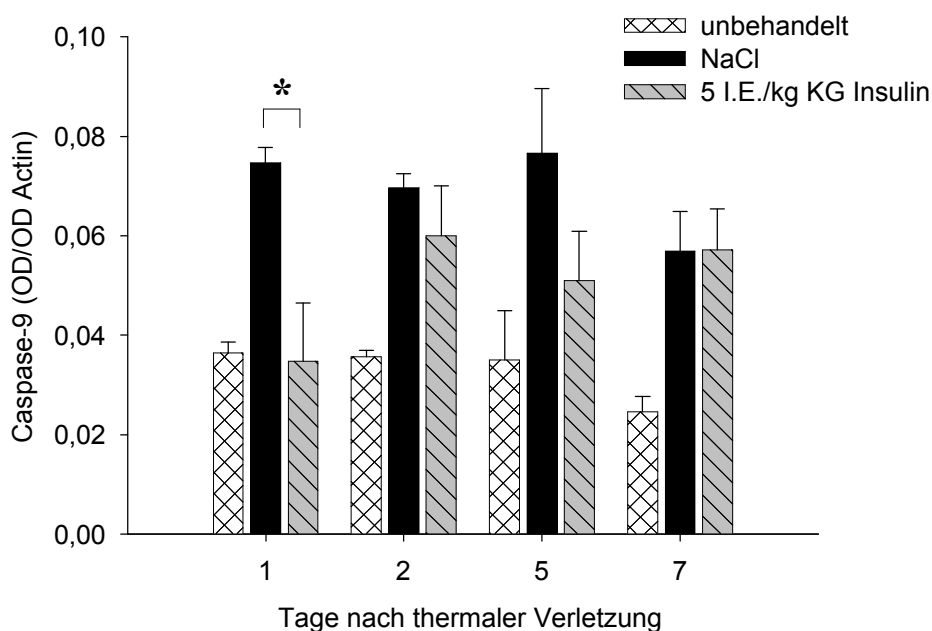


Abb. 32: Gehalt an Caspase 9 normiert zur optischen Dichte von Aktin mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

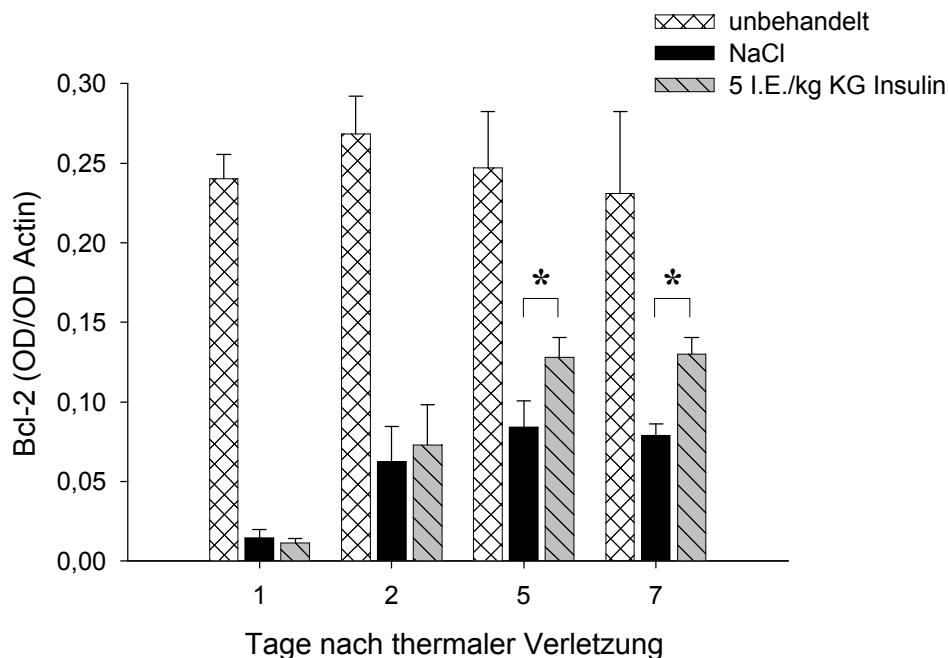


Abb. 33: Gehalt an Bcl-2 normiert zur optischen Dichte von Aktin mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit NaCl und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.2.2. *In vivo* Versuche mit LPS-Gabe

4.2.2.1. Bestimmung serumkonstitutiver und Akute-Phase-Proteine

Nach der Induktion einer Endotoxämie sind hepatische konstitutive Proteine, wie Albumin im Serum vermindert. Deren Level sind auch während der gesamten Studie erniedrigt. Insulin erhöht Serumalbumin an Tag 1, 2, 5 und 7 nach einer Sepsis im Vergleich zur LPS-Gruppe; $P < 0,05$ (Abb. 34). Im Gegensatz dazu werden Akute-Phase-Proteine, wie CRP nach einer Endotoxämie erhöht und deren Level bleibt auch erhöht über den gesamten Zeitraum der Studie. Insulin vermindert signifikant Serum-CRP an Tag 1, 2, 5 und 7 nach einer Sepsis im Vergleich zu der Gruppe, die nur NaCl erhielten; $P < 0,05$ (Abb. 35).

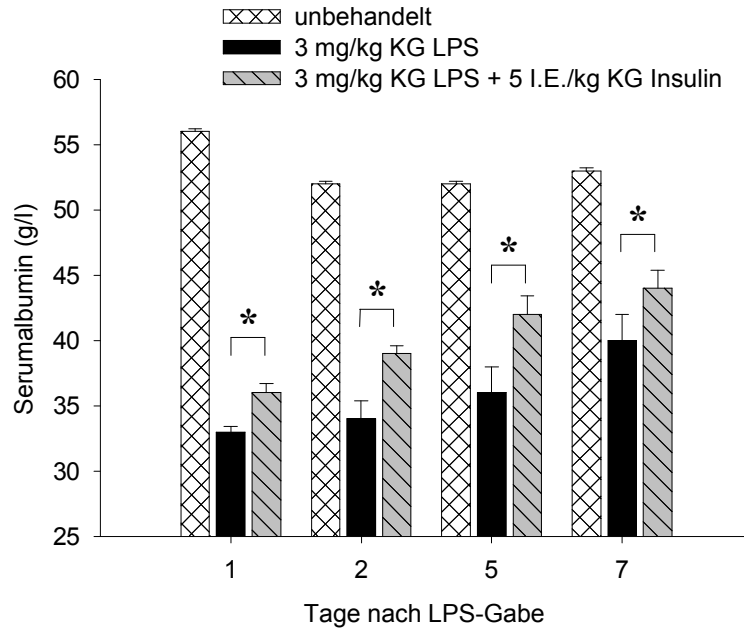


Abb. 34: Serumalbumin mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

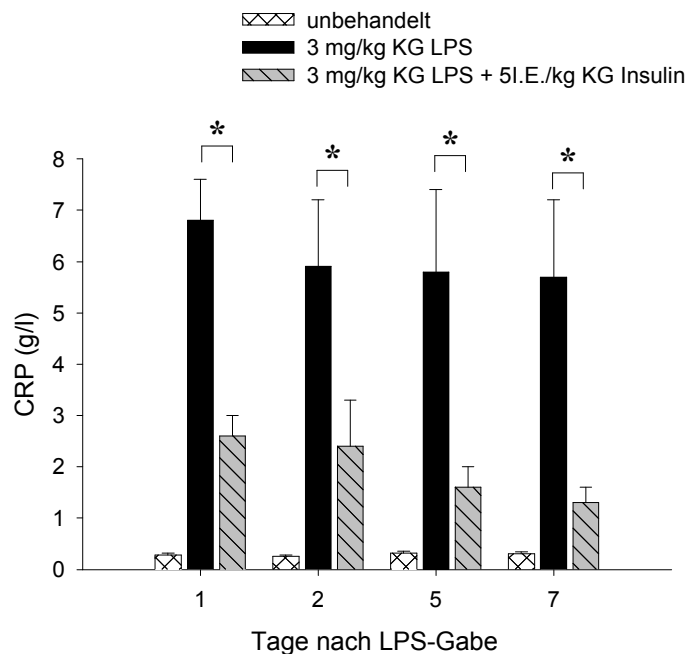


Abb. 35: Serum-CRP mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.2.2.2. Bestimmung pro-inflammatorischer Zytokine im Serum

Auch die pro-inflammatorischen Zytokine im Serum sind nach der Induktion einer Endotoxämie gegenüber den Normalwerten erhöht. So zu sehen bei der vermehrten Expression der Proteinkonzentration von IL-1 β nach einer Sepsisinduktion im Vergleich zu der von unbehandelten Tieren. Insulin verhindert die Erhöhung von IL-1 β im Serum signifikant an Tag 1, 2 und 5 nach der LPS-Gabe im Vergleich zur NaCl-Gruppe; $P < 0,05$ (Abb. 36). Ein ähnlicher Effekt ist auch bei TNF zu verzeichnen. Nach einer Endotoxämie ist der Level an TNF im Serum gegenüber den Normalwerten erhöht. Durch Insulin wird eine Verminderung von TNF im Serum zu allen Zeitpunkten der Studie im Vergleich zur NaCl-Gruppe hervorgerufen; $P < 0,05$ (Abb. 37).

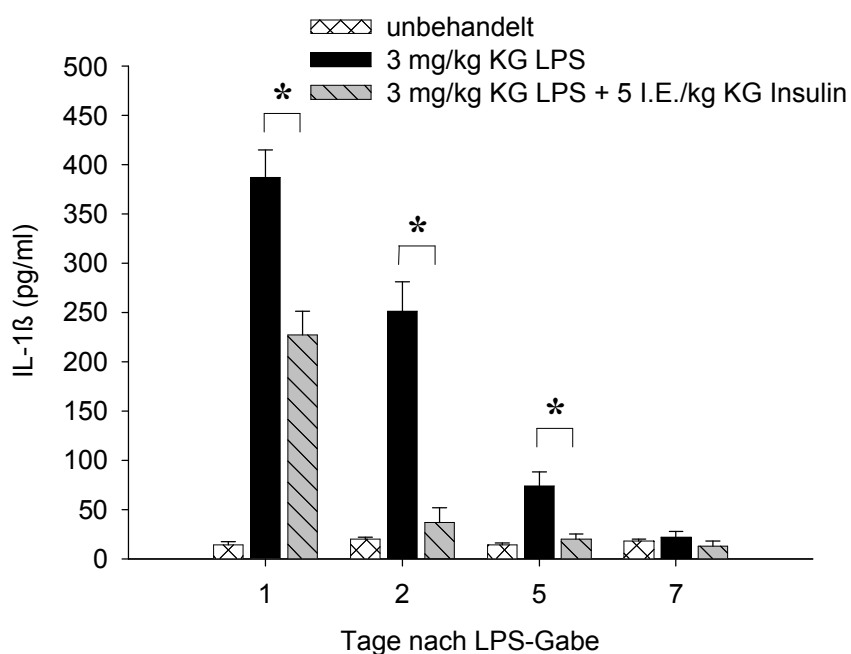


Abb. 36: Konzentration von IL-1 β im Serum mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4. Ergebnisse

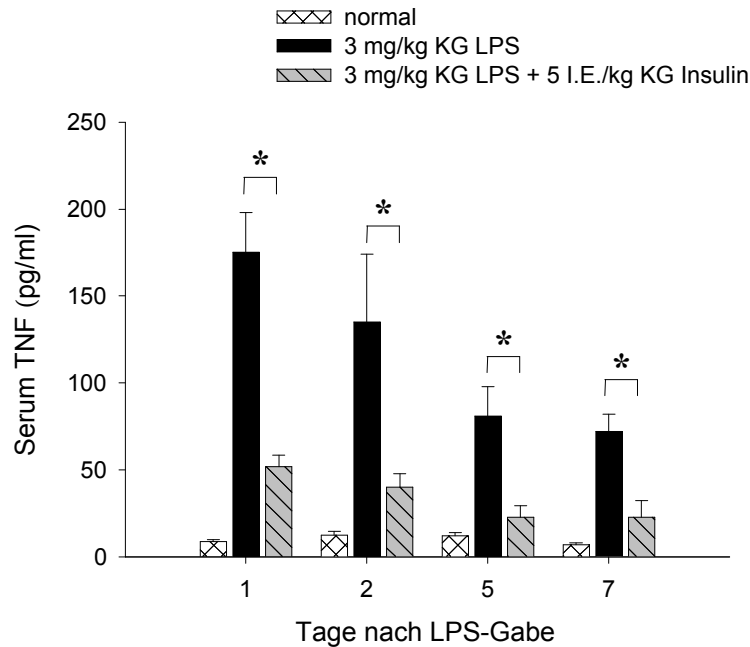


Abb. 37: Konzentration von TNF im Serum mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

In septischen Ratten ist die Expression von IL-6 im Serum gegenüber der von unbehandelten Tieren erhöht. Eine Insulinbehandlung führt zu einer signifikanten Reduzierung der IL-6-Expression an Tag 1, 2 und 7 im Vergleich zu den Tieren, die mit NaCl behandelt wurden; $P < 0,05$ (Abb. 38). Bei der Expression der Proteinkonzentration von MIF konnte kein so starker Effekt beobachtet werden. Die Proteinkonzentration von MIF ist nach der Induktion einer Endotoxämie gegenüber der Kontrollgruppe zwar erhöht, allerdings vermindert Insulin die Konzentration von MIF nur signifikant an Tag 2 und 7 im Vergleich zur NaCl-Gruppe; $P < 0,05$ (Abb. 39).

4. Ergebnisse

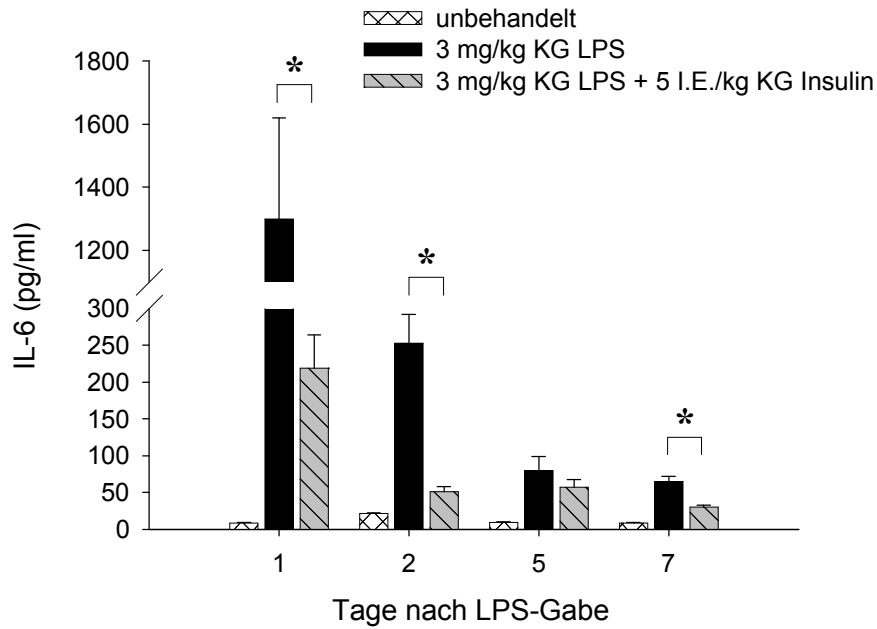


Abb. 38: Konzentration von IL-6 im Serum mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

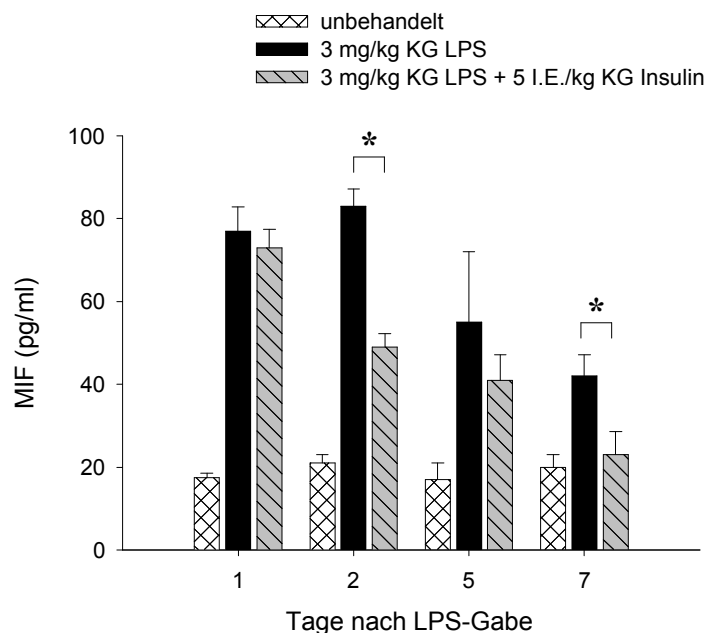


Abb. 39: Konzentration von MIF im Serum mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.2.2.3. Bestimmung der hepatischen mRNA pro-inflammatorischer Zytokine

Eine Endotoxämie erhöht die mRNA pro-inflammatorischer Zytokine in der Leber. So ist die Expression der hepatischen mRNA von IL-1 β nach einer LPS-Applikation gegenüber den Normalwerten erhöht. Insulin vermindert die hepatische mRNA-Konzentration von IL-1 β signifikant an Tag 1 und 2 im Vergleich zu den Tieren, die keine Insulinbehandlung erhielten; $P < 0,05$ (Abb. 40). Ein ähnlicher Effekt ist auch bei der Expression der hepatischen mRNA von IL-6 zu verzeichnen. Nach einer LPS-Gabe ist die mRNA-Konzentration in der Leber von IL-6 gegenüber den Normalwerten stark erhöht. Nach einer Insulinbehandlung ist die hepatische mRNA-Konzentration von IL-6 signifikant an den Tagen 2 und 7 im Vergleich zu den Tieren mit NaCl-Behandlung vermindert; $P < 0,05$ (Abb. 41). Nach der Induktion einer Endotoxämie ist auch bei MIF ein Anstieg der mRNA-Konzentration in der Leber zu beobachten. Insulin vermindert die mRNA-Konzentration von MIF in der Leber signifikant an den Tagen 5 und 7 nach einem Trauma gegenüber der NaCl-Gruppe; $P < 0,05$ (Abb. 42). Auf die Expression der hepatischen mRNA von TNF konnte nach einer Insulinbehandlung kein signifikanter Effekt im Vergleich zu den mit NaCl-behandelten Tieren beobachtet werden.

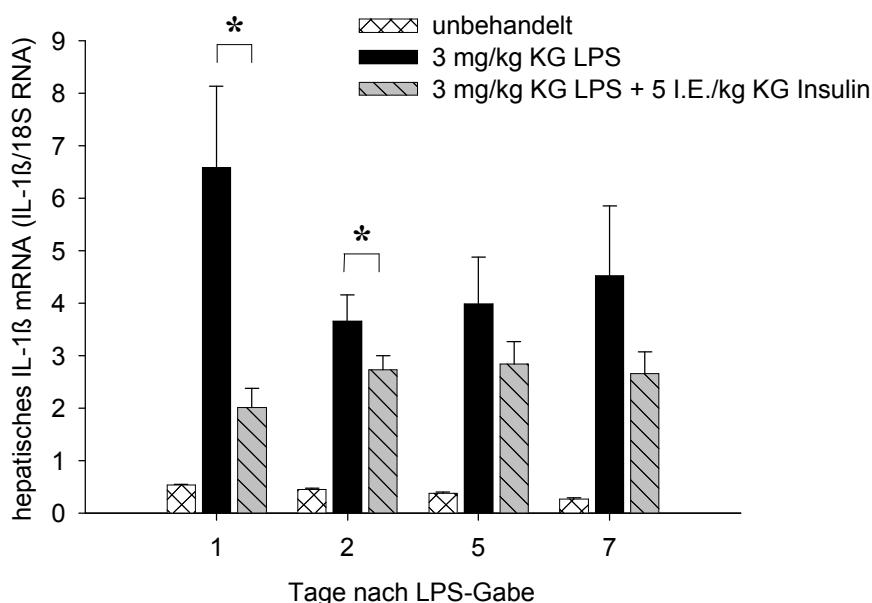


Abb. 40: hepatische mRNA-Konzentration von IL-1 β mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

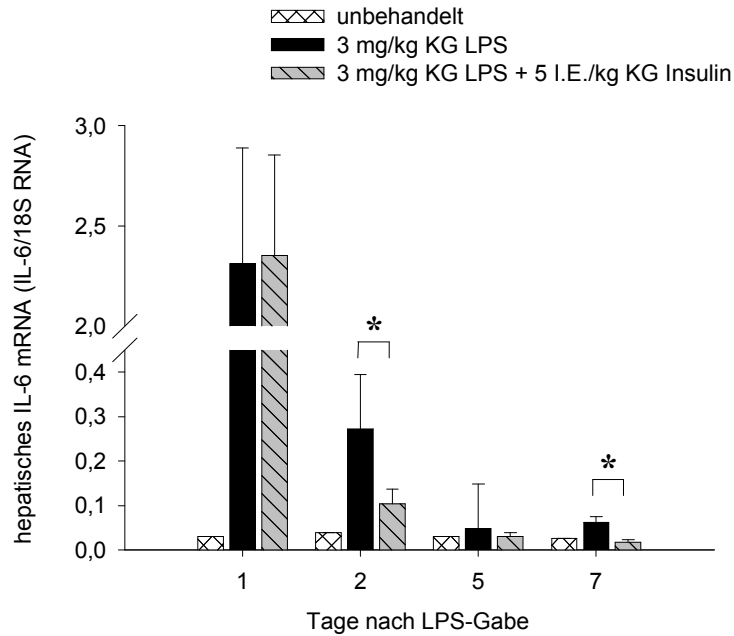


Abb. 41: hepatische mRNA-Konzentration von IL-6 mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

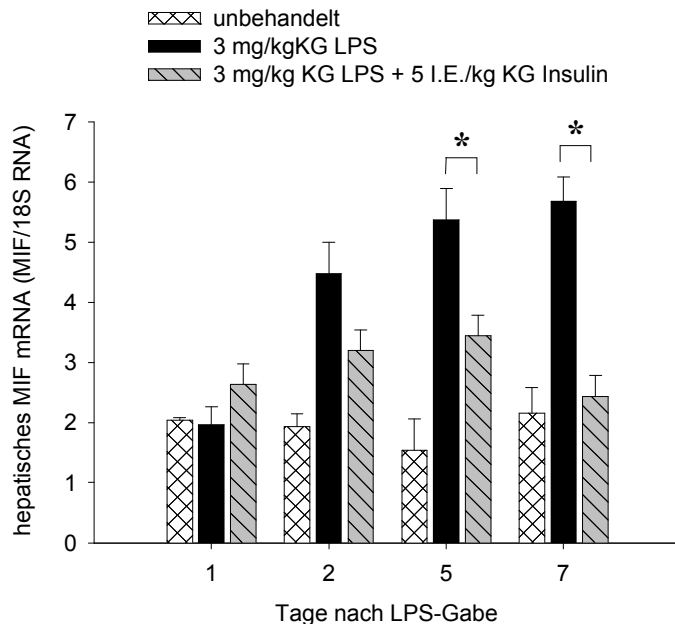


Abb. 42: hepatische mRNA-Konzentration von MIF mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.2.2.4. Bestimmung hepatischer pro-inflammatorischer Zytokine

Durch die Induktion einer Endotoxämie sind pro-inflammatorische Zytokine in der Leber gegenüber den Normalwerten erhöht. Dies zeigt sich auch bei der Expression der hepatischen Proteinkonzentration von IL-1 β . Nach einer LPS-Gabe ist IL-1 β in der Leber im Vergleich zur unbehandelten Gruppe vermehrt zu beobachten. Durch eine Insulinbehandlung sinkt das Level an hepatischem IL-1 β gegenüber der NaCl-Gruppe signifikant an Tag 2 und 5 nach der Sepsisinduktion; $P < 0,05$ (Abb. 43). Ein ähnlicher Effekt zeigt sich auch bei der Proteinkonzentration von TNF in der Leber. Durch eine Endotoxämie ist der Level an hepatischem TNF im Vergleich zu den Normalwerten erhöht. Insulin vermindert TNF in der Leber signifikant am ersten Tag nach der LPS-Gabe gegenüber der NaCl-Gruppe; $P < 0,05$ (Abb. 44).

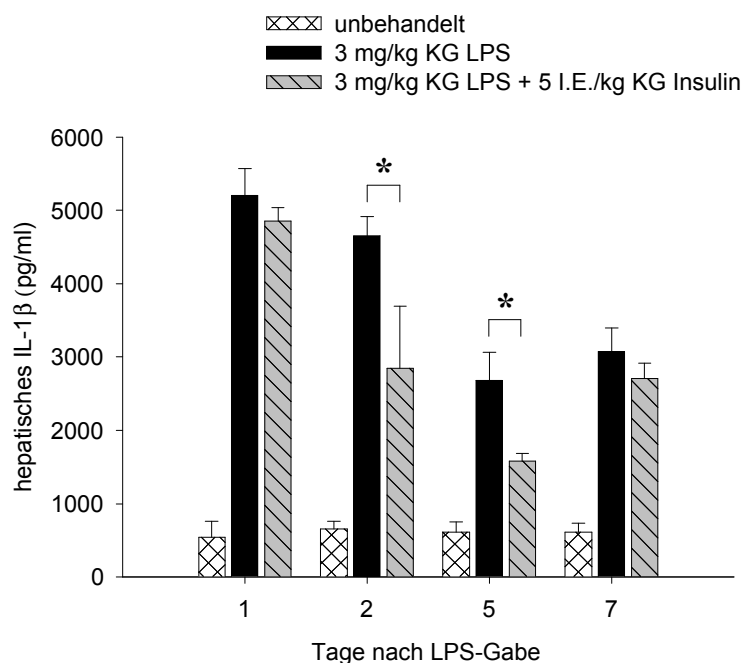


Abb. 43: Konzentration von IL-1 β in der Leber mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4. Ergebnisse

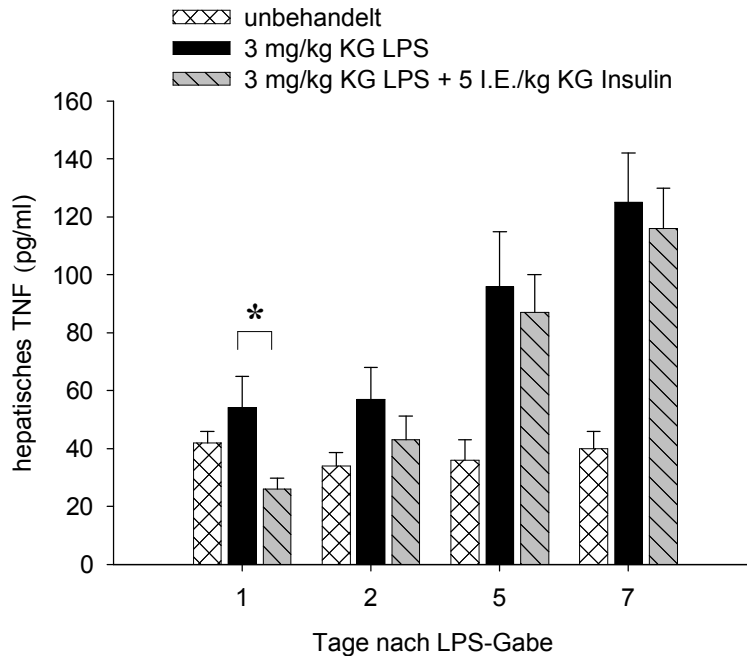


Abb. 44: Konzentration von TNF in der Leber mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

Zu einem späteren Zeitpunkt konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden. Auch die Proteinkonzentration von IL-6 steigt nach einer Sepsis in der Leber gegenüber der von unbehandelten Tieren an. Durch Insulin findet eine Verminderung der hepatischen IL-6 Konzentration an den Tagen 1 und 2 nach LPS-Applikation zu der mit NaCl behandelten Tieren statt; $P < 0,05$ (Abb. 45). Eine Sepsisindikation erhöht auch die Proteinkonzentration von MIF in der Leber im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach einer Insulinbehandlung sinkt die hepatische Konzentration von MIF signifikant am 2. Tag nach Beginn der Homöostase gegenüber den Tieren, die eine NaCl-Applikation erhielten; $P < 0,05$ (Abb. 46).

4. Ergebnisse

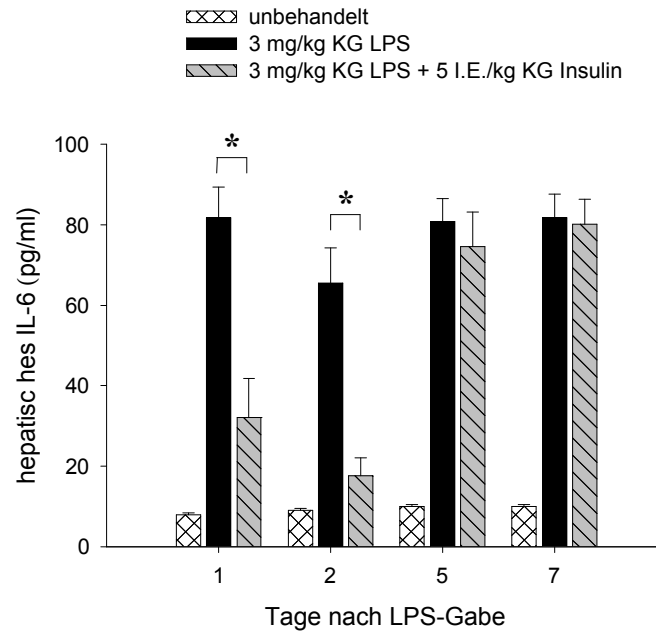


Abb. 45: Konzentration von IL-6 in der Leber mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

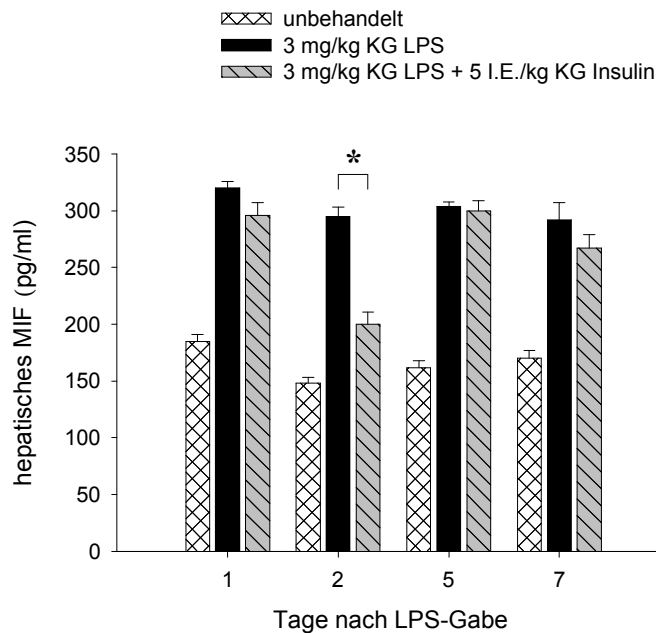


Abb. 46: Konzentration von MIF in der Leber mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.2.2.5. Bestimmung der hepatischen mRNA pro-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktoren

Die hepatische mRNA pro-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktoren verhält sich nach der Induktion einer Endotoxämie ähnlich der von pro-inflammatorischen Zytokinen. Nach einer LPS-Applikation ist die Konzentration der mRNA von C/EBP- β in der Leber deutlich gegenüber den Normalwerten erhöht. Insulin vermindert die hepatische mRNA-Konzentration von C/EBP- β signifikant an Tag 1, 2 und 5 nach LPS-Applikation im Vergleich zur NaCl-Gruppe; $P < 0,05$ (Abb. 47).

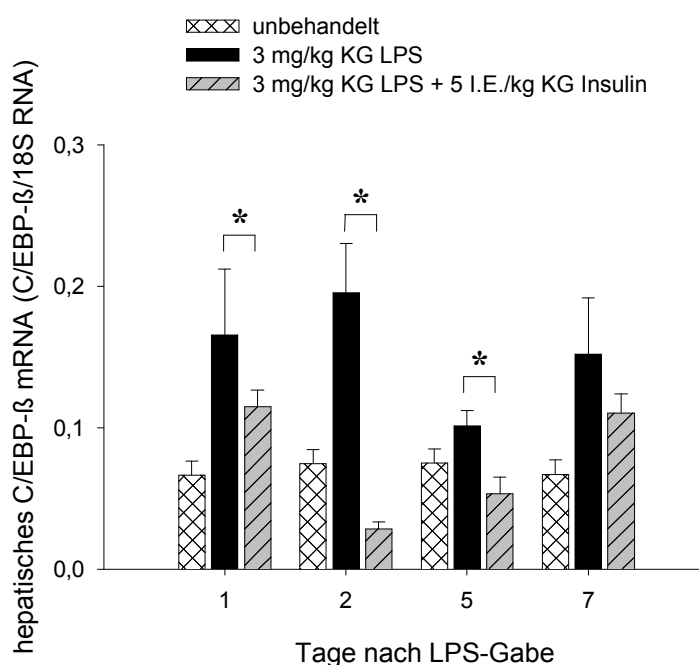


Abb. 47: hepatische mRNA-Konzentration von C/EBP- β mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

Deutlicher wird der Effekt bei der Expression der mRNA von STAT-3 in der Leber sichtbar. Eine Sepsis-Induktion führt zu einer drastischen Erhöhung des mRNA-Levels von STAT-3 an den ersten beiden Tagen gegenüber den Normalwerten. Nach einer Insulinbehandlung ist die mRNA-Konzentration von STAT-3 in der Leber im Vergleich zur NaCl-Gruppe signifikant an Tag 1, 2 und 5 nach der LPS-Gabe vermindert; $P < 0,05$ (Abb. 48). Ein ähnliches Ergebnis wurde auch bei der mRNA-

4. Ergebnisse

Konzentration von STAT-5 erzielt. Nach einer LPS-Gabe findet eine vermehrte Expression der hepatischen mRNA von STAT-5 statt. Durch eine Insulinbehandlung konnte der mRNA-Level von STAT-5 in der Leber signifikant gegenüber der NaCl-Gruppe an Tag 1, 2, 5 und 7 nach der Sepsisinduktion gesenkt werden; $P < 0,05$ (Abb. 49).

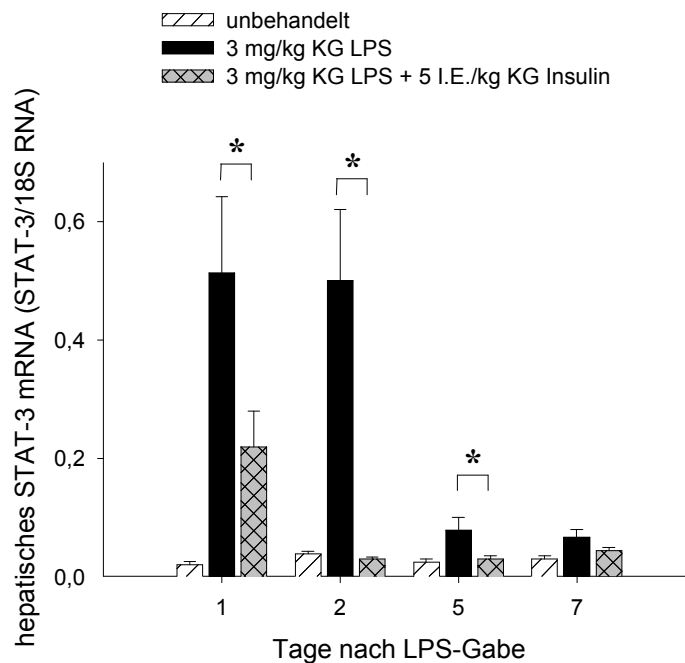


Abb. 48: hepatische mRNA-Konzentration von STAT-3 mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

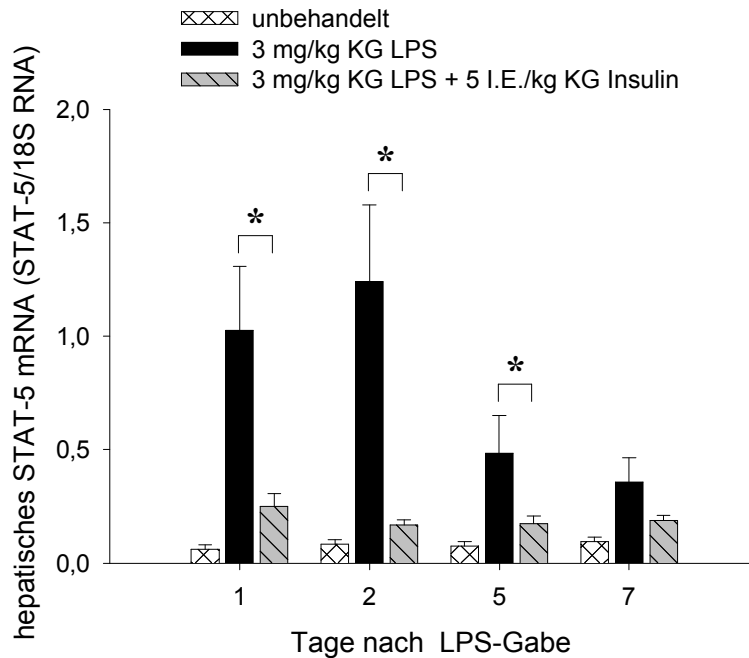


Abb. 49: hepatische mRNA-Konzentration von STAT-5 mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.2.2.6. Bestimmung anti-inflammatorischer Zytokine im Serum

Nach einer Endotoxämie sind anti-inflammatorische Zytokine im Serum gegenüber den Normalwerten erhöht. Als Indikatoren der systemischen Homöostase wurden die anti-inflammatorischen Proteinkonzentrationen von IL-10, IL-2 und IL-4 gemessen. Der Level der Konzentration von IL-10 im Serum ist nach einer Sepsis gegenüber unbehandelten Tieren erhöht. Insulin erhöht die Proteinkonzentration von IL-10 im Serum signifikant am ersten Tag nach der LPS-Gabe im Vergleich zu den Tieren, die mit NaCl behandelt wurden; $P < 0,05$ (Abb. 50). Zu einem späteren Zeitpunkt während der Studie konnte kein signifikanter Einfluss von Insulin auf IL-10 festgestellt werden. Die Induktion einer Endotoxämie erhöht auch die Proteinkonzentrationen von IL-2 und IL-4 im Serum gegenüber der Kontrollgruppe. Allerdings wurde kein signifikanter Effekt von Insulin bei beiden Zytokinen im Vergleich zur NaCl-Gruppe beobachtet.

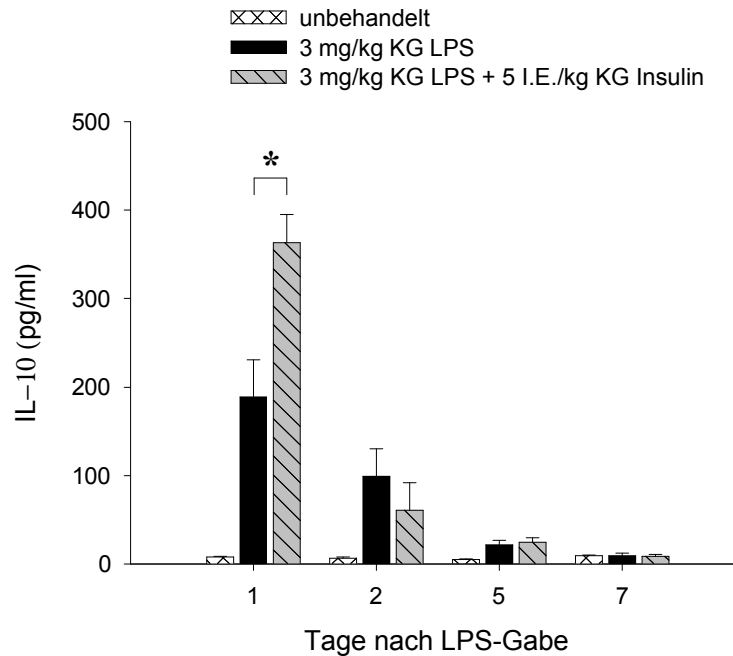


Abb. 50: Konzentration von IL-10 im Serum mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.2.2.7. Bestimmung der hepatischen mRNA anti-inflammatorischer Zytokine

Die Expression der mRNA anti-inflammatorischer Zytokine in der Leber nach einer Sepsis ist deutlich gegenüber den Normalwerten erhöht. So ist die mRNA-Konzentration von IL-10 in der Leber während einer Endotoxämie höher als die Konzentration bei unbehandelten Tieren. Insulin erhöht die hepatische mRNA-Konzentration von IL-10 signifikant am ersten Tag nach der Sepsis-Induktion gegenüber den Tieren, die mit NaCl behandelt wurden; $P < 0,05$ (Abb. 51). Auf die Expression der mRNA-Konzentration von IFN- γ und IL-4 konnte nach einer Insulinapplikation kein signifikanter Unterschied zu den mit NaCl-behandelten Tieren gesehen werden.

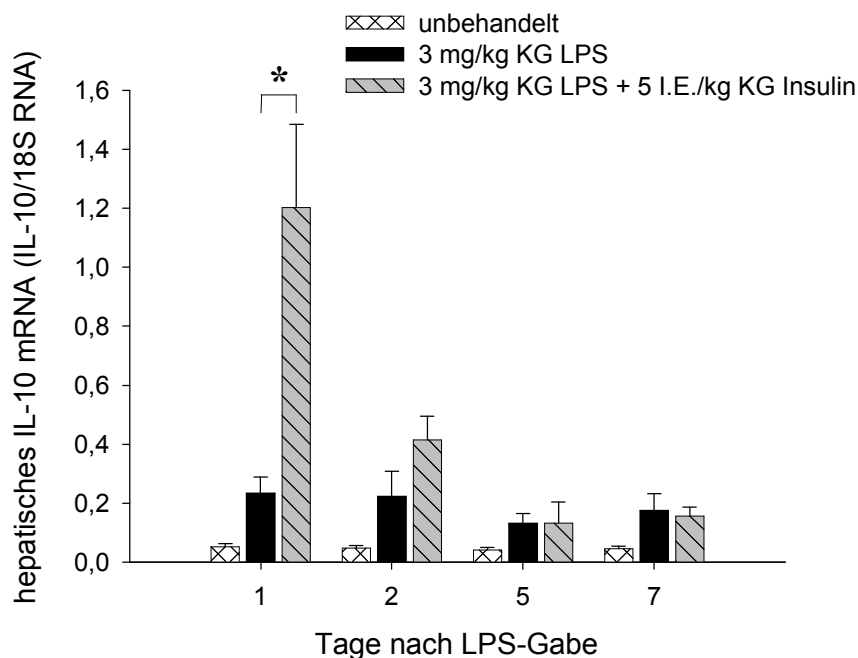


Abb. 51: hepatische mRNA-Konzentration von IL-10 mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.2.2.8. Bestimmung hepatischer anti-inflammatorischer Zytokine

Die Expression der hepatischen Proteinkonzentration von IL-10 ist nach der Induktion einer Endotoxämie in etwa der von unbehandelten Tieren. Nach einer Insulinbehandlung wird das Level von IL-10 in der Leber gegenüber der NaCl-Gruppe signifikant an Tag 2 und 5 nach der LPS-Gabe gesteigert; $P < 0,05$ (Abb. 52). Die hepatische Konzentration von IL-4 ist nach einer Sepsisinduktion gegenüber den Normalwerten vermindert. Insulin erhöht die Proteinkonzentration von IL-4 in der Leber signifikant am 7. Tag nach der LPS-Gabe im Vergleich zu den Tieren, die mit NaCl behandelt wurden; $P < 0,05$ (Abb. 53). Bei der Expression der Konzentration von IL-2 in der Leber nach einer Homöostase konnte kein signifikanter Unterschied zur NaCl-Gruppe festgestellt werden.

4. Ergebnisse

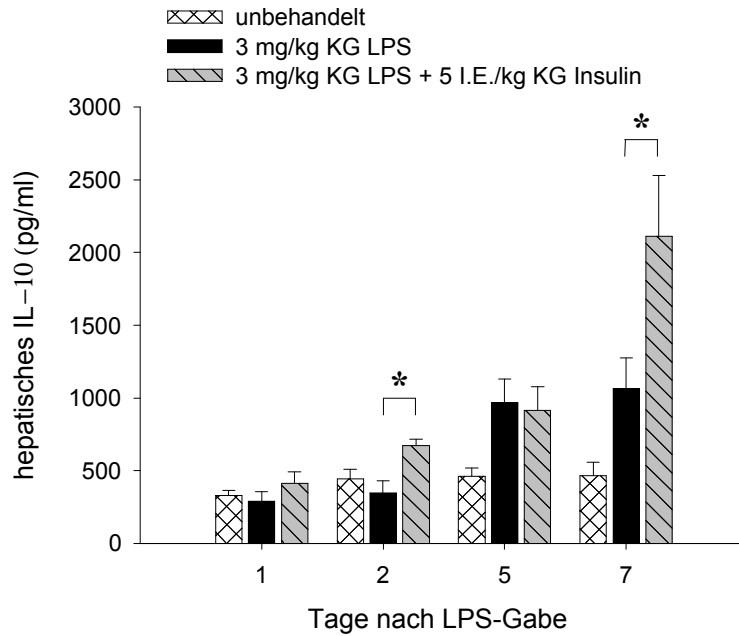


Abb. 52: hepatische Konzentration von IL-10 mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

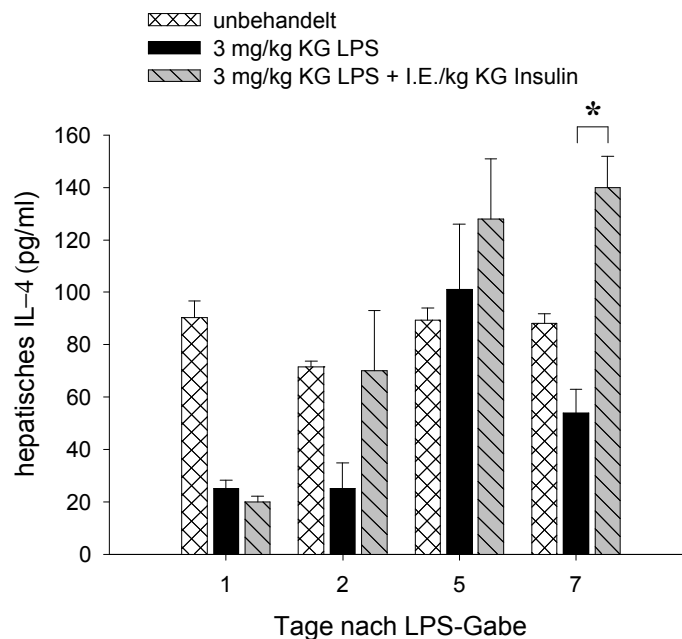


Abb. 53: hepatische Konzentration von IL-4 mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4. Ergebnisse

4.2.2.9. Bestimmung der hepatischen mRNA anti-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktoren

Die hepatische mRNA von RANTES, als Vertreter der anti-inflammatorischen Signaltranskriptionsfaktoren, wird nach der Induktion einer Endotoxämie gegenüber den Normalwerten erhöht. Nach einer Insulinbehandlung ist die Konzentration der mRNA von RANTES in der Leber signifikant an Tag 2 und 5 im Vergleich zur NaCl-Gruppe vermindert; $P < 0,05$ (Abb. 54). Auch bei der Expression der hepatischen mRNA-Konzentration von SOCS-3 ist nach einer LPS-Gabe ein Anstieg zu verzeichnen. Insulin erhöht das Level an hepatischer mRNA von SOCS-3 signifikant an den Tagen 5 und 7 nach einer LPS-Induktion gegenüber dem der Tiere mit NaCl-Behandlung; $P < 0,05$ (Abb. 55).

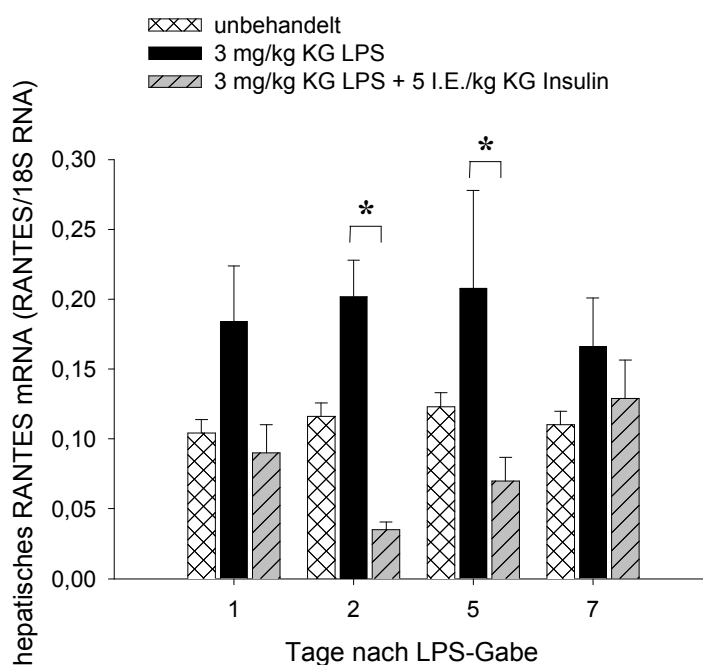


Abb. 54: mRNA-Konzentration von RANTES in der Leber mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

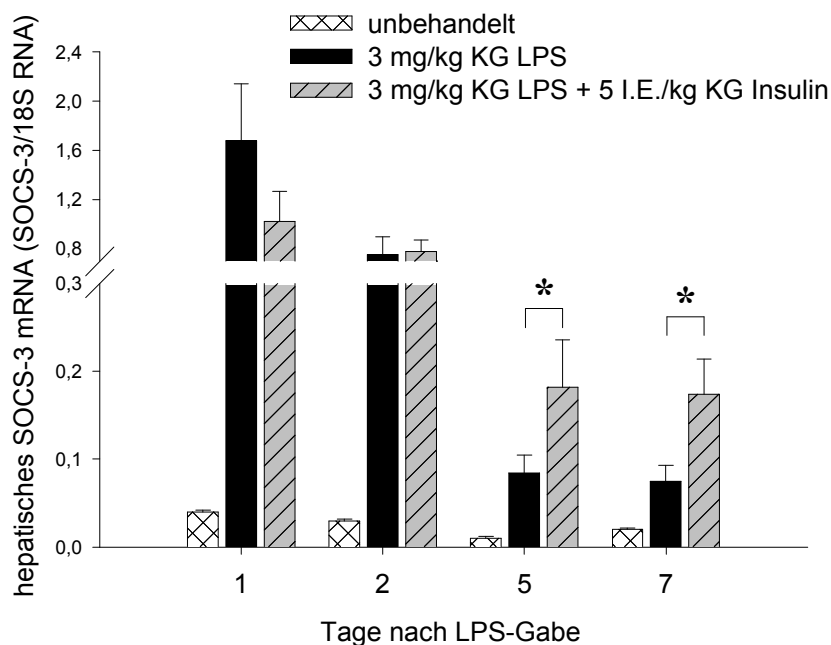


Abb. 55: mRNA-Konzentration von SOCS-3 in der Leber mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach einer Endotoxämie normiert zu 18S (Mittelwert \pm SEM, n = 6, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.2.2.10. Bestimmung von Apoptosemarkern mittels WesternBlot

Für die Beurteilung der hepatischen Apoptose nach der Induktion einer Sepsis wurden Apoptosemarker, wie hepatische Caspase 3 und 9 und als anti-apoptotisch Bcl-2 gemessen.

Nach der Induktion einer Endotoxämie konnte beobachtet werden, dass die hepatische Proteinexpression von Caspase-3 gegenüber der von unbehandelten Tieren drastisch erhöht ist. Insulin verhindert die Erhöhung der Proteinkonzentration von Caspase-3 in der Leber an Tag 1 und 2 nach der LPS-Injektion im Vergleich zur NaCl-Gruppe; $P < 0,05$ (Abb. 56). Auch die hepatische Konzentration von Caspase-9 ist nach der Induktion einer Endotoxämie im Vergleich zur Konzentration unbehandelter Tiere erhöht. Durch eine Insulinbehandlung konnte kein signifikanter Unterschied auf die Konzentration von Caspase 9 gegenüber der NaCl-Gruppe festgestellt werden.

4. Ergebnisse

BCL-2 hingegen ist erst ab dem 7. Tag nach einer Endotoxämie im Vergleich zu den Normalwerten erhöht. Insulin erhöht signifikant an Tag 2 und 5 die Proteinexpression von BCL-2 gegenüber der mit NaCl behandelten Tiere; $P < 0,05$ (Abb. 57).

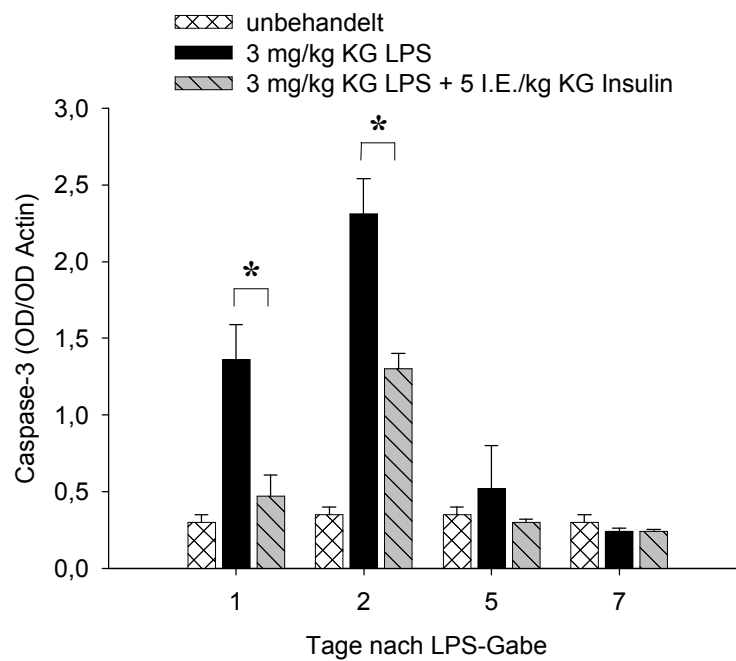


Abb. 56: Gehalt an Caspase 3 normiert zur optischen Dichte von Aktin mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach der Induktion einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

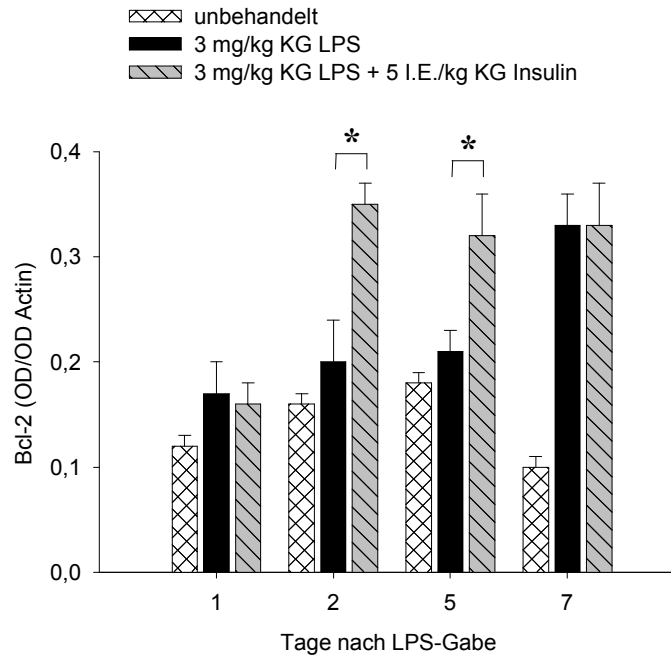


Abb. 57: Gehalt an Bcl-2 normiert zur optischen Dichte von Aktin mit und ohne Insulinbehandlung im Vergleich zu unbehandelten Tieren nach der Induktion einer Endotoxämie (Mittelwert \pm SEM, $n = 6$, * = signifikanter Unterschied zwischen Ratten mit Sepsis und Ratten mit Insulin, $P < 0,05$)

4.3. Versuche mit humanem Serum

4.3.1. Patientendaten

In die Studie waren insgesamt 28 Kinder eingeschlossen.

Auf die Länge des Krankenhausaufenthaltes hatte die Gabe von Insulin keinen signifikanten Einfluss. Die Sepsisdauer betrug in beiden Gruppen 20 Tage, somit hatte Insulin keinen signifikanten Effekt auf die Inzidenz einer Sepsis. Auch auf die Mortalität war durch eine Insulinbehandlung kein signifikanter Effekt zu verzeichnen. Die notwendige exogene Albumingabe war in der Insulingruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert.

4. Ergebnisse

Tabelle 4: Patientendaten (Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben)

	Insulingruppe	Kontrollgruppe	p
Anzahl	13	15	
Alter (Jahre)	6,7 \pm 3,7	4,3 \pm 3,9	0,1
Geschlecht (w/m)	5/8	6/9	
TBSA (%)	57 \pm 15	63 \pm 19	0,4
3. gradige Verbrennung (%)	44 \pm 23	54 \pm 22	0,3
Krankenhausaufenthalt (Tage)	40 \pm 17	47 \pm 37	0,5
Sepsis (%)	50	62	0,5
Sepsisdauer (Tage)	20 \pm 11	20 \pm 10	0,8
Mortalität	8	7	0,8
Gesamtkörperoberfläche (m ²)	1,0 \pm 0,5	0,7 \pm 0,3	0,03
verbrannte Körperoberfläche (m ²)	0,52 \pm 0,24	0,43 \pm 0,19	0,2
Albumingabe gesamt (g)	89 \pm 67	170 \pm 104	0,03
Albumingabe pro Tag (g)	2,1 \pm 1,7	4,9 \pm 3,9	0,04
Albumingabe/verbrannte Fläche (g/m ²)	125 \pm 96	271 \pm 167	0,01

4. Ergebnisse

4.3.2. Bestimmung Akute-Phase-Proteine

Der Normalwert für CRP beträgt < 5 mg/dl. Nach einer thermalen Verletzung ist die Konzentration von CRP im Serum zu allen Zeitpunkten der Studie erhöht. Durch eine Insulinbehandlung kann die Konzentration von CRP signifikant an den Tagen 5, 10, 20, 30 und 40 nach dem Trauma im Vergleich zu der Konzentration unbehandelter Kinder gesenkt werden; $P < 0,05$ (Abb. 58).

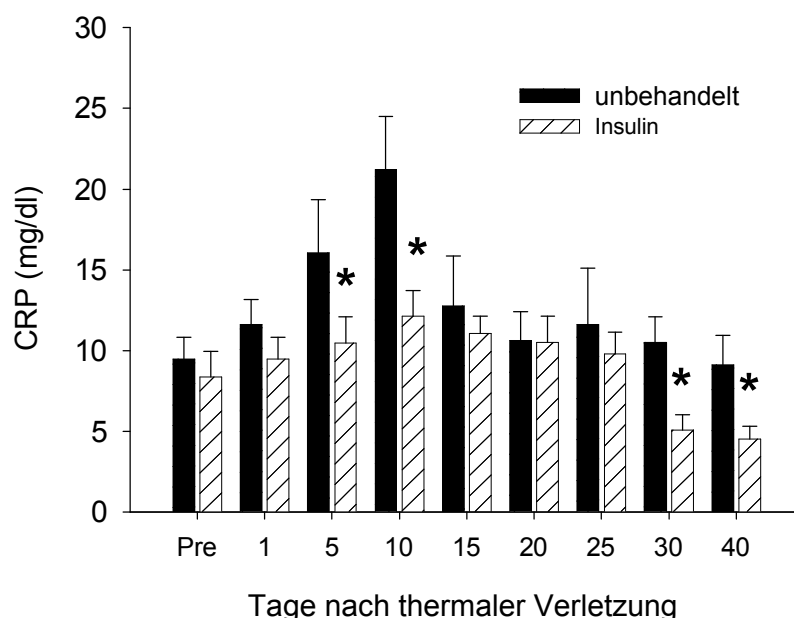


Abb. 58: Konzentration von CRP im Serum mit und ohne Insulinbehandlung nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, $n = 13$, * = signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten Kindern und Kindern mit Insulin, $P < 0,05$)

4.3.3. Bestimmung pro-inflammatorischer Zytokine im Serum

Der Normalwert für IL-1 β im Serum beträgt bei Kindern ohne Verbrennungsverletzung 0 – 2 pg/ml. Die Proteinkonzentration von IL-1 β im Serum nach einem Trauma war bei beiden Gruppen gegenüber den Normalwerten über den gesamten Zeitraum der Studie erhöht. Insulin vermindert die Proteinkonzentration

4. Ergebnisse

von IL-1 β im Serum signifikant am 30. Tag nach der thermalen Verletzung im Vergleich zu der Gruppe, die kein Insulin appliziert bekam, $P < 0,05$ (Abb. 59)

Bei Kindern ohne Verbrennungstrauma beträgt der Normalwert für TNF ebenfalls 0 – 2 pg/ml. Auch die Proteinkonzentration von TNF im Serum ist nach einem Verbrennungstrauma erhöht. Durch eine Insulinbehandlung konnte eine signifikante Verminderung an Tag 30 nach dem Trauma von TNF im Serum im Vergleich zur unbehandelten Gruppe erzielt werden, $P < 0,05$ (Abb. 60).

Auf die Proteinkonzentration von IL-6 im Serum konnte durch Insulin gegenüber der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

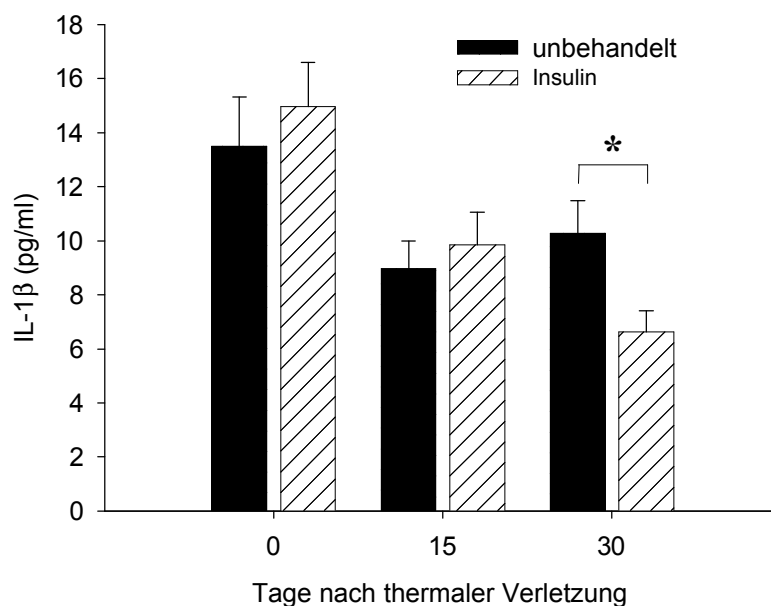


Abb. 59: Proteinkonzentration von IL-1 β im Serum mit und ohne Insulinbehandlung nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, $n = 13$, * = signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten Kindern und Kindern mit Insulin, $P < 0,05$)

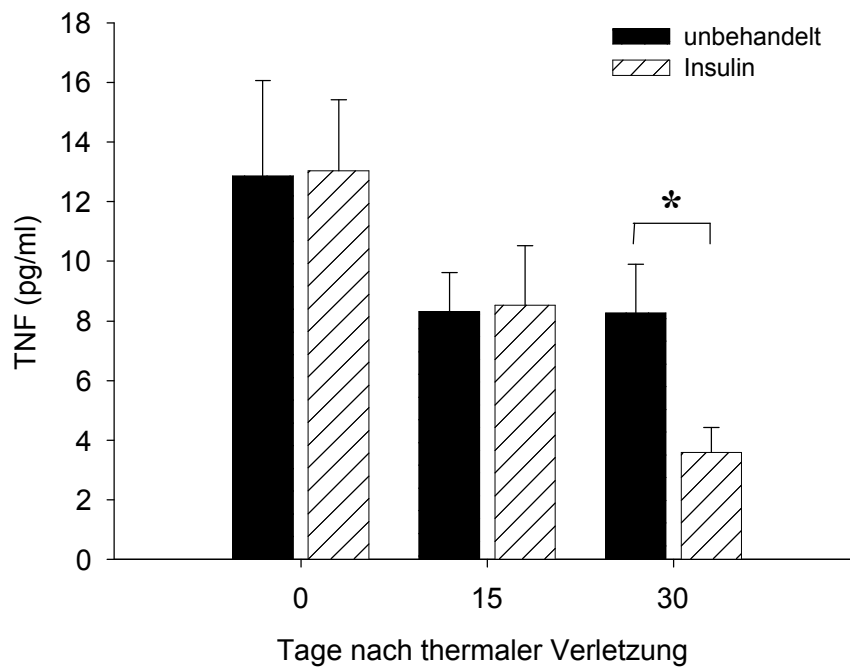


Abb. 60: Proteinkonzentration von TNF im Serum mit und ohne Insulinbehandlung nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, $n = 13$, * = signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten Kindern und Kindern mit Insulin, $P < 0,05$)

4.3.4. Bestimmung anti-inflammatorischer Zytokine im Serum

Der Normalwert von IL-10 im Serum beträgt bei Kindern ohne Verbrennungstrauma 0 – 15 pg/ml. Die Proteinkonzentration von IL-10 im Serum ist nach einer thermalen Verletzung über den gesamten Zeitraum der Studie erhöht. Durch eine Insulinbehandlung konnte eine signifikanter Erhöhung der Konzentration von IL-10 im Serum an Tag 15 nach dem Trauma gegenüber der Kontrollgruppe beobachtet werden; $P < 0,05$ (Abb. 61).

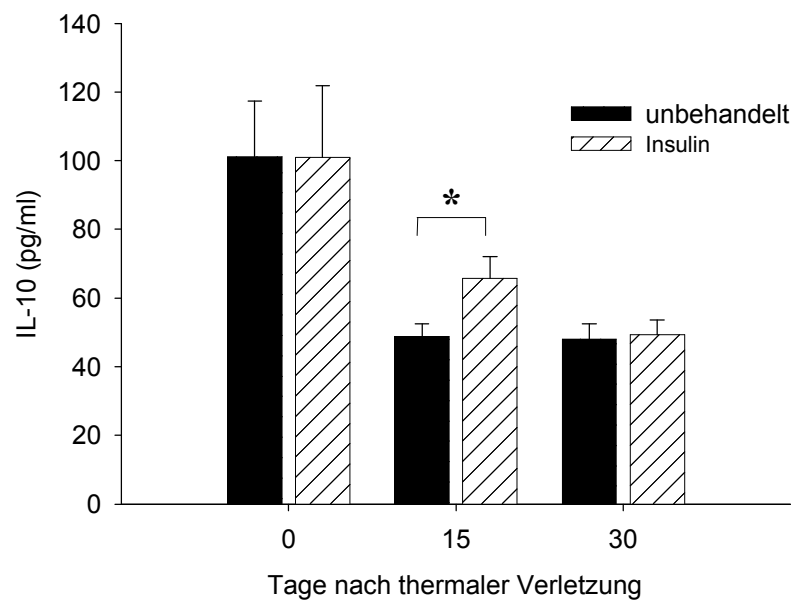


Abb. 61: Proteinkonzentration von IL-10 im Serum mit und ohne Insulinbehandlung nach einer thermalen Verletzung (Mittelwert \pm SEM, n = 13, * = signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten Kindern und Kindern mit Insulin, $P < 0,05$)

5. Diskussion

Die systemische Inflammation (*systemic inflammatory response syndrom* (SIRS)), die nach Schock, Trauma, Verbrennung und während einer Sepsis auftritt, verursacht massive Dysfunktionen des zellulären und humeralen Immunsystems. Die unkontrollierte Freisetzung von Zytokinen während der systemischen Inflammation führt zu Gewebeschäden, Organdysfunktionen und schliesslich zum Organversagen [40-43].

Charakteristisch für kritisch Kranke sind Hypermetabolismus und Katabolismus verbunden mit einem Proteinverlust und einer negativen Stickstoffbalance [4]. Dieser Hypermetabolismus beeinträchtigt Struktur und Funktion lebenswichtiger Organe wie Leber, Haut, periphere Muskulatur oder das Immunsystem [5]. Der Hypermetabolismus kann zur Ausbildung einer Infektion und dann zu einem septischen Krankheitsbild führen. Sepsis stellt heute immer noch eine Erkrankung mit hoher Letalität dar. Sepsis ist eine besonders schwerwiegende Erkrankung, bei der der Körper auf eine massive Infektion reagieren muss. Eine wichtige Rolle spielt die Entwicklung des Uni- oder Multiorganversagens. Das septische Krankheitsbild wird von einer hypermetabolischen Kaskade begleitet, die durch ein erhöhtes Herz-Zeit-Volumen, erhöhtem Sauerstoffverbrauch, beeinträchtigtes Immunsystem und einer gesteigerten Protein- und Fettkatabolie gekennzeichnet ist. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass dabei die Darm-Leber-Achse eine zentrale Rolle spielt [6].

Unter physiologischen Bedingungen werden von der Leber hauptsächlich konstitutive Proteine wie Albumin und Transferrin gebildet [7-10]. Nach einem Trauma bzw. einer Sepsis hingegen werden hauptsächlich Akute-Phase-Proteine produziert. Konstitutive hepatische Proteine werden kaum noch synthetisiert. Es zeigte sich, dass eine andauernde Akute-Phase-Reaktion zu einer erhöhten Inzidenz von Mortalität und Morbidität führt. Ein Grund, warum eine andauernde Akute-Phase-Reaktion zur vermehrten Morbidität und Mortalität führt, ist dass eine gesteigerte Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und TNF eine erhöhte Inzidenz von Hypermetabolismus und Organversagen nach sich ziehen. Deshalb liegt das Bestreben in der Behandlung nach einem Trauma darin, das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen wiederherzustellen.

Für diese Arbeit war es als erstes erforderlich, ein geeignetes Zellkulturmodell für die *in vitro* Versuche zu finden. Zur Klärung leberspezifischer Fragestellungen werden häufig permanente Zelllinien, wie HepG2 als *in vitro* Testsystem verwendet. Nachteil von Zelllinien ist, dass diese immortalisiert sind und Tumoreigenschaften besitzen [44]. Primäre Zellen entsprechen eher den *in vivo* Verhältnissen. Die Variabilität der Primärkulturen mit verschiedenen Donoren, die die individuelle Varianz des Menschen widerspiegelt, ist ein erheblicher Vorteil gegenüber der Verwendung von Zelllinien. In verschiedenen Untersuchungen werden Rattenhepatozyten als Zellmodell verwendet. Durch die Unterschiede in der enzymatischen Spezifität und Aktivität sowie wegen Spezies spezifischer Unterschiede sind Rattenhepatozyten für viele Fragestellungen weniger geeignet. Einige Arbeitsgruppen haben als Modell Makrophagen verwendet [45]. In der Literatur wird aber auch ein Modell mit primären Hepatozyten angegeben. Da dieses Modell das System der Leber am ehesten repräsentiert, wurden in dieser Arbeit primäre humane Hepatozyten als Zellmodell für die *in vitro* Versuche verwendet. Es wurde dabei eine Aufreinigung der Zellen gewählt, bei der die Zellsuspension aus 95 % Hepatozyten und 5 % nicht-parenchymaler Zellen, wie Kupferzellen, Gallengangszellen, Fibroblasten, besteht. Eine 100 %-ige Aufreinigung ist laut Literatur nicht empfehlenswert, da Hepatozyten für eine optimale Zytokinproduktion Zell-Zellkontakt mit Kupferzellen benötigen [46]. Man nimmt an, dass ein Signalaustausch über so genannte *tight junctions* zwischen beiden Zelltypen stattfindet, und so die Zytokinproduktion nach Stimulierung initiiert wird [47]. In der Literatur beschrieben ist eine LPS Konzentration von 10 µg/ml für die Stimulierung der Hepatozyten [46]. Aus der Dosisfindung ergab sich für das Zellmodell in dieser Arbeit eine optimale Konzentration von 100 µg/ml LPS. Dieser Unterschied in der LPS Konzentration kann in der Art der Aufreinigung und der Reinheit der Zellen begründet sein. Als nächster Schritt erfolgt bei dieser LPS Konzentration die Dosisfindung für die Optimierung der Insulinkonzentration. IL-6 induziert bekanntermassen Akute-Phase-Proteine in Hepatozyten und wurde deshalb als Marker für die Dosisfindung von Insulin ausgewählt. Die Sekretion von IL-6 nach einer LPS Stimulierung ist insulindosisabhängig. Ab einer Konzentration von 20 I.E./ml Insulin ist ein Absterben der Zellen bei einer Trypanblaufärbung erkennbar. Deshalb wurde als optimale Insulinkonzentration 10 I.E./ml für die *in vitro* Versuche in dieser Arbeit gewählt.

Als nächstes wurde *in vitro* am Zellkulturmodell geschaut, wie Stimulierung und Insulinbehandlung auf pro- und anti-inflammatorische Zytokine wirken. Es gibt dabei die Möglichkeit die Sekretion oder die Expression der mRNA als früheres Signal zu betrachten. Für diese Arbeit wurde als Marker des Effektes von Insulin die Expression der mRNA gewählt. Nach der Stimulierung der Hepatozyten mit LPS ist die Expression der mRNA von TNF sowie IL-1 β drastisch erhöht. TNF und auch IL-1 β sind zwei der bedeutendsten Mediatoren der systemischen Inflammation [48]. Nach einer Insulinbehandlung findet eine Verminderung der Expression der mRNA von TNF sowie auch von IL-1 β statt. Die Expression der mRNA wurde zu β -Aktin normiert, um eine Gleichbeladung der Proben zu gewährleisten. Die Standardabweichungen der Daten sind bei den *in vitro* Versuchen relativ hoch, da für diese Arbeit keine Vorsortierung der Donoren durchgeführt wurde. Um ein einheitlicheres Bild zu erzielen, wären eine grössere Anzahl an Donoren notwendig gewesen. Trotzdem konnte mit dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass primäre Hepatozyten mit LPS-Stimulierung ein geeignetes *in vitro* Modell darstellen, um den Effekt von Insulin zu untersuchen. In diesem Modell vermindert Insulin pro-inflammatorische Zytokine nach einer LPS-Stimulierung.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Effekt von Insulin *in vivo* an Ratten an einem Verbrennungsmodell getestet werden. Das Verbrennungsmodell ist ein gutes Modell der hyperinflammatorischen Katabolie. Da in der Literatur keine Vergleichswerte für eine optimale Insulindosis angegeben sind, musste als erstes eine Insulindosisfindungsstudie durchgeführt werden, bei der die optimale Dosis für eine Insulinbehandlung nach einer thermalen Verletzung ermittelt wurde. Aus der Dosisfindung ergab sich eine optimale Dosis von 5 I.E./kg KG Insulin. Mediatoren für Hypermetabolismus, die hepatische Akute-Phase-Reaktion, die proliferative sowie die apoptotische Kaskade sind verschiedene Zytokine. Nach einem Trauma werden pro- und anti-inflammatorische Zytokine synthetisiert, um die Homöostase wiederherzustellen [22]. Klinische Studien haben gezeigt, dass eine anhaltende Erhöhung pro-inflammatorischer Zytokine zu Hypermetabolismus, Multiorganversagen, Morbidität und Mortalität führen kann [15, 16, 21]. In verschiedenen klinischen Untersuchungen gab es Ansätze die Überexpression pro-inflammatorischer Zytokine nach einem Trauma zu mindern. Allerdings konnten diese nicht den gewünschten Erfolg nachweisen [21, 27, 28, 49]. In dieser Arbeit konnte

gezeigt werden, dass Insulin als anaboles Hormon in Wechselwirkung mit der hepatischen Zytokinkaskade steht. Es wurde bewiesen, dass Insulin nach einer thermalen Verletzung die Expression hepatischer mRNA von IL-1 β , TNF, IL-2 und IL-10 beeinflusst. Ausserdem werden über die mRNA auch die hepatischen Proteine durch Insulin reguliert. Insulin vermindert signifikant IL-1 β zu einem frühen Zeitpunkt nach der thermalen Verletzung, während TNF hingegen zu späteren Zeitpunkten, an Tag 5 und 7, signifikant vermindert wird. Im Gegensatz zu pro-inflammatorischen Zytokinen erhöht Insulin anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10, IL-2 und IL-4 nach einem Trauma. Ein weiteres interessantes Ergebnis ist auch, dass die hepatische mRNA und die Proteine in der Leber durch Insulin ein anderes Verhaltensschema aufweisen als Serumzytokine. In der Leber werden Zytokine über die gesamte Studie erhöht. Der grösste Effekt ist an den Tagen 5 und 7 zu sehen. Im Serum dagegen sind die Zytokine meist an Tag 1 und 2 nach einer thermalen Verletzung erhöht. Diese Ergebnisse zeigen die schwere hypermetabolische Reaktion der Leber, die offensichtlich in der Leber länger andauert. Klinische Studien haben gezeigt, dass das Verhältnis pro- zu anti-inflammatorischen Zytokinen mit der Organfunktion korreliert und so als Indikator für Mortalität verwendet werden kann [50, 51]. Insulin stellt das Equilibrium zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen wieder her und verbessert so die Organfunktion und die Mortalität nach einer thermalen Verletzung. Gleichzeitig konnte auch gezeigt werden, dass Insulin Akute-Phase-Proteine, wie CRP, vermindert, welche nach einem Trauma stark erhöht sind. Akute-Phase-Proteine sind für die Herstellung der Homöostase verantwortlich und fördern die Regeneration [15, 16]. Im Gegensatz dazu sind serumkonstitutive Proteine, wie Albumin nach einem Trauma vermindert und können fast über die gesamte Zeitspanne der Studie gesteigert werden. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass Albuminspiegel die Intensität eines Traumas widerspiegeln und so als Marker für Morbidität und Mortalität herangezogen werden können [12]. In dieser Arbeit wurde auch gezeigt, dass Insulin Zellsignale beeinflusst. Insulin vermindert pro-inflammatorische Signaltranskriptionsfaktoren, wie C/EBP- β und STAT-5 in der Leber. Eine Hochregulierung dieser Faktoren führt zu einer Beeinträchtigung der Organfunktion und der Proteinsynthese [52, 53]. Deshalb scheint es, dass Insulin die Organfunktion und Proteinsynthese während der hypermetabolischen Reaktion über diese Signaltranskriptionsfaktoren verbessert. Zusätzlich zu den pro-inflammatorischen werden auch die anti-inflammatorischen

Signaltranskriptionsfaktoren, wie SOCS-3 und RANTES durch Insulin beeinflusst. Insulin erhöht SOCS-3 und RANTES nach einer thermalen Verletzung. Beide Faktoren sind wichtige Mediatoren für das Überleben und den klinischen Zustand des Patienten nach einem Trauma [24-26]. Die Erhaltung der Organhomöostase hängt von dem Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Zelltod ab [54]. Apoptose, der so genannte programmierter Zelltod, ist ein genetisch bedingter energieabhängiger Prozess, bei dem die Zelle bestimmte morphologische Veränderungen durchläuft. Dabei werden zu keinem Zeitpunkt Bestandteile aus dem Zellinneren in das extrazelluläre Milieu freigesetzt, wo sie den Nachbarzellen Schaden zufügen könnten [54-56]. Im Gegensatz durchlaufen Zellen bei einer Nekrose verschiedenartige morphologische Veränderungen. Die Zellen schwellen an und platzen, sodass der Inhalt der Zelle freigesetzt wird. Die intrazellulären Bestandteile schädigen Zellen in der Umgebung und rufen häufig eine Entzündung hervor [44]. Eine Veränderung im Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose kann zu einer Änderung der Organfunktion und der Homöostase führen [57]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Insulin die Leberstruktur durch Erhöhung der Proliferation sowie Verminderung der Apoptose in der Leber verbessert werden konnte. Signale, die die Apoptose über verschiedene Wege regulieren sind der FAS-Ligand und Bcl-2 [58]. Der FAS-Ligand ist proapoptotisch und fördert über die Bindung von FAS den Zelltod. FAS ist ein Zellmembranrezeptor, über seine Aktivierung werden verschiedene intrazelluläre Mechanismen initiiert, die z.B. Caspase-3 und -9 stimulieren und so zur Apoptose führen [58-60]. Der FAS-Ligand kann durch Interleukine induziert und aufreguliert werden [60]. In verschiedenen Studien wurde bewiesen, dass Bcl-2 und Bcl-xl Faktoren sind, die vor Apoptose schützen können [59, 61]. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Caspase-3 und -9 nach einem Trauma erhöht sind sowie Bcl-2 im Vergleich zu den Normalwerten stark vermindert ist. Insulin beeinflusst die hepatische Proliferation und Apoptose über eine Verminderung der Konzentrationen von Caspase-3 und -9 zu einem frühen Zeitpunkt nach der thermalen Verletzung. Im Gegensatz dazu wird durch Insulin die hepatische Bcl-2 Konzentration nach einem Trauma stark vermindert. Deshalb kann man sagen, dass Insulin die Apoptose in der Leber vermindert und gleichzeitig die Proliferation nach einer thermalen Verletzung erhöht. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch eine Insulinbehandlung die Überexpression pro-inflammatorischer Zytokine vermindert werden kann. Gleichzeitig werden durch Insulin anti-

inflammatorische Zytokine raufreguliert. Es wurde auch bewiesen, dass Morphologie und Proteinsynthese der Leber nach einem Trauma durch Insulin positiv beeinflusst werden.

Für das Sepsismodell wurde ein in der Literatur beschriebenes Tiermodell verwendet, bei dem Ratten eine Endotoxämie appliziert bekamen [62]. Als optimale Dosis wurde den Tieren 3 mg/kg KG LPS intraperitoneal injiziert. Die Insulindosis wurde aus dem Verbrennungsmodell übernommen. Sepsis sowie der septische Schock sind klinische Krankheitsbilder, für die noch keine geeignete Therapie existiert. Die systemische Inflammation nach einem Trauma führt zu Proteinabbau, Katabolismus und Hypermetabolismus. Die Änderung der Struktur und Funktion essentieller Organe, wie Leber, Muskel Herz und Immunsystem, kann zum Multiorganversagen oder Mortalität führen [5]. Die Dauer und das Ausmass der systemischen Inflammation bestimmen das Auftreten von Gewebeschäden und Multiorganversagen [27]. Verschiedene Studien zeigten *in vitro*, dass durch den Einsatz von Antikörpern gegen pro-inflammatorische Zytokine ein Abschwächen der systemischen Inflammation hervorgerufen werden kann [27, 28]. Allerdings konnten diese viel versprechenden Ansätze nicht auf den Menschen übertragen werden. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob Insulin ein mögliches Therapeutikum nach einem Trauma ist, um einem Multiorganversagen vorzubeugen sowie Mortalität zu minimieren. Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass Insulin pro-inflammatorische Zytokine runterreguliert und anti-inflammatorische Zytokine während einer Endotoxämie erhöht. Dabei war zwischen dem Modell der thermalen Verletzung und dem Sepsismodell kein grosser Unterschied erkennbar. Ähnlich dem Sepsismodell werden pro-inflammatorische Zytokine während einer Endotoxämie erhöht und können durch Insulin vermindert werden. Ebenso ist ein zeitlicher Unterschied in der Exprimierung dieser Zytokine zwischen Leber und Serum erkennbar. In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass Insulin Zellsignale, wie pro- und anti-inflammatorische Signaltranskriptionsfaktoren während einer Endotoxämie reguliert. Insulin vermindert pro-inflammatorische Signaltranskriptionen, wie C/EBP- β und STAT-5 in der Leber. Wie schon erwähnt würde eine Hochregulierung dieser Faktoren zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes führen [52, 53]. Zusätzlich werden auch die anti-inflammatorischen Signaltranskriptionsfaktoren, wie SOCS-3 und RANTES durch Insulin beeinflusst. Nach einer Endotoxämie erhöht Insulin die

hepatischen Konzentrationen von SOCS-3 und RANTES. Deshalb kann man annehmen, dass Insulin Organfunktion und Proteinsynthese während der hypermetabolischen Reaktion über die Signaltranskriptionsfaktoren verbessert. Ähnlich dem Verbrennungsmodell wird bei dem Sepsismodell die Apoptose in der Leber über eine Verminderung der Caspase-3 und -9 sowie einer Erhöhung von Bcl-2 durch Insulin verbessert. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde sind Caspase-3 und -9 während einer Endotoxämie erhöht, während Bcl-2 zu den Normalwerten vermindert ist. Wie schon erwähnt, sind Akute-Phase-Proteine für die Herstellung der Homöostase verantwortlich. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Proteine, wie CRP nach LPS-Gabe erhöht sind. Insulin vermindert CRP signifikant an Tag 1 und 7 nach dem Trauma. Im Gegensatz dazu sind serumkonstitutive Proteine, wie Albumin nach einem Trauma über den gesamten Zeitraum der Studie vermindert. Diese Arbeit zeigt, dass durch eine Insulinbehandlung die Konzentration von Albumin im Serum zu fast allen Zeitpunkten gesteigert werden konnte. Anhand des Sepsismodells konnte bewiesen werden, dass Insulin einen positiven Effekt während einer Endotoxämie auf das Verhältnis von pro- zu anti-inflammatorischen Zytokinen, sowie auf Morphologie und Proteinsynthese der Leber hat.

In der vorliegenden Arbeit wurde auch der Effekt von Insulin auf die systemische Inflammation an schwerst verbrannten Kindern untersucht. Eine Patientengruppe bekam Insulin verabreicht, wobei der Blutglukosegehalt im normalen Bereich liegen sollte. Eine zweite Gruppe erhielt kein Insulin, bei dieser Patientengruppe lagen die Blutglucosewerten im Normalbereich. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Insulin pro-inflammatorische Zytokine sowie hepatische Akute-Phase-Proteine vermindert. Gleichzeitig erhöht Insulin anti-inflammatorische Zytokine. Die Tatsache, dass in beiden Behandlungsgruppen der Blutglukosegehalt im Normalbereich lag, lassen darauf schliessen, dass Insulin ein anti-inflammatorisches Hormon ist. Seine Wirkung wird deshalb eher über die Beeinflussung direkter zellulärer Mechanismen laufen, als indirekt über die Regulierung der Glucosekonzentration im Blut. Nach einer thermalen Verletzung waren pro-inflammatorische Zytokine, wie TNF und IL-1 β im Serum der Patienten erhöht. Der Anstieg der Serumkonzentrationen dieser Zytokine geht mit einer Erhöhung von Akute-Phase-Proteinen, wie CRP einher. In der Patientengruppe, die eine Insulinbehandlung erhielt, konnten pro-inflammatorische Zytokine signifikant vermindert werden. Auf die Serumkonzentration

von IL-6 und IL-8 hatte Insulin keinen Einfluss. Im Gegensatz dazu werden anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10 durch eine Insulinbehandlung nach einem Trauma erhöht. Als eine klinische Konsequenz daraus, musste den Kindern mit Insulinbehandlung wesentlich weniger exogenes Albumin verabreicht werden, als den Kindern, die kein Insulin erhielten. Allerdings gibt es zwei Einschränkungen in dieser Studie. Zum einen musste eine Vorauswahl der Patienten stattfinden. Kinder, die eine Insulinbehandlung benötigten, mussten in die Insulingruppe eingegliedert werden. Deshalb ist anzunehmen, dass zwischen beiden Gruppen unterschiedliche metabolische Profile vorherrschen. Zum anderen, waren die Kinder der Insulingruppe älter und grösser, als die Normalgruppe. Trotzdem ist anzunehmen, dass die beobachteten Unterschiede in der Konzentration pro- und anti-inflammatorischer Zytokine auf den Effekt von Insulin zurückgeführt werden können.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Insulin nach einem Trauma *in vitro*, in der Ratte sowie im Menschen pro-inflammatorische Zytokine vermindert. Anti-inflammatorische Zytokine werden erhöht, sodass das Gleichgewicht zwischen diesen Zytokinen wiederhergestellt wird. Die transkriptionelle Regulierung dieser Zytokine erfolgt über die Regulierung von Signaltranskriptionsfaktoren, wie C/EBP- β und RANTES. Nach einem Trauma bzw. während einer Endotoxämie werden durch Insulin serumkonstitutive Proteine, wie Albumin erhöht und Akute-Phase-Proteine, wie CRP vermindert. Diese Arbeit hat gezeigt, dass die Apoptose in der Leber durch eine Insulinbehandlung *in vivo* vermindert werden. Man kann also sagen, dass Insulin nach einem Trauma bzw. während einer Endotoxämie anti-inflammatorisch wirkt. Die Mechanismen, wie Insulin diese positive Wirkung erzielt, sind allerdings noch nicht bekannt. In weiteren Untersuchungen müsste die Signalkaskade von Insulin nach einem Trauma näher betrachtet werden.

6. Zusammenfassung

Nach einem Trauma, einer Operation, einer Verbrennung oder während einer Sepsis tritt häufig eine systemische Inflammation auf. Dabei erfolgt eine unkontrollierte Freisetzung von Mediatoren, die zu Gewebeschäden, Organdysfunktion und schliesslich zum Organversagen führen können. Deshalb ist es wichtig ein geeignetes Therapeutikum zu finden, das dem Hypermetabolismus und Katabolismus nach einem Trauma vorbeugen kann. In dieser Arbeit wurde Insulin als möglicher Therapieansatz *in vitro* und *in vivo* getestet.

In der vorliegenden Arbeit konnte bewiesen werden, dass mit LPS stimulierte primäre Hepatozyten als Zellkulturmodell für die *in vitro* Untersuchung geeignet sind. Nach einer LPS-Stimulierung sind pro- und anti-inflammatorische Zytokine erhöht. Durch eine Insulinbehandlung konnten pro-inflammatorische Zytokine in primären Hepatozyten nach LPS Gabe vermindert werden. Auf anti-inflammatorische Zytokine hatte Insulin keinen signifikanten Effekt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von Insulin *in vivo* erstens am Verbrennungsmodell und zweitens an einem Sepsismodell an Ratten untersucht. In beiden Tiermodellen konnte nach dem Trauma eine Erhöhung pro-inflammatorischer sowie gleichzeitig eine Verminderung anti-inflammatorischer Zytokine beobachtet werden. Anhand der vorgelegten Daten konnte bewiesen werden, dass Insulin das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen wieder herstellt. Wobei festgestellt wurde, dass ein Unterschied in der Wirkung in den einzelnen Geweben besteht. Im Serum ist der positive Effekt von Insulin zu einem früheren Zeitpunkt der Studie erkennbar, als in der Leber. Es wurde auch beobachtet, dass die Regulierung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine durch Insulin nach einem Trauma über die Regulierung pro- und anti-inflammatorischer Signaltranskriptionsfaktoren läuft. Pro-inflammatorische Signaltranskriptionsfaktoren, wie C/EBP- β und STAT-5 konnten durch Insulin vermindert werden. SOCS-3 und RANTES als Vertreter anti-inflammatorischer Transkriptionsfaktoren wurden nach einem Trauma durch Insulin erhöht. Gleichzeitig konnte in dieser Arbeit durch die Bestimmung serumkonstitutiver sowie hepatischer Akute-Phase-Proteine gezeigt werden, dass Insulin Lebermorphologie und Proteinsynthese nach einem Trauma verbessert. Die Apoptose in der Leber wurde durch Insulin vermindert und

gleichzeitig die Proliferation erhöht. Es zeigte sich, dass Insulin die systemische Inflammation *in vivo* im Rattenmodell nach einem Trauma verbessert.

Im letzten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob die positiven Ergebnisse von Insulin im Tiermodell nach einem Trauma auch auf den Menschen übertragen werden können. Dafür wurden Kinder mit einer massiven Verbrennung in zwei Gruppen eingeteilt. Eine Gruppe bekam Insulin verabreicht, sodass die Blutglukosekonzentration zwischen 120 – 180 mg/dl lagen. Eine zweite Gruppe bekam kein Insulin, da bei diesen Patienten die Blutglukosewerte im Normalbereich von 120 – 180 mg/dl lagen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch im Menschen durch eine Insulinbehandlung pro-inflammatorische Zytokine vermindert werden konnten, die nach einem Trauma erhöht waren. Gleichzeitig erhöht Insulin anti-inflammatorische Zytokine nach einem Trauma. Anhand der Bestimmung Akuter Phase Proteine wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass die Proteinsynthese nach einem Trauma durch Insulin verbessert werden kann. Die Daten zeigen auch, dass durch eine Insulinbehandlung die Zugabe von exogenem Albumin reduziert werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Insulin einen anti-inflammatorischen Charakter besitzt. Es vermindert die pro-inflammatorische hepatische Akute-Phase-Reaktion nach einem Trauma und verbessert so Organfunktion und Mortalität. Aus den Untersuchungen dieser Arbeit lässt sich schlussfolgern, dass Insulin ein Therapeutikum ist, mit dem einer Leberinsuffizienz nach einem Trauma vorgebeugt werden kann. Insulin stellt das Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokine wieder her und trägt so zu einer Verbesserung von Hypermetabolismus und Katabolismus bei.

7. Literaturverzeichnis

1. Trampuz, A. and W. Zimmerli, *Pathogenese und Therapie der Sepsis*. Schweiz Med Forum, 2003(35): p. 811 - 818.
2. Rangel-Frausto, M.S., et al., *The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study*. Jama, 1995. **273**(2): p. 117-23.
3. Angus, D.C., et al., *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. Crit Care Med, 2001. **29**(7): p. 1303-10.
4. Arnold, J., et al., *Increased whole body protein breakdown predominates over increased whole body protein synthesis in multiple organ failure*. Clin Sci (Lond), 1993. **84**(6): p. 655-61.
5. Takala, J., et al., *Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults*. N Engl J Med, 1999. **341**(11): p. 785-92.
6. . in *European Shock Society*. 2002. Oslo.
7. Jeschke, M.G., et al., *The combination of growth hormone with hepatocyte growth factor alters the acute phase response*. Shock, 1999. **12**(3): p. 181-7.
8. Jeschke, M.G., et al., *Hepatocyte growth factor modulates the hepatic acute-phase response in thermally injured rats*. Crit Care Med, 2000. **28**(2): p. 504-10.
9. Rodriguez, J.L., et al., *Correlation of the local and systemic cytokine response with clinical outcome following thermal injury*. J Trauma, 1993. **34**(5): p. 684-94; discussion 694-5.
10. Rothschild, M.A., M. Oratz, and S.S. Schreiber, *Serum albumin*. Hepatology, 1988. **8**(2): p. 385-401.
11. Jeschke, M.G., D.N. Herndon, and R.E. Barrow, *Insulin-like growth factor I in combination with insulin-like growth factor binding protein 3 affects the hepatic acute phase response and hepatic morphology in thermally injured rats*. Ann Surg, 2000. **231**(3): p. 408-16.
12. Brown, R.O., et al., *Effect of albumin supplementation during parenteral nutrition on hospital morbidity*. Crit Care Med, 1988. **16**(12): p. 1177-82.
13. Moshage, H., *Cytokines and the hepatic acute phase response*. J Pathol, 1997. **181**(3): p. 257-66.
14. Ruot, B., et al., *Synthesis rate of plasma albumin is a good indicator of liver albumin synthesis in sepsis*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(2): p. E244-51.
15. De Maio, A., et al., *Genetic component in the inflammatory response induced by bacterial lipopolysaccharide*. Shock, 1998. **10**(5): p. 319-23.

7. Literaturverzeichnis

16. Selzman, C.H., et al., *Therapeutic implications of interleukin-10 in surgical disease*. Shock, 1998. **10**(5): p. 309-18.
17. Jeschke, M.G., et al., *Cell proliferation, apoptosis, NF-kappaB expression, enzyme, protein, and weight changes in livers of burned rats*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(6): p. G1314-20.
18. Beg, A.A., et al., *Tumor necrosis factor and interleukin-1 lead to phosphorylation and loss of I kappa B alpha: a mechanism for NF-kappa B activation*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(6): p. 3301-10.
19. Bellas, R.E., et al., *Inhibition of NF-kappa B activity induces apoptosis in murine hepatocytes*. Am J Pathol, 1997. **151**(4): p. 891-6.
20. Barret, J.P., M.G. Jeschke, and D.N. Herndon, *Fatty infiltration of the liver in severely burned pediatric patients: autopsy findings and clinical implications*. J Trauma, 2001. **51**(4): p. 736-9.
21. Livingston, D.H., A.C. Mosenthal, and E.A. Deitch, *Sepsis and multiple organ dysfunction syndrome: a clinical-mechanistic overview*. New Horiz, 1995. **3**(2): p. 257-66.
22. de Waal Malefyt, R., et al., *Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes*. J Exp Med, 1991. **174**(5): p. 1209-20.
23. Jeschke, M.G., et al., *Insulin attenuates the systemic inflammatory response to thermal trauma*. Mol Med, 2002. **8**(8): p. 443-50.
24. Emanuelli, B., et al., *SOCS-3 is an insulin-induced negative regulator of insulin signaling*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 15985-91.
25. Nelson, P.J., et al., *Genomic organization and transcriptional regulation of the RANTES chemokine gene*. J Immunol, 1993. **151**(5): p. 2601-12.
26. Ogle, C.K., et al., *The effect of burn injury on suppressors of cytokine signalling*. Shock, 2000. **14**(3): p. 392-8; discussion 398-9.
27. Tracey, K.J., et al., *Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia*. Nature, 1987. **330**(6149): p. 662-4.
28. Pruitt, J.H., E.M. Copeland, 3rd, and L.L. Moldawer, *Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism in sepsis, systemic inflammatory response syndrome, and septic shock*. Shock, 1995. **3**(4): p. 235-51.
29. Van den Berghe, G., et al., *The somatotropic axis in critical illness: effect of continuous growth hormone (GH)-releasing hormone and GH-releasing peptide-2 infusion*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(2): p. 590-9.
30. Gore, D.C., et al., *Association of hyperglycemia with increased mortality after severe burn injury*. J Trauma, 2001. **51**(3): p. 540-4.

31. Jeschke, M.G., R.E. Barrow, and D.N. Herndon, *Recombinant human growth hormone treatment in pediatric burn patients and its role during the hepatic acute phase response*. Crit Care Med, 2000. **28**(5): p. 1578-84.
32. Jeschke, M.G., R.E. Barrow, and D.N. Herndon, *Insulinlike growth factor I plus insulinlike growth factor binding protein 3 attenuates the proinflammatory acute phase response in severely burned children*. Ann Surg, 2000. **231**(2): p. 246-52.
33. Blum, W.F. and M.B. Ranke, *Insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) with special reference to IGFBP-3*. Acta Paediatr Scand Suppl, 1990. **367**: p. 55-62.
34. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., Schäfer-Korting, M, *Mutschler Arzneimittelwirkungen*. 8. ed. 2001, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
35. van den Berghe, G., et al., *Intensive insulin therapy in the critically ill patients*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1359-67.
36. Liu, P., et al., *Role of endogenous nitric oxide in TNF-alpha and IL-1beta generation in hepatic ischemia-reperfusion*. Shock, 2000. **13**(3): p. 217-23.
37. Weiss, T.S., et al., *Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid*. J Hepatol, 2003. **38**(4): p. 476-82.
38. Thasler, W.E., et al., *[The use of human tissue in research. Ethical and legal aspects]*. Dtsch Med Wochenschr, 2002. **127**(25-26): p. 1397-400.
39. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning*. 2. ed. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
40. Oberholzer, A., et al., *Increased survival in sepsis by in vivo adenovirus-induced expression of IL-10 in dendritic cells*. J Immunol, 2002. **168**(7): p. 3412-8.
41. Oberholzer, A., C. Oberholzer, and L.L. Moldawer, *Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug*. Crit Care Med, 2002. **30**(1 Supp): p. S58-S63.
42. Oberholzer, A., et al., *Interleukin-18 plasma levels are increased in patients with sepsis compared to severely injured patients*. Shock, 2001. **16**(6): p. 411-4.
43. Oberholzer, C., et al., *Targeted adenovirus-induced expression of IL-10 decreases thymic apoptosis and improves survival in murine sepsis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11503-8.
44. Lodish, H., et al., *Molekulare Zellbiologie*. 2001, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg.
45. Borovikova, L.V., et al., *Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin*. Nature, 2000. **405**(6785): p. 458-62.

7. Literaturverzeichnis

46. Hoebe, K.H., et al., *Direct cell-to-cell contact between Kupffer cells and hepatocytes augments endotoxin-induced hepatic injury*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001. **280**(4): p. G720-8.
47. Bhatia, S.N., et al., *Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells*. Faseb J, 1999. **13**(14): p. 1883-900.
48. de Galan, B.E., et al., *Hypoglycaemia downregulates endotoxin-induced production of tumour necrosis factor-alpha, but does not affect IL-1beta, IL-6, or IL-10*. Cytokine, 2003. **22**(3-4): p. 71-6.
49. Williams, G. and B.P. Giroir, *Regulation of cytokine gene expression: tumor necrosis factor, interleukin-1, and the emerging biology of cytokine receptors*. New Horiz, 1995. **3**(2): p. 276-87.
50. Taniguchi, T., et al., *Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome*. Crit Care Med, 1999. **27**(7): p. 1262-4.
51. Jeschke, M.G., et al., *IGF-I/IGFBP-3 equilibrates ratios of pro- to anti-inflammatory cytokines, which are predictors for organ function in severely burned pediatric patients*. Mol Med, 2002. **8**(5): p. 238-46.
52. Trautwein, C., et al., *C/EBP-beta/LAP controls down-regulation of albumin gene transcription during liver regeneration*. J Biol Chem, 1996. **271**(36): p. 22262-70.
53. Niehof, M., et al., *Interleukin-6-induced tethering of STAT3 to the LAP/C/EBPbeta promoter suggests a new mechanism of transcriptional regulation by STAT3*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 9016-27.
54. Steller, H., *Mechanisms and genes of cellular suicide*. Science, 1995. **267**(5203): p. 1445-9.
55. Lightfoot, E., Jr., et al., *Major burn trauma in rats promotes cardiac and gastrointestinal apoptosis*. Shock, 1999. **11**(1): p. 29-34.
56. Wolf, S.E., et al., *Cutaneous burn increases apoptosis in the gut epithelium of mice*. J Am Coll Surg, 1999. **188**(1): p. 10-6.
57. Sun, Z., et al., *The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats*. Scand J Gastroenterol, 1998. **33**(4): p. 415-22.
58. Behrns, K.E., L.W. Schrum, and F.G. Que, *Apoptosis: cell death by proteolytic scalpel*. Surgery, 1999. **126**(3): p. 463-8.
59. Salvesen, G.S. and V.M. Dixit, *Caspases: intracellular signaling by proteolysis*. Cell, 1997. **91**(4): p. 443-6.
60. Kuan, N.K. and E. Passaro, Jr., *Apoptosis: programmed cell death*. Arch Surg, 1998. **133**(7): p. 773-5.

61. Yang, J., X. Liu, and K. Bahalla, *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome-c from mitochondria blocked*. *Science*, 1997. **275**: p. 1129 - 1132.
62. Bolder, U., et al., *Hepatocyte transport of bile acids and organic anions in endotoxemic rats: impaired uptake and secretion*. *Gastroenterology*, 1997. **112**(1): p. 214-25.

8. Publikationen

8.1. Journale und Zeitschriften

1. Jeschke MG, Einspanier R, Klein D, Jauch KW. *Insulin attenuates the systemic inflammatory response to thermal trauma*. Mol Med 2002; 8(8): 443-450.
2. Klein D, Einspanier R, Bolder U, Jeschke MG. *Differences in signal transcription pathway and cytokine expression between thermal injury and sepsis*. Shock 2003; 20(6): 536-543.
3. Jeschke MD, Klein D. *Liposomal gene transfer of multiple genes is more effective than gene transfer of a single gen*. Gene Therapy 2004;
4. Jeschke MG, Klein D, Herndon DN. *Insulin treatment improves the systemic inflammatory reaction and hepatic acute-phase-response to severe thermal injury*. Ann Surg 2004,239: 553-560.
5. Klein D, Schubert T, Horch RE, Jauch KW, Jeschke MG. *Insulin treatment improves hepatic morphology and function after severe trauma*. Ann Surg 2004 (in press).
6. Jeschke MG, Schubert T, Klein D. *Cellular mechanisms after non-viral liposomal IGF-I cDNA gene transfer to the skin after wounding*. AJP 2004 (in press).
7. Jeschke MG, Klein D, Rensing H, Tracey KJ, Bolder U, Einspanier R. *Insulin attenuates the systemic inflammatory response during endotoxemia*. Crit Care Med 2004 (in review).
8. Jeschke MG, Klein D, Sandmann G, Schubert T. *The use of liposome affects skin regeneration, skin morphology and growth factor expression*. Mol Therapy 2004 (in review).

8. Publikationen

9. Sandmann G, Klein D, Jeschke MG. *The effect of Promogran on dermal and epidermal regeneration and growth factors in acute wounds*. Arch Surg 2004 (in review).
10. Jeschke MG, Klein D, Rensing H, Bolder U, Einspanier R. *Insulin prevents liver damager and preserves liver function during endotoxemia*. Hepatology 2004 (in review).
11. Klein D, Jeschke MG, Bolder U. *The effect of heat shock on cellular mediators*. AJP 2004(in review).

8.2. Poster und Vorträge

1. *“Low-dose insulin exerts anti-inflammatory effects after thermal injury”*. Cytokines in liver injury and repair. Falk symposium. Hannover, Germany (2001).
2. *„Extended hypermetabolic response of the liver in severely burned pediatric patients“*. European Surgical Association. Lissabon, Portugal (2002).
3. *„Insulin wirkt anti-inflammatorisch nach Trauma“*. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, Deutscher Chirurgen Kongress. Berlin, Germany (2002).
4. *“The effect of insulin on the hepatic acute phase response“*. SIS World Meeting. Madrid, Spain (2002).
5. *“Eine vitamin-, protein-, und omega-3 fettsäurereiche Ernährung verbessert den Proteinmetabolismus während der hypermetabolischen Katabolie”*. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Wundheilung und Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, CAW Wundheilung, Hamburg (2002).
6. *“Insulin treatment improves hepatic morphology and function after severe trauma“*. 10th Congress of the European Shock Society. Oslo, Norway (2002).

8. Publikationen

7. „*Insulin verbessert Lebermorphologie und Leberfunktion nach einem schweren Trauma*“. 6. Chirurgische Forschungstage. Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, Köln (2002).
8. „*Insulin attenuates the systemic inflammatory reaction to severe trauma*“. SIS-E, Como, Italy (2003).
9. „*Der Einsatz der Gentherapie zur Verbesserung der dermalen und epidermalen Regeneration*“. 7 Kongress der Deutschen Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung (DGfW), Augsburg, Germany (2003).
10. „*Gene Transfer of multiple genes is more effective than gene transfer of a single gene*“. European Tissue Repair Society, Amsterdam, Niederlande (2003).
11. „*Mechanismen des non-viralen liposomalen Gen-Transfers zur Verbesserung der dermalen und epidermalen Regeneration*“. 34. Jahrestagung der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen, Freiburg, Germany (2003).
12. „*Insulin ein anti-inflammatorisches Molekül mit Verbesserung der Überlebenschancen bei Trauma oder Sepsis*“. Chirurgische Forschungstage, Deutsche Gesellschaft für Chirurgie, Berlin, Germany (2003).
13. „*Insulin attenuates the systemic inflammatory response during endotoxemia*“. Annual meeting of the Society of Critical Care Medicine, Orlando, Florida (2004).
14. „*Insulin treatment improves the systemic inflammatory reaction to severe trauma*“. Annual meeting of the Society of Critical Care Medicine, Orlando, Florida (2004).

9. Danksagung

Herrn PD Dr. Marc G. Jeschke danke ich für die Bereitstellung des Themas dieser Dissertation, die Durchführung der Tierversuche sowie für die Übernahme des Zweitgutachtens. Sein überaus grosses Interesse, seine zahlreichen Anregungen und Vorschläge und die ständige Diskussionsbereitschaft waren eine wertvolle Hilfe.

Herrn Prof. Dr. Achim Göpferich danke ich für die Übernahme des Erstgutachtens.

Vielen Dank an Dr. Thomas Weiss, Monika Lichtenauer, Anja Gräbe und Birgit Jahn für die Bereitstellung der isolierten primären humanen Hepatozyten.

Ein grosser Dank gilt auch Prof. Dr. Ed Geissler und Dr. Gudrun Köhl für ihre fachliche Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft.

Den Laborkollegen der chirurgischen Forschung danke ich für das angenehme Arbeitsklima. Besonderer Dank geht an Dr. Marina Schinnerl, Dipl. Biologin Christine Sattler, Corina de Sousa, Christine Wagner, Yeşim Tevetoğlu, Erika Frank und Astrid Schwend für ihre moralische Unterstützung.

Herzlichen Dank an Dr. Michael Gruber für seine fachlichen und privaten Ratschläge. Ein besonderer Dank gilt Regina „Gini“ Lindner für ihre Freundschaft.

Besonders möchte ich mich bei Jens Wilde für die persönliche „Computeradministration“ und Motivation bedanken.

Herzlichen Dank an „Onkel Wolfgang“, als „*finanzier*“ dieses Druckwerkes.

Ein ganz besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern. Ohne sie wäre dieser Weg niemals möglich gewesen.