

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR IMMUNOLOGIE

Prof. Dr. Daniela N. Männel

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EINFLUSS VON SEPSIS-INDUZIERTER IMMUNPARALYSE AUF DIE PRIMÄRE B-ZELLANTWORT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät der Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Arno Mohr

2012

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR IMMUNOLOGIE

Prof. Dr. Daniela N. Männel

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN

DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

EINFLUSS VON SEPSIS-INDUZIERTER IMMUNPARALYSE AUF DIE PRIMÄRE B-ZELLANTWORT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät der Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Arno Mohr

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Daniela Männel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Gabriele Kirchner

Tag der mündlichen Prüfung: 27.03.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Überblick über das Immunsystem.....	1
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	1
1.1.1.1 Zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems	2
1.1.1.2 Humorale Komponenten des angeborenen Immunsystems	3
1.1.2 Das adaptive Immunsystem.....	4
1.1.2.1 Zelluläre Komponenten des adaptiven Immunsystems	5
1.1.2.2 Humorale Komponenten des adaptiven Immunsystems	7
1.2 Sepsis.....	10
1.2.1 Geschichte und Definitionen	10
1.2.2 Epidemiologie.....	12
1.2.3 Ätiologie und Pathogenese der Sepsis	13
1.2.4 Therapie der Sepsis	16
1.2.5 Sepsis-Modelle.....	18
1.2.5.1 Injektionsmodelle	18
1.2.5.2 Peritonitismodelle.....	18
1.3 Ziel der Arbeit.....	19
2 Materialien	20
2.1 Chemikalien und Reagenzien	20
2.2 Puffer und Lösungen.....	21
2.3 Antikörper	21
2.4 Tiere	21
2.5 Verbrauchsmaterialien	22
2.6 Geräte	22
2.7 Software	22

3	Methoden	23
3.1	Tierexperimentelle Methoden.....	23
3.1.1	Tierhaltung	23
3.1.2	Anästhesie.....	23
3.1.3	Laparotomie	23
3.1.3.1	Zökale Ligatur und Perforation (CLP)	23
3.1.3.2	„Sham-OP"	24
3.1.4	Immunisierung.....	24
3.1.5	Gewinnung von Serum.....	25
3.1.6	Bildung von Pool-Serum	25
3.2	Versuchsplanung	25
3.2.1	Untersuchung der Antikörperantwort nach Immunisierung während der Immunparalyse.....	25
3.2.2	Untersuchung des zeitabhängigen Einflusses einer septischen Peritonitis auf die Antikörper-Antwort.....	26
3.3	„Enzyme-linked immunosorbent assay“	29
3.3.1	Allgemeines Prinzip der ELISA-Methode	29
3.3.2	Bestimmung der Ovalbumin-spezifischen Antikörper	30
3.3.3	Bestimmung der unspezifischen Antikörper	31
3.3.4	ELISA-Auswertung	32
3.4	Statistik.....	35
4	Ergebnisse	36
4.1	Antikörperantwort nach Immunisierung während der Immunparalyse.....	36
4.1.1	Gesamt-IgM-Antwort	37
4.1.2	Ovalbumin-spezifische IgM-Antwort.....	38
4.1.3	Gesamt-IgG-Antwort	39
4.1.4	Ovalbumin-spezifische IgG-Antwort.....	40
4.1.5	Ovalbumin-spezifische IgG1-Antwort	41
4.1.6	Ovalbumin-spezifische IgG2a-Antwort	42

4.2 Zeitabhängiger Einfluss einer septischen Peritonitis auf die Antikörper-Antwort	43
4.2.1 Gesamt-IgM-Antwort	44
4.2.2 Ovalbumin-spezifische IgM-Antwort.....	44
4.2.3 Gesamt-IgG-Antwort	47
4.2.4 Ovalbumin-spezifische IgG-Antwort.....	47
4.2.5 Ovalbumin-spezifische IgG1-Antwort.....	50
4.2.6 Ovalbumin-spezifische IgG2a-Antwort.....	50
5 Diskussion.....	53
5.1 Auswirkungen der CLP auf die primäre Antikörperantwort	53
5.2 Therapeutische Ansatzmöglichkeiten	56
5.2.1 „Indolamin 2,3-Dioxygenase“ (IDO)	57
5.2.2 Lymphozyten und regulatorische Zellen	58
5.2.3 Makrophagen und dendritische Zellen	62
5.2.4 „Macrophage migration inhibitory factor“ (MIF)	64
5.2.5 Vegetatives Nervensystem	66
5.2.6 Traditionelle chinesische Medizin	67
6 Zusammenfassung	68
7 Literaturverzeichnis.....	70
8 Abbildungsverzeichnis	90
9 Formelverzeichnis.....	92
Danksagung	93

Abkürzungsverzeichnis

AP	alkalische Phosphatase
APC	Antigen-präsentierende Zelle
CARS	<i>compensatory anti-inflammatory response</i>
CASP	<i>colon ascendent stent peritonitis</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLP	<i>cecal ligation and puncture</i>
d	Tag(e)
DC	dendritische Zelle
dem.	demineralisiert
df	Freiheitsgrade
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
F	F-Wert
HRP	Meerrettichperoxidase
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharide
M	molar
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIF	<i>macrophage migration inhibitory factor</i>
MODS	<i>multiple organ dysfunction syndrome</i>
MW	Mittelwerte
n	Anzahl
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
p	Signifikanz
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PRR	<i>pattern-recognition receptor</i>

rEU	relative ELISA-Unit
rpm	Umdrehungen pro Minute
SD	Standardabweichung
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
T _H	T-Helperzelle
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

1 Einleitung

1.1 Überblick über das Immunsystem

Um den Organismus vor Bakterien, Viren, Pilzen und anderen Erregern aber auch vor entarteten körpereigenen Zellen zu schützen, entwickelte sich im Laufe der Evolution ein hochkomplexes Immunsystem, das sich aus der Interaktion vieler verschiedenartiger Moleküle, Zellen und Gewebe zusammensetzt.

An der Immunabwehr im Menschen sind zwei phylogenetisch unterschiedlich alte Immunsysteme beteiligt. Zum einen gibt es das angeborene (ältere), relativ unspezifisch agierende Immunsystem und zum anderen das adaptive Immunsystem, das die Fähigkeit hat einen Erreger spezifisch zu bekämpfen. Beides sind jedoch keine getrennt fungierenden Systeme, die unabhängig voneinander an der Elimination der Erreger arbeiten, vielmehr sind sie an verschiedenen Stellen effizient miteinander verzahnt um eine erfolgreiche Immunantwort sicherzustellen [1, 2].

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Zunächst muss ein Erreger mechanische Schranken des menschlichen Körpers, wie z.B. Fimbrien und Epithelien, die in vielen Organen von der ebenfalls protektiven bakteriellen Normalflora besetzt sind, und chemische Barrieren, wie z.B. antimikrobiell wirksame Proteine, bewältigen. Nach Umgehung dieser ersten Verteidigungslinie sind es zelluläre und humorale Komponenten des angeborenen Immunsystems, auf die der Mikroorganismus trifft. Da diese Komponenten konstitutiv vorhanden sind, ist eine sehr schnelle und meist erfolgreiche Reaktion gegen den Erreger möglich, unabhängig davon, ob es bereits zuvor zur Exposition mit denselben antigenen Strukturen gekommen war. Nötigenfalls aktivieren Bestandteile der angeborenen Abwehr das adaptive Immunsystem und überbrücken die Zeit, bis dieses aktiv werden kann und den

Mikroorganismus dann spezifisch bekämpft. Jedoch auch die erworbene Abwehr benutzt die wirksamen Effektor-Mechanismen des angeborenen Immunsystems.

Das unspezifische Immunsystem kann „körpereigen“ und „körperfremd“ durch *pattern-recognition receptors* (PRRs) differenzieren. Diese Mustererkennungsrezeptoren können repetitive Strukturen, sog. *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) erfassen, die für ein sehr weites Spektrum an Erregern charakteristisch sind und auf Wirtszellen nicht vorkommen. PAMPs sind sehr gut konserviert und für lebensnotwendige physiologische Funktionen des Mikroorganismus essenziell. Beispiele für Muster, die von PRRs erkannt werden, sind Bestandteile der Zellwand von Mikroorganismen wie Peptidoglykane und Lipoteichonsäuren bei grampositiven sowie Lipopolysaccharide (LPS) bei gram-negativen Bakterien [1].

1.1.1.1 Zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems

Wichtige Zellen des angeborenen Immunsystems sind neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Während die im Blut relativ geringe Zahl eosinophiler und basophiler Granulozyten eher eine Rolle bei Schutz vor Parasiten spielt, sind Neutrophile wichtiger Bestandteil der Abwehr bakterieller Erreger. Diese erfolgt durch Phagozytose oder durch Ausschüttung von in Granula enthaltenen unterschiedlichen Enzymen sowie toxischer Sauerstoffderivate. An den Ort der Entzündung werden Neutrophile durch Chemokine „gelockt“ (Chemo-taxis), die hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet werden. Makrophagen sind für die Phagozytose von Erregern zuständig und sind - wie auch dendritische Zellen (DCs) - ein wichtiges Bindeglied zum adaptiven Immunsystem, indem Bestandteile aufgenommener Erreger prozessiert und dann Zellen der spezifischen Abwehr auf *major histocompatibility complex*-Molekülen vom Typ II (MHC II) präsentiert werden. Zellen mit dem MHC-II-Molekül auf der Oberfläche werden daher auch Antigen-präsentierende Zellen (APCs) genannt. Weiterer Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese spielen eine Rolle bei der Erkennung von Tumorzellen und Virus-infizierten Zellen. Bei Identifikation „zwingen“ NK-Zellen betroffene Körperzellen

zur Apoptose oder zerstören sie durch die Inhaltsstoffe zytotoxischer Granula. Eine besondere Form von NK-Zellen sind die sog. NK T-Zellen, die an der Regulation der Immunantwort beteiligt sind. Diese relative kleine Zellpopulation zeichnet sich im Gegensatz zu gewöhnlichen T-Zellen dadurch aus, dass nicht nur der T-Zell-Rezeptor auf der Zelloberfläche lokalisiert ist, sondern auch NK-typische Oberflächenmarker gefunden werden [3]. Anders als normale T-Zellen (siehe 1.1.2.1) dienen NK T-Zellen nicht der Erkennung von Proteinbestandteilen, sondern der Detektion fremder Lipide. Wie die im Folgenden angesprochenen $\gamma\delta$ T-Zellen wird auch den NK T-Zellen eine wichtige Rolle in der ersten Verteidigungsline gegen verschiedenartige Erreger [4, 5], aber auch gegen körpereigene entartete Zellen zugesprochen [6, 7]. Die sog. $\gamma\delta$ T-Zellen sind ebenfalls dem angeborenen Immunsystem zuzurechnen und unterscheiden sich im Aufbau des T-Zell-Rezeptors von gewöhnlichen T-Zellen (siehe 1.1.2.1), bei denen zum Rezeptoraufbau ein α - und ein β -Heterodimer beitragen. Neben Schutz vor Zelltartung [8, 9], Einfluss auf Wundheilung [10] und direkter zytotoxischer Funktion konnte $\gamma\delta$ T-Zellen auch eine regulatorische Funktion v.a. auf das angeborene Immunsystem [11, 12] aber auch auf Zellen des adaptiven Immunsystems nachgewiesen werden [13]. Nur in relativ geringer Zahl hält sich diese Zellpopulation in sekundär lymphatischen Organen und im Blut auf [14]. Der größte Teil dieser Zellen befindet sich stattdessen in von Epithel besetzten Organen wie Darm, Lunge und Urogenitaltrakt [15].

1.1.1.2 Humorale Komponenten des angeborenen Immunsystems

Eine wichtige Rolle bei der humoralen Immunantwort spielt das Komplementsystem. Dieses besteht aus Proteinen, die in inaktiven Vorstufen im Blutplasma vorliegen. Bei Aktivierung des Systems z.B. (im „klassischen Weg“) durch an Erreger gebundene Antikörper (Bestandteil des humoralen adaptiven Immunsystems) kommt es zu einer kaskadenartigen Proteolyse der inaktiven Protein-Vorstufen. Gemeinsame Endstrecke aller Komplement-Aktivierungswege ist der *membrane attack complex*, der zur Zerstörung des Erregers führt. Weitere bedeutende humorale Faktoren des angeborenen Immunsystems sind Zytokine.

Diese immunmodulatorischen Polypeptide dienen der Inter-Zell-Kommunikation immunkompetenter Zellen. Sie werden zwar auch von Zellen des adaptiven Immunsystems gebildet, jedoch ist der größte Teil, der im Serum detektiert werden kann, dem angeborenen Immunsystem zuzuordnen. Ein Zytokin kann autokrine, parakrine und teilweise auch endokrine Wirkung auf Zelldifferenzierung und Proliferation verschiedener Zellen haben (Pleiotropie), wobei unterschiedliche Zytokine dieselbe Wirkung in der gleichen Zielzelle hervorrufen können (Redundanz). Eine ganz grobe Einteilung dieses komplexen Systems erfolgt durch die Unterteilung in ein proinflammatorisches und ein anti-inflammatorisches Wirkungsprofil. Typische proinflammatorische Zytokine sind Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin (IL) -1, IL-6, IL-8 und IL-12. Als wichtige antiinflammatorische Zytokine sind z.B. IL-4, IL-10, IL-13 und *transforming growth factor* (TGF) - β anzuführen. Vor allem dendritische Zellen und Makrophagen sind Produzenten von Zytokinen, die eher dem angeborenen Immunsystem zuzuordnen sind (TNF, IL-1, IL-6, IL-8, und IL-12) und nach Bindung eines PAMP an einen PRR ausgeschüttet werden. Manche dieser Zytokine induzieren in der Leber die Bildung von Akut-Phase-Proteinen, einige wirken chemotaktisch und aktivierend auf Lymphozyten. Ein vielseitiges Zytokin, das bei Sepsis eine große Rolle spielt ist TNF. Es wirkt aktivierend auf neutrophile Granulozyten und Makrophagen und fördert im Sinne einer Zytokinkaskade auch eine Ausschüttung anderer proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-1. Ferner beeinflusst dieses Zytokin Endothelzellen dahingehend, dass Zell-Zell-Kontakte „gelockert“ und Zell-Adhäsions-Moleküle, sog. Selektine, exprimiert werden. Neutrophile Granulozyten im Gefäßsystem erreichen hierdurch leichter den Ort der Infektion. TNF sorgt weiterhin für eine katabole Stoffwechsellsage und wirkt pyrogen [1].

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem, das nur eine sehr begrenzte Zahl unterschiedlicher Muster erkennt, kann das adaptive Immunsystem Erreger spezifisch bekämpfen. Man weiß heute, dass die individuelle Spezifität der Lymphozyten durch zufällige Rekombination gewisser Gensegmente geschieht.

So ist es zu erklären, dass es Millionen jeweils verschieden spezifischer Lymphozyten gibt.

Großer Vorteil des adaptiven Immunsystems ist, dass es ein immunologisches Gedächtnis ausbildet, um so bei erneutem Kontakt mit gleichem Erreger, diesen ohne große Vorlaufzeit wirksam bekämpfen zu können.

1.1.2.1 Zelluläre Komponenten des adaptiven Immunsystems

Die Zellen des adaptiven Immunsystems sind B- und T-Zellen. Beide entstammen, wie auch NK-Zellen, einer allgemeinen lymphatischen Vorläuferzelle im Knochenmark. Während die B-Zellen im Knochenmark bleiben, um zu reifen, wandern die T-Zellen hierzu in den Thymus aus und entwickeln sich dort entweder zu T-Helferzellen (T_H) oder zytotoxischen T-Zellen. Die Unterscheidung dieser, wie auch vieler anderer Zellen, erfolgt durch spezifische Oberflächenmarker, den *cluster of differentiation* (CD). T-Helferzellen sind dieser Nomenklatur nach CD4+ und zytotoxische T-Zellen CD8+. Eine besondere Zellpopulation stellen die erst im Jahr 1995 entdeckten sog. CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen dar, deren physiologische Funktion in der Suppression von Effektorzellen liegt, um „Kollateralschäden“ an verschiedenen Organen, hervorgerufen durch eine zu starke Entzündungsreaktion, zu begrenzen. Die spezifische Antigenerkennung erfolgt bei allen T-Zellen durch den sog. T-Zell-Rezeptor. Dieser kann das Antigen nicht nativ erkennen, sondern muss es auf für jedes Individuum spezifischen MHC-Molekülen präsentiert bekommen. Zytotoxische T-Zellen interagieren mit MHC-Molekülen vom Typ I. Auf diesem membranständigen Molekül, das sich auf allen kernhaltigen Zellen befindet, werden Bestandteile intrazellulär synthetisierter Proteine präsentiert. Falls es nun z.B. zu Virusbefall einer Zelle kommt, so werden Bestandteile von - aus viraler DNA codierten - Proteinen auf diesem Molekül dem Immunsystem offenbart. Zytotoxische T-Zellen können diese als „fremd“ erkennen und die Zelle eliminieren. MHC-Moleküle vom Typ II werden nur auf speziellen Zellen, den APCs (siehe 1.1.1.1) exprimiert. Nach Phagozytose eines Erregers werden Teile der prozessierten Bestandteile auf den MHC II-Molekülen präsentiert und durch den T-Zell-Rezeptor der T_H -Zellen

erkannt. Wenn eine T_H -Zelle durch das sich auf dem MHC II befindende Antigen und weiteren essenziellen costimulatorischen Reizen aktiviert wird, so kann sie zur T_{H1} -Zelle differenzieren und durch Sezernieren von z.B. IL-2 und Interferon (IFN) - γ die zellvermittelte Immunantwort fördern. Sollte die T-Zelle zu einer T_{H2} -Zelle differenzieren, so sezerniert sie vor allem IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 und begünstigt durch dieses Zytokinprofil die humorale adaptive Immunantwort, repräsentiert durch Antikörper.

Diese Antikörper werden von aktivierte B-Zellen, den sog. Plasmazellen, sezerniert. Die Aktivierung von B-Zellen geschieht mittels eines spezifischen, membrangebundenen Antikörpers auf ihrer Oberfläche. Sobald das für die Zelle spezifische Antigen gebunden ist, kommt es zur Internalisierung des Rezeptors und zur Präsentation prozessierter Bestandteile des aufgenommenen Antigens auf einem MHC II-Molekül. Meist (außer bei Thymus-unabhängigen Antigenen) muss noch eine aktivierte T-Zelle mit dem auf MHC II präsentierten Antigen und dem costimulatorischen CD40-Rezeptor auf der Oberfläche interagieren, sowie mittels Zytokinen (IL-4, IL-5) die B-Zelle aktivieren (Abb. 1). Die aktivierte B-Zelle teilt sich daraufhin (klonale Expansion) und sezerniert als Plasmazelle Antikörper entsprechend ihrer Spezifität [1].

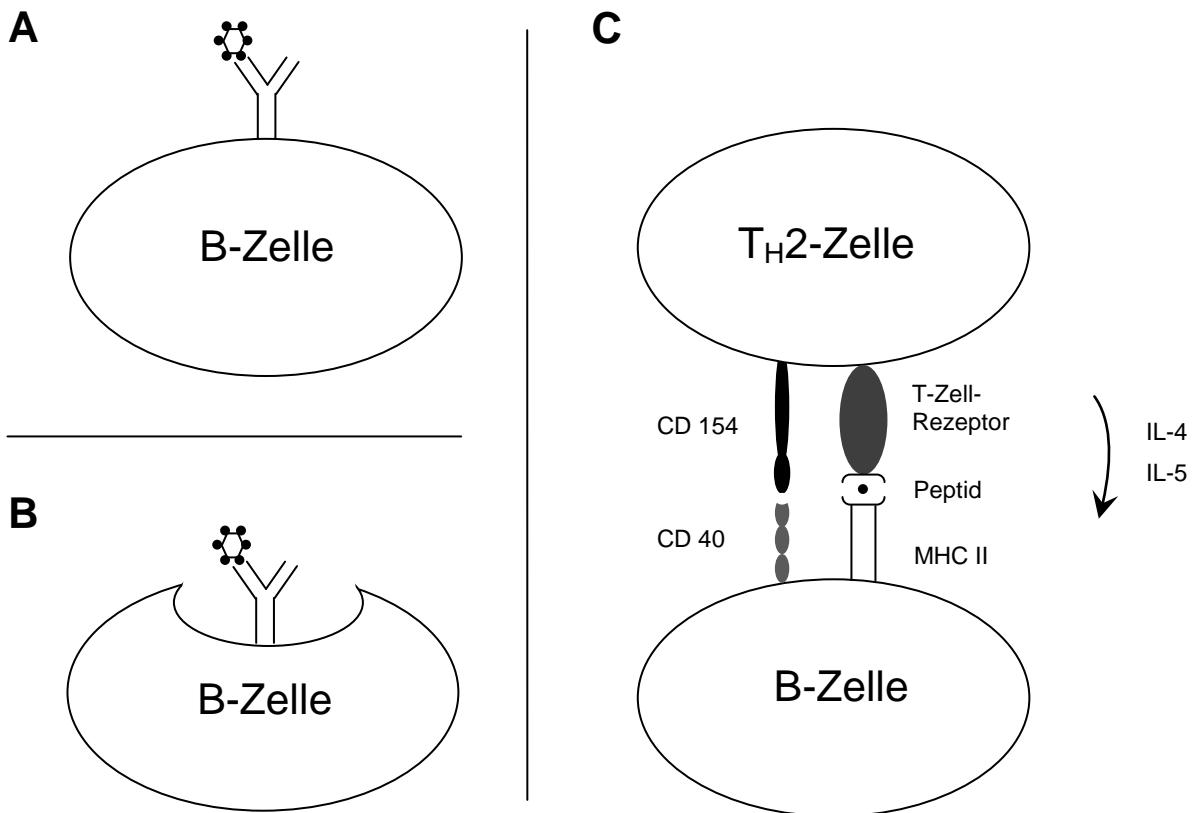


Abbildung 1:

Schematischer Ablauf der B-Zell-Aktivierung (in Anlehnung an JANEWAY [16]).

Bei Bindung des spezifischen Antigens an den Antigenrezeptor (A) internalisiert die B-Zelle den Rezeptor (B) und präsentiert anschließend Bestandteile des internalisierten Partikels auf der Zelloberfläche durch MHC II-Moleküle (C). Meist braucht es zur Aktivierung der B-Zelle noch die Interaktion mit einer ebenfalls aktiven T-Helferzelle. Der T-Zell-Rezeptor bindet hierzu an das auf MHC II präsentierte Peptid; costimulatorisch interagierende Moleküle sind auf der B-Zelle CD40 und auf der T-Zelle CD154. Die T-Helferzelle fördert ferner auch über IL-4 und IL-5 die Aktivierung der B-Zelle.

1.1.2.2 Humorale Komponenten des adaptiven Immunsystems

Zytokine, die eher dem adaptiven Immunsystem zuzuordnen sind, werden besonders von T-Lymphozyten produziert. Von großer Bedeutung sind hier vor allem IL-2, IL-4, IL-5 und IFN- γ . Diese Mediatoren sind wichtig für Entwicklung, Wachstum und Differenzierung von Lymphozyten und wirken aktivierend auf Effektorzellen, wie z.B. Makrophagen (INF- γ).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der humoralen Komponenten des adaptiven Immunsystems sind die von Plasmazellen produzierten Antikörper. Diese Immunoglobuline (Ig) sind Proteine, die aus zwei leichten und zwei schweren Ketten bestehen. Leichte und schwere Ketten haben eine variable Region, die die

Spezifität des jeweiligen Antikörpers vermitteln und an die das Antigen bindet. Es gibt fünf verschiedene Klassen von Immunglobulinen (Isotypen), die sich in ihren schweren Ketten unterscheiden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Der Antikörper IgD findet sich nur membranständig auf B-Zellen, alle anderen vier Antikörperklassen werden auch sezerniert (Abb. 2).

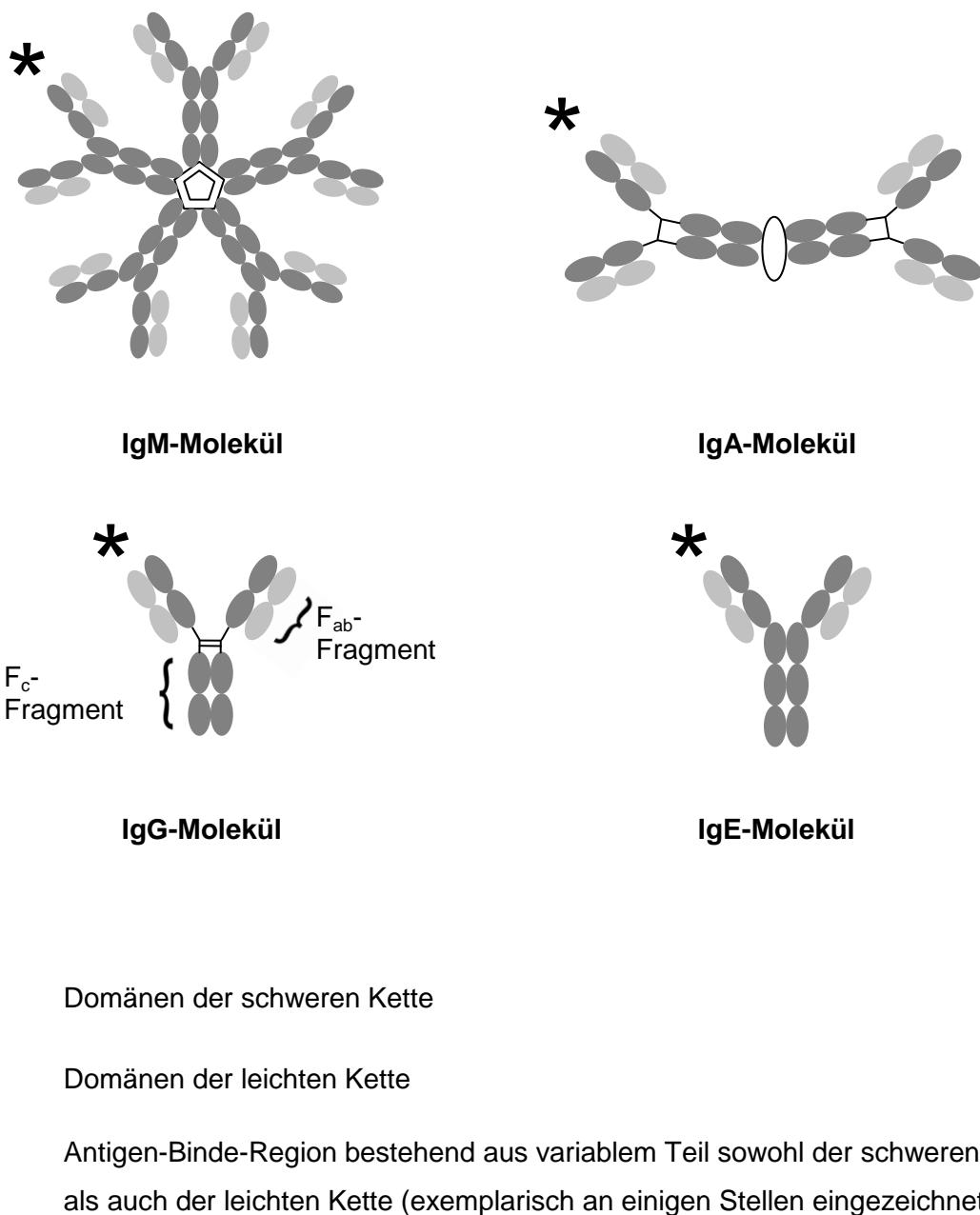


Abbildung 2:
Aufbau der verschiedenen sezernierten Antikörper-Isotypen.

Antikörper wirken nicht protektiv durch direkte Zerstörung des Erregers. Die Funktion dieser Proteine liegt vielmehr darin, die Oberfläche des Erregers zu besetzen (Neutralisierung) um ein „Andocken“ an Wirtszellen zu verhindern. Ferner aktivieren besonders IgM-Antikörper und bestimmte Subtypen der IgG-Antikörper das Komplementsystem über den klassischen Weg und sorgen so für eine Eliminierung des Erregers. Zudem werden Strukturen, welche an Antikörper gebunden sind, leichter von Phagozyten aufgenommen (Opsonierung). Hierzu bindet (z.B. bei IgG) das F_C-Fragment des Antikörpers (Abb. 2) an einen F_C-Rezeptor auf der Oberfläche professioneller Fresszellen.

Antikörper vom IgM-Typ zeichnen sich durch eine pentamere Struktur aus, haben jedoch eine relativ niedrige Affinität zum Antigen. Dieser Antikörpertyp wird bei primärem Kontakt mit einem Antigen gebildet. In geringer Menge kommt es zu diesem Zeitpunkt bereits zur Bildung von IgG-Antikörpern, jedoch wird IgG v.a. bei zweitem Kontakt mit dem Antigen produziert (Isotyp-Switch). IgG hat eine längere Halbwertszeit und eine höhere Affinität zum Antigen als IgM-Antikörper. Diese Affinität der Antikörper steigt mit zunehmendem Antigenkontakt weiter an (Affinitätsreifung) und führt somit zu einer optimierten Immunantwort. Im menschlichen Körper, gibt es 4 Subklassen von IgG-Molekülen (IgG1-IgG4), die sich in einigen Eigenschaften unterscheiden; eine andere Nomenklatur hingegen wird bei Mäusen verwendet. Hier gibt es IgG1, IgG2a, IgG2b und IgG3. Für das Maus-Modell gilt, dass die Bildung von IgG1-Antikörpern durch T_H2-Zellen gefördert wird; sie zeichnen sich durch eine gute Fähigkeit zur Opsonierung und zur Neutralisierung aus und können das Komplementsystem sehr gut über den klassischen Weg aktivieren. T_H1-Zellen hingegen begünstigen eher die Abwehr gegen intrazelluläre Erreger; dies erklärt, weshalb IgG2a-Antikörper, die bei Aktivierung von B-Zellen durch T_H1-Zellen gefördert werden, weniger gut in Opsonierung, Neutralisierung und Aktivierung des Komplementsystems sind [17]. Umgekehrt ist es möglich durch Messung der IgG1- und IgG2a-Antikörper abzuschätzen, welcher T-Helferzellsubtyp an der Immunantwort in der Maus beteiligt ist (Formel 1) [18, 19]. Schließlich gibt es noch dimere IgA-Antikörper. Diese dienen dem Schutz von Schleimhäuten und gelangen durch rezeptor-

vermittelte Transzytose durch das Epithel, IgE-Antikörper hingegen haben ihren physiologischen Sinn in der Abwehr von Parasiten.

Prinzipiell kann durch Beimischung sog. Adjuvantien wie z.B. Aluminiumhydroxid zu einem Antigen eine normale Immunantwort verstärkt und somit höhere Antikörpertiter erreicht werden.

$$T_H2 - \text{Zellen} \rightarrow \frac{IgG1}{IgG2a} > 1$$

Formel 1:

Abschätzung welcher Typus von T-Helferzelle an der Immunantwort in der Maus mitwirkt.

1.2 Sepsis

1.2.1 Geschichte und Definitionen

Das Wort „Sepsis“ bedeutet in etwa „Verwesung“, entstammt dem Altgriechischen und findet erste Erwähnung schon bei Homer [20]. Auch im Corpus Hippocraticum ist eine Krankheit beschrieben, die ein bis zwei Wochen nach Verwundung mit Fieber beginnt, durch eine „faulende Materie“ ausgelöst wird und oft mit dem Tod endet. Der Ätiologie der Erkrankung kam man erst mehr als zweitausend Jahre später durch die Begründung der modernen Mikrobiologie und der damit verbundenen Identifikation von Bakterien, Viren und Pilzen auf die Spur. Sepsis, so weiß man heute, ist vor allem eine dysregulierte Immunantwort auf eine Infektion, wobei der Fachterminus „Infektion“ als Eindringen von Erregern in den Organismus definiert ist. Hierbei kommt es in erster Linie zum Kontrollverlust des angeborenen Immunsystems. Da dieses aber eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des erworbenen Immunsystems spielt, wird nachfolgend auch jenes beeinflusst. Eine moderne Sepsisdefinition [21], erläutert diese Dysregulation wie folgt: „Sepsis ist die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem

Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskaden-systeme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen.“ Obgleich diese Definition dem derzeitigen Kenntnisstand gerecht wird, findet sie im klinischen Alltag und in der Forschung keine Verwendung. Den hier nötigen einheitlichen Gebrauch von Fachtermini und die Festlegung klinischer Diagnose-Kriterien wurden 1991 von dem *American College of Chest Physicians* und der *Society of Critical Care Medicine* auf einer Konsensus-Konferenz in Chicago geregelt [22]. Bis zu diesem Zeitpunkt waren Sepsis-Studien aufgrund uneinheitlicher Definitionen und Begriffe nur sehr schwer miteinander vergleichbar. Diese Fachgesellschaften übernahmen hierbei die von BONE [23] im Jahr 1989 postulierte, recht allgemein gehaltene Definition: „Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion.“ Neu eingeführt wurde auf dieser Konferenz der Begriff *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS). SIRS ist eine klinische Reaktion auf einen unspezifischen Insult, gekennzeichnet durch zwei der folgenden Kriterien:

- Körpertemperatur > 38 °C oder < 36 °C
- Tachykardie > 90/min
- Tachypnoe > 20/min oder $p_aCO_2 < 32 \text{ mm Hg}$
- Leukozyten > 12000/mm³ oder < 4000/mm³ oder
> 10% unreife Formen

Sollte SIRS aufgrund einer (klinisch oder mikrobiologisch diagnostizierten) Infektion auftreten, so definiert dies Sepsis. Wenn es sepsisbedingt zum Versagen eines oder mehrerer Organsysteme kommt, so handelt es sich um eine schwere Sepsis. Sepsisbedingte Hypotonie, trotz angemessener Volumensubstitution und/oder Notwendigkeit der Gabe von Vasopressoren zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Perfusionsdrucks, ist kennzeichnend für den septischen Schock. Dermaßen geänderte Organfunktion, bei der ohne intensivmedizinische Intervention die Homöostase nicht aufrechterhalten werden kann, ist als *multiple organ dysfunction syndrome* (MODS) definiert. MODS kann für

den Patienten tödlich enden und je ausgeprägter die Organdysfunktionen sind, desto höher die Letalität der Sepsis [24]. Während mittels intensivmedizinischer Maßnahmen heute viele Patienten die proinflammatorische Sepsis-Phase (SIRS) überleben, stellt die sich anschließende Phase des *compensatory anti-inflammatory response syndrome* (CARS) die moderne Medizin noch immer vor ein großes Problem. CARS ist charakterisiert durch ein verminderteres Vermögen des Organismus auf Infektionen zu reagieren. [25]. So kann in dieser Phase eine Infektion, hervorgerufen durch opportunistische Erreger, trotz Antibiotika-Therapie letal sein. Für das Überleben von Sepsis ist daher das richtige Gleichgewicht zwischen Immunsuppression und Inflammation entscheidend [26].

1.2.2 Epidemiologie

Allen Fortschritten der Intensivmedizin zum Trotz, bleibt Sepsis noch immer ein sehr häufiges Krankheitsbild mit schlechter Prognose, das in Krankenhäusern auf der ganzen Welt zu finden ist. Zwar haben ältere Menschen, immunsupprimierte Patienten sowie Personen mit schweren Komorbiditäten (z.B. Tumorerkrankungen) ein erhöhtes Risiko an Sepsis zu erkranken [27, 28], aber prinzipiell kann jeder Mensch diese Krankheit erleiden. Alleine in den USA ist die Erkrankung für den Tod von mehr als 200.000 Menschen pro Jahr verantwortlich und wird dort aufgrund steigender Inzidenz und Hospitalisierung sogar noch mehr an Bedeutung gewinnen [29, 30]. Mit Blick auf eine Sepsisinzidenz in Deutschland von 116 Fällen pro 100.000 Einwohner/Jahr und von schwerer Sepsis und septischem Schock bis zu 110 Fällen pro 100.000 Einwohner/Jahr, wird klar erkennbar, dass es sich bei der Sepsis um eine Erkrankung handelt, die eine enorme gesundheitsökonomische Bedeutung hat [27]. So kostet z.B. der Aufenthalt eines an schwerer Sepsis erkrankten Patienten auf der Intensivstation im Mittel mehr als 20.000 € [31-33]. Allein in Deutschland fallen für intensivmedizinische Behandlung von Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock direkte anteilige Kosten in Höhe von 1,77 Milliarden € an, inklusive indirekt anfallender Kosten sind sogar mit 6,3 Milliarden € zu rechnen [34]. Trotz enormen Mitteleinsatzes und besseren Verständnisses der pathophysiologischen

Vorgänge liegt die Letalität gerade dieser schweren Sepsis-Formen noch immer bei etwa 50% [27]. Sepsis und septischer Schock stellen damit nicht nur auf nicht-kardiologischen Intensivstationen die häufigste Todesursache dar [35], sondern nach einer Studie des „Deutschen Kompetenz-Netzwerk Sepsis“ sind septische Erkrankungen deutschlandweit die dritthäufigste Todesursache überhaupt [34]. Dabei bleibt die genaue Ursache für den Tod von erkrankten Patienten trotz verschiedenster schwerer Sepsis-bedingter Organschäden (häufig kardial, renal oder hepatisch) auch nach Autopsie in den meisten Fällen ungeklärt [26]. Ein weiterer Grund für die hohe Letalität der Sepsis ist, dass es zurzeit noch keine zuverlässigen biochemischen oder immunologischen Verfahren zur sicheren Sepsis-Diagnose gibt. So ist man auf die klinische Diagnose angewiesen. Da aber keine Sepsis-spezifischen Symptome existieren, sondern viele unspezifische Symptome Zeichen einer Sepsis sein können, wird die Diagnose häufig zu spät gestellt. Ferner ist die relativ lange Wartezeit auf mikrobiologische Befunde und die immer problematischer werdende Resistenzlage nosokomialer Keime einer der Gründe, weshalb eine adäquate Therapie oft nicht beizeiten begonnen wird, jedoch ist solch eine frühzeitige adäquate Behandlung vor allem mit Antiinfektiva (meist Antibiotika) entscheidend für die Senkung der Letalität [36-39].

1.2.3 Ätiologie und Pathogenese der Sepsis

Entscheidend für den Verlauf der Sepsis ist die Reaktion des Körpers und weniger Anzahl, Pathogenität oder Art der Erreger. Zwar sind inzwischen gram-positive vor gramnegativen Bakterien die häufigsten Mikroorganismen, die eine Sepsis auslösen [27, 29], aber es können auch Pilze, Viren, und Parasiten dieses Krankheitsbild verursachen. Die primäre Lokalisation der Infektion liegt in den meisten Fällen entweder pulmonal oder intraabdominal [27, 40, 41]. Bei Sepsis kommt es vor allem durch Bindung von Erregerbestandteilen an PRRs zu übermäßiger Stimulierung des angeborenen Immunsystems. Besonders gut ist hierbei die Stimulation durch LPS untersucht. Lipopolysaccharide bilden mit dem PRR *LPS Binding Protein* einen Komplex, der an *toll-like receptor* (TLR) 4 und

weitere auf der Oberfläche von Makrophagen oder dendritischen Zellen befindliche Proteine bindet [42]. TLRs sind verantwortlich für die Initiierung intrazellulärer Signalkaskaden, die schließlich über den Transkriptionsfaktor NF- κ B zur Bildung einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine führen. Während bei der physiologischen Reaktion auf ein Infektionseignis die Wirkung proinflammatorischer Zytokine durch neg. Feedback-Mechanismen (Ausschüttung von Antagonisten und antiinflammatorischer Zytokine) gehemmt wird und so der Körper die Entzündungsreaktion quantitativ und zeitlich begrenzt, scheint bei Sepsis diese Hemmung unzureichend oder zu spät zu erfolgen. Es kommt daher zu einer „Überflutung“ des Organismus mit Zytokinen (SIRS). Schon lange ist bekannt, dass TNF eine besonders wichtige Rolle in der frühen Phase der Sepsis-Pathogenese spielt und Symptome eines septischen Schocks verursachen kann [43]. Durch die Wirkung dieses und weiterer Zytokine, wie IL-1 und IL-6, sezerniert vor allem von Zellen des angeborenen Immunsystems, kommt es im Sinne einer Kaskade zu weiterer Ausschüttung verschiedener Zytokine und auch zur Aktivierung weiterer Zellen, wie neutrophiler Granulozyten und Endothelzellen, die ihrerseits den Entzündungsprozess vorantreiben. Durch Bindung von Zytokinen an Rezeptoren auf der Oberfläche verschiedenster Zellen kommt es in großem Umfang zur Bildung sehr unterschiedlicher teils antagonisierender Mediatoren wie z.B. Stickstoffmonoxid, Endothelin, Thromboxan A₂ und Sauerstoffradikalen. Die Wirkung dieser Mediatorexplosion auf die Organsysteme des menschlichen Körpers ist sehr vielfältig; es kann z.B. im Gefäßbett zur Vasodilatation und erhöhten Permeabilität, gleichzeitig aber auch zur disseminierten intravasalen Gerinnung und Aktivierung des Komplementsystems kommen. Die Vasodilatation sowie die erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität und die bei schwerer Sepsis auftretende Kardio-myopathie können zu Minderperfusion und somit zu Organdysfunktion sowie zum septischen Schock führen. Im Anschluss an diese proinflammatorische Phase stellen sich nach einer individuell unterschiedlichen Verzögerung von einigen Tagen Gegenregulationsmechanismen des Körpers (CARS) ein. Es kommt hierbei zur Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine, wie IL-4, IL-10, IL-13, TGF- β sowie weiterer hemmender Mediatoren, wie Komplementsystem-

inaktivatoren, löslichen TNF-Rezeptoren und IL-1 Rezeptor-Antagonisten (Abb. 3). Ferner ist eine ausgeprägte Apoptose von Lymphozyten und eine Verschiebung des T_H1/T_H2 -Verhältnisses in Richtung T_H2 zu beobachten [44]. Im Gegensatz zu ersteren produzieren die T_H2 -Zellen antiinflammatorische Zytokine. Im Prinzip ist diese Gegenregulation (Immunsuppression) sinnvoll, kommt aber bei Sepsis zu spät bzw. ist ebenfalls überschießend und führt somit evtl. zur völligen Immunparalyse, in der der Körper gegenüber Infektionen vermehrt empfindlich ist. Weiteres wichtigstes Charakteristikum dieser Immunparalyse nach Sepsis ist die Unfähigkeit auf einen Stimulus hin TNF zu produzieren [45, 46]. Gezeigt wurde bereits, dass im Tiermodell, das auch in dieser Arbeit verwendet wurde, am zweiten Tag nach induzierter Sepsis eine Immunparalyse vorliegt [47, 48].

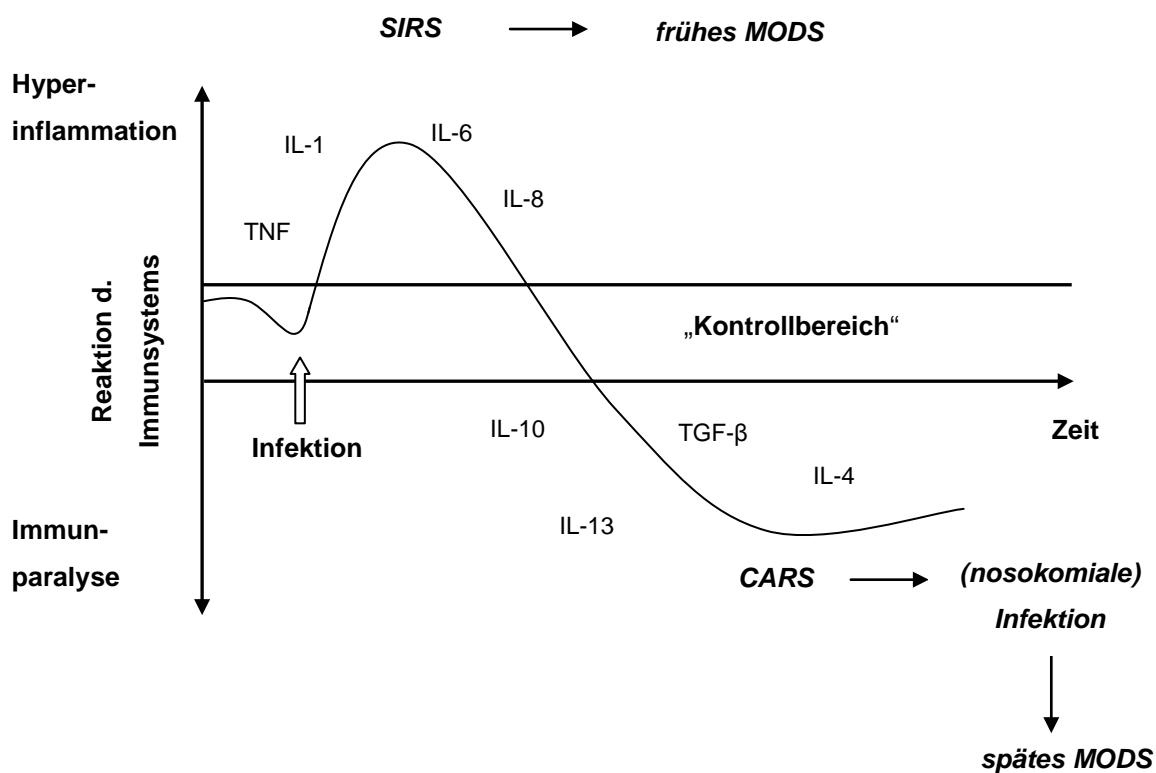


Abbildung 3:

Zeitverlauf der Immunreaktion bei Sepsis (in Anlehnung an GRIMMINGER et al [49]).

Bei Sepsis folgt der Phase der Hyperinflammation eine Phase der Immunsuppression.

1.2.4 Therapie der Sepsis

Die Sepsistherapie besteht aus 4 Eckpfeilern [50]. Neben bereits erwähnter antimikrobieller Therapie sind dies die spezielle Sepsistherapie, die chirurgische Herdsanierung und schließlich unterstützende Maßnahmen, wie z.B. Katecholamin- und Volumentherapie. Zur speziellen Sepsistherapie der schweren Sepsis zählt vor allem das aktivierte Protein C mit seinen antikoagulatorischen, fibrinolytischen und antiinflammatorischen Wirkungen [51]. Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz dieses Therapeutikums bei schwerer Sepsis die Organ-dysfunktion verringerte [52] und das Überleben verbesserte [53, 54]. Seither wird die Anwendung in den Therapie-Leitlinien unter bestimmten Voraussetzungen empfohlen [55, 56]. Jedoch konnte eine im Jahr 2008 veröffentlichte Meta-Analyse [57] die Letalitätssenkung nicht bestätigen. Außerdem sollte der Einsatz dieser sehr kostenintensiven Therapie [58-60] stets individuell kritisch abgewogen werden, da ein erhöhtes Blutungsrisiko mit diesem Therapeutikum in Kauf genommen wird [61]. Noch kontroverser ist die Diskussion über spezielle Sepsistherapie mit Kortikosteroiden. Offenbar kann es sein, dass bei septischem Schock effektiv zu wenig immunmodulatorische Wirkung des endogenen Cortisol vorliegt. Bedingt ist dies durch periphere Cortisol-Resistenz und eine durch Störung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse hervorgerufene relative Nebennierenrindeninsuffizienz, welche prognostisch eine große Bedeutung hat [62]. Während schon seit langem umstritten ist, dass hochdosierte Kortikoidtherapie die Letalität der Sepsis erhöht [63, 64], scheint die Gabe von niedrig dosiertem Hydrokortison (Stressdosen) durch Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes die Hämodynamik von Patienten im septischen Schock zu verbessern. Insgesamt kommt es somit zu einer geringeren Therapiedauer mit Vasopressoren [65, 66]. Weiterhin begrenzt Hydrokortison die überschießende proinflammatorische Reaktion und soll insgesamt durch dieses Wirkungsprofil die Überlebenschancen von Patienten im septischen Schock verbessern [67], wobei eine im Jahr 2008 veröffentlichte Studie diesen Überlebensvorteil nicht bestätigen konnte [68].

Die vier oben erwähnten Eckpfeiler zeigen schon auf, dass die Therapie bisher eher supportiven Charakters ist. Eine große Anzahl von Therapieansätzen mit dem Ziel in das komplexe Zytokin-Netzwerk einzugreifen, schlug fehl bzw. war nur für kleine Subgruppen von Patienten von Vorteil [69]. Sowohl die Injektion von Antikörpern gegen LPS [70], die Anti-TNF-Therapie [71-73] und die Verabreichung von IL-1-Rezeptor-Antagonisten [74, 75] brachten bisher keinen Erfolg. Weshalb diese Studien genau scheiterten, ist nicht klar und mögliche Erklärungsansätze gibt es viele. Einerseits ist vermutlich unser Wissen über die komplexe Interaktion zwischen Erreger und Immunsystem noch nicht ausreichend. Anderseits kann angeführt werden, dass die - wie in vielen Studien verfolgte - alleinige Hemmung eines Zytokins aufgrund der in Kapitel 1.1.1.2 beschriebenen Redundanz der Zytokine evtl. nicht ausreicht. Weiterhin ist anzumerken, dass ein Therapieversuch durch Hemmung proinflammatorischer Zytokine nach Diagnose SIRS-definierender Symptome schon zu spät sein könnte und dass eine adäquate Entzündungsantwort zur Elimination der Erreger essenziell ist [76]. Ferner darf der biphasische antagonisierende Verlauf dieser Erkrankung nicht unberücksichtigt bleiben; so ist es vielleicht überhaupt nicht möglich eine universell wirksame Therapie zu finden, denn z.B. eine rein anti-hyperinflammatorische Therapie zum falschen Zeitpunkt könnte die CARS-Phase verlängern [77] bzw. eine Immunparalyse begünstigen. Sollte es aber möglich werden, SIRS und CARS diagnostisch sicher zu trennen, wäre es denkbar, dass in Zukunft zwei differenzialtherapeutische Ansätze die Therapie der Sepsis bestimmen.

Da CARS häufig den Tod von Sepsis-Patienten verursacht, ist es von großer Bedeutung, der Immunparalyse selbst und Mechanismen, die zu ihr führen, auf den Grund zu gehen. Mögliche derzeit experimentelle Ansatzpunkte hierzu werden in Kapitel 5.2 näher diskutiert.

1.2.5 Sepsis-Modelle

Um die komplexen Vorgänge bei Sepsis im menschlichen Körper besser verstehen zu können, versuchte man schon seit langem mittels Tiermodellen der Erkrankung auf die Spur zu kommen. Die wichtigsten Modelle werden im Folgenden kurz erläutert.

1.2.5.1 Injektionsmodelle

Schon früh zeigte sich, dass LPS als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien eine Rolle bei Sepsis spielen kann. Daher wurden viele Tierversuche mit diesem Glykolipid durchgeführt. Verschiedenste Ausführungen der Modelle kamen hier zur Anwendung: Intraperitoneale, parenterale Injektion, Verabreichung in einem Bolus oder über die Zeit verteilt mittels eines Pumpsystems. In diesen LPS-Injektionsmodellen konnte man viele klinische Symptome des septischen Schocks wiederfinden. Eine Weiterentwicklung dieser Modelle bestand in der direkten Injektion von Bakterien. Der Vorteil liegt darin, dass nicht nur LPS als Stimulus für das Auslösen der Sepsis verantwortlich ist, sondern auch andere Bestandteile der Bakterien. Ferner können sich lebende Bakterien, wie in Realität bei Sepsis, teilen.

1.2.5.2 Peritonitismodelle

Die Peritonitismodelle sind derzeit Goldstandard der Sepsis-Tiermodelle und tragen der Tatsache Rechnung, dass Sepsis nicht selten postoperativ auftritt und dass eine Infektion im Abdomen eine häufige primäre Lokalisation ist [27, 40, 41]. Sowohl der bei diesen Tiermodellen vorgenommene operative Eingriff selbst als auch die durch den Mix natürlicher Darmbakterien hervorgerufene Peritonitis sind Gründe dafür, warum diese Modelle der Realität näher kommen als die zuvor dargestellten Injektionsmodelle. Die beiden wichtigsten Modelle hierbei sind die *colon ascendens stent peritonitis* (CASP) und die *cecal ligation and puncture* (CLP). Bei CASP wird den Tieren während einer kurzen Operation ein Stent implantiert, der eine Verbindung zwischen Colon ascendens und Peritonealhöhle

schafft [78]. Hierdurch kommt es zu einem permanenten Übertritt von Bakterien aus dem Darmlumen in das Peritoneum. CASP ist ein häufig verwendetes Modell für eine Anastomoseninsuffizienz nach abdominellen chirurgischen Eingriffen und damit verbundener diffuser Peritonitis. CLP ist ebenfalls ein gut etabliertes Peritonitismodell, bei der das Zökum mit einem Faden abgebunden und der abgebundene Darm mit einer Nadel punktiert wird, um schließlich Darminhalt aus der kleinen Öffnung zu pressen [79]. Im Gegensatz zu CASP hat CLP den Vorteil, dass es zur Einbettung des verletzten Darmabschnittes in Fibrin und somit zur Lokalisation der Infektion [80] kommt. In dieser Arbeit ist daher das CLP-Modell verwendet worden.

1.3 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, im Mausmodell zu untersuchen, ob die Immunparalyse nach Sepsis einen Einfluss auf die primäre Antikörperproduktion der Tiere hat und welchen Einfluss der Faktor Zeit hierbei spielt.

2 Materialien

2.1 Chemikalien und Reagenzien

4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Albumin from chicken egg white	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aluminiumhydroxid (Imject® Alum)	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
Diethanolamin	Merck, Darmstadt
Diethylether	Acros Organics, Geel, Belgien
Ethanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ketamin 10% (Ketaminhydrochlorid)	WDT, Garbsen
Magermilchpulver	Granovita, Lüneburg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
TMB Substrate Reagent Set	Becton Dickinson, Heidelberg
Tris (Trishydroxymethylamino-methan)	USB Corporation, Cleveland, OH, USA
Tween® 20	Fluka-Chemie, Buchs, Schweiz
Xylazin 2% (Xylazinhydrochlorid)	CP-Pharma, Burgdorf

2.2 Puffer und Lösungen

ELISA-Blockierungs-Lösung	5% (w/v) Magermilchpulver in PBS
ELISA-Substratpuffer (AP)	24 mM MgCl ₂ 9,8% (v/v) Diethanolamin in demineralisiertem (dem.) H ₂ O (pH = 9,8)
ELISA-Substratlösung (AP)	0,1% (w/v) 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz in ELISA-Substratpuffer (AP)
ELISA-Waschlösung (TBS-Tween)	0,05% (v/v) Tween [®] 20 in TBS
PBS-Puffer	137 mM NaCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl in dem. H ₂ O (pH = 7,3)
TBS-Puffer	140 mM NaCl 3 mM KCl 16 mM Tris in dem. H ₂ O (pH = 7,4)

2.3 Antikörper

anti-mouse IgG (whole molecule)	SIGMA-Aldrich, Steinheim
anti-mouse IgG1	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-mouse IgG2a	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-mouse IgM (μ -chain specific)	SIGMA-Aldrich, Steinheim

2.4 Tiere

NMRI-Mäuse	Harlan Winkelmann, Borchsen
------------	-----------------------------

2.5 Verbrauchsmaterialien

ELISA-96-Loch-Platten:

Nunc-Immuno 96 MicroWell	Nunc, Roskilde, Dänemark
Plate Maxisorb	
Baumwollfaden (Durchmesser 0,12 mm)	Hautum Stoffe, Regensburg
Kanülen (Durchmesser 0,4 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Parafilm® "M"	Petchiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Spritzen (1 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Wundklammern (7,5 mm x 1,75 mm)	Tierärztebedarf Lehnecke, Schortens

2.6 Geräte

ELISA-Reader:

Fusion™ Universal Microplate Analyzer	Packard Bioscience, Rodgau-Jügesheim
---------------------------------------	--------------------------------------

Vortexer:

MS2 Minishaker	IKA Works, Wilmington, NC, USA
----------------	--------------------------------

Waagen:

CP224S	Sartorius, Göttingen
PJ400	Mettler, Gießen

Zentrifuge:

Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg
-----------------	--------------------

2.7 Software

Microsoft Excel 2003
SPSS für Windows 15.0

Microsoft, Redmond, WA, USA
SPSS, Chicago, IL, USA

3 Methoden

3.1 Tierexperimentelle Methoden

3.1.1 Tierhaltung

Alle verwendeten Mäuse waren 8 Wochen alte weibliche NMRI-Mäuse. Sie wurden entsprechend der Haltungsvorschriften untergebracht, hatten einen 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus und erhielten die speziesspezifische Standarddiät und Leitungswasser ad libitum.

3.1.2 Anästhesie

Die Anästhesie erfolgte durch eine intraperitoneal applizierte Injektion von 10 µl/g Maus einer sterilen Lösung aus 7,5% Ketamin (10% Ketaminhydrochlorid) und 8% Xylazin (2% Xylazinhydrochlorid) in PBS. Der Erfolg der Anästhesie wurde durch Drucktest an den Hinterpfoten sichergestellt.

3.1.3 Laparotomie

Alle operativen Eingriffe sind unter keimarmen Bedingungen durchgeführt worden. Um Infektionen mit exogenen Erregern zu vermeiden, wurden sämtliche Geräte sowie die Arbeitsflächen sorgfältig mit Wasser gereinigt und mit Ethanol (70%) desinfiziert.

3.1.3.1 Zökale Ligatur und Perforation (CLP)

Die Induktion einer experimentellen septischen Peritonitis wurde mittels CLP durchgeführt. Nach Sicherstellung der vollständigen Anästhesie wurden die Tiere aus dem Käfig genommen, auf den Rücken gelegt und der kaudale ventrale Bereich des Fells, besonders das Hypogastrium mit Ethanol (70%) angefeuchtet.

Anschließend wurden Fell und Peritoneum mit einem ca. 1 cm langen Schnittes entlang der Linea alba aufgeschnitten. Dann wurde das Zökum identifiziert, vorsichtig aus der engen Öffnung gezogen und auf ein zurechtgeschnittenes und desinfiziertes Stück Parafilm® gelegt. Schließlich wurden die distalen 30% des Zökums mit einem Baumwollfaden der Stärke 0,12 mm abgebunden und die überstehenden Enden des Fadens entfernt. Die nachfolgende Perforation erfolgte mittels Einstich einer sterilen Kanüle (0,4 mm Durchmesser) in den abgebundenen Teil des Blinddarms. Durch die kleine Öffnung wurde ein wenig Darminhalt herausgepresst. Nach Perforation wurde das Zökum vorsichtig in das Peritoneum zurückgelegt und Bauchdecke und Fell gemeinsam durch drei Wundklammern verschlossen. Die operierten Mäuse wurden in frisch eingestreute Käfige gelegt und bis zum Erwachen regelmäßig kontrolliert.

3.1.3.2 „Sham-OP“

Die *Sham-OP* (engl.: *sham* = fingiert) ist eine vorgetäuschte CLP. Die Behandlung der Mäuse, an denen solch eine Operation durchgeführt wurde, war identisch mit der Behandlung der Mäuse, die eine CLP erhielten, jedoch wurde hier nach Identifizierung des Zökums dieses zurück in den Situs gelegt und ohne Ligation und ohne Punktionsnadel die Bauchdecke zusammen mit dem Fell geschlossen.

3.1.4 Immunisierung

Die Immunisierung erfolgte mittels einer sterilen Kanüle (0,4 mm Durchmesser) subkutan in beide Hinterpfoten. Je Hinterpfote wurden 50 µl injiziert, bestehend aus 25 µl PBS, in das 16,6 µg Ovalbumin (Albumin from chicken egg white) gelöst waren, emulgiert mit 25 µl Aluminiumhydroxid (Imject® Alum) als Adjuvans.

3.1.5 Gewinnung von Serum

Am 8. Tag nach der Immunisierung erfolgte unter Narkose mit Diethylether die Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus. Unmittelbar danach wurden die Mäuse durch Genickzug getötet.

Zur Gewinnung von Serum aus Vollblut wurde das abgenommene Blut eine Stunde bei Raumtemperatur und anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde es bei 6000 rpm für 5 min zentrifugiert, das Serum vorsichtig abgenommen, aliquotiert und bei -20 °C bis zur Untersuchung (siehe 3.3.2 und 3.3.3) eingefroren.

3.1.6 Bildung von Pool-Serum

Falls mehrere Mäuseseren nicht einzeln analysiert, sondern vor der Analyse zu einem sog. Pool-Serum zusammengefasst wurden, so wurde sichergestellt, dass jede in diesem Pool enthaltene Maus eine zum Pool-Volumen gleich großen Anteil beitrug.

3.2 Versuchsplanung

3.2.1 Untersuchung der Antikörperantwort nach Immunisierung während der Immunparalyse

Mehrere Gruppen à 5 NMRI-Mäuse wurden unterschiedlich behandelt, um den Einfluss der Immunparalyse auf die Antikörperproduktion zu untersuchen. Eine Gruppe („neg. Kontrolle“) wurde nur immunisiert (siehe 3.1.4). Die übrigen Gruppen erhielten 2 Tage vor der Immunisierung jeweils eine unterschiedliche Behandlung. Eine Mausgruppe („nur Narkose“) wurde nur narkotisiert (siehe 3.1.2). Tiere einer weiteren Gruppe („Sham-OP“) wurde das Peritoneum eröffnet und wieder verschlossen, ohne den Blinddarm abzubinden und zu perforieren (siehe 3.1.3.2). Den Mäusen der vierten Gruppe („CLP“) wurde der Blinddarm abgebunden und perforiert (siehe 3.1.3.1), wodurch bei dieser Gruppe die

Immunisierung 2 Tage danach in die Immunparalyse-Phase fiel. Durch die Gruppen „nur Narkose“ und „Sham-OP“ sollte festgestellt werden, ob Narkose oder die reine Laparotomie ohne Darmperforation (Sham-OP) einen Einfluss auf die Antikörperantwort haben. Am 8. Tag nach Immunisierung wurde allen Mäusen Blut abgenommen (siehe 3.1.5) und per *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) die Antikörper im Serum gemessen (Abb. 4).

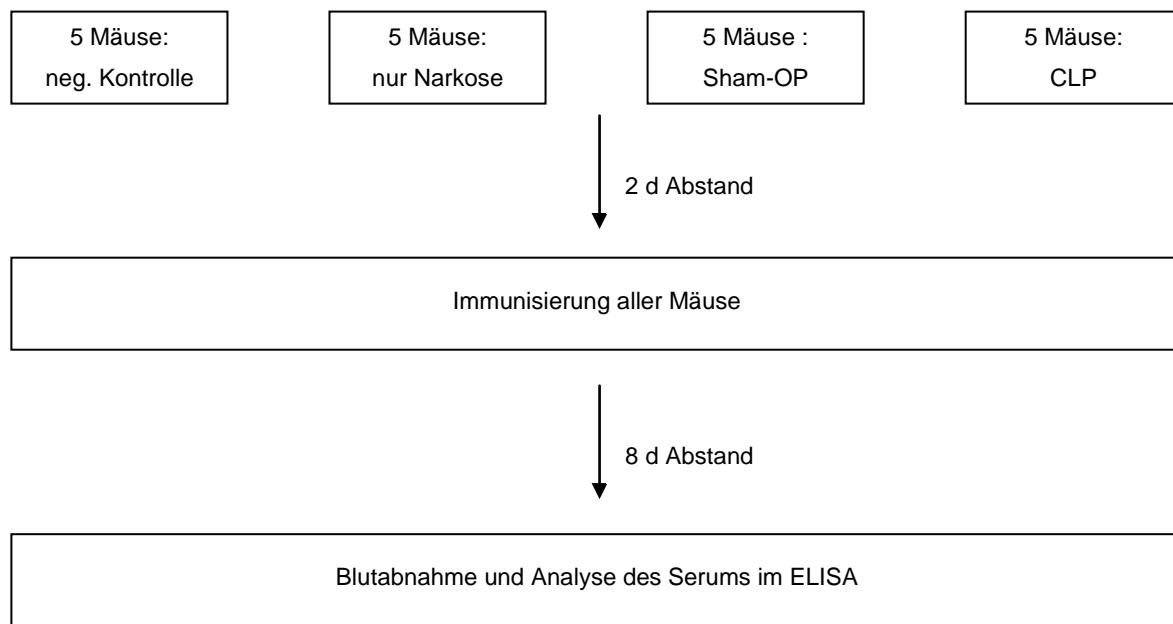


Abbildung 4:

Versuchsplan zur Untersuchung der Antikörperantwort nach Immunisierung während der Immunparalyse. Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurden die Antikörper-Werte im Serum bestimmt. Die Mäuse waren entweder nicht vorbehandelt („neg. Kontrolle“) oder wurden 2 Tage vor Immunisierung entweder nur narkotisiert („nur Narkose“), nur laparotomiert („Sham-OP“) oder einer CLP unterzogen.

3.2.2 Untersuchung des zeitabhängigen Einflusses einer septischen Peritonitis auf die Antikörper-Antwort

Zur Untersuchung wie sich unterschiedliche zeitliche Abstände zwischen CLP und Immunisierung auf die Antikörperantwort auswirken, wurden Tiergruppen ($n = 5$ pro Gruppe) an verschiedenen Tagen nach CLP immunisiert (siehe 3.1.4). Acht Tage nach der Immunisierung wurde den Tieren Blut abgenommen, das Serum jeder Gruppe gepoolt (siehe 3.1.6) und die Antikörpermenge im ELISA

gemessen. Aufgrund des Umfangs wurde der Versuch in zwei Teilen durchgeführt (Versuchsteil A und Versuchsteil B). Zur Detektion der Nachweisgrenze des Testsystems enthielt jeder Versuchsteil eine Gruppe mit unbehandelten Mäusen. Außerdem beinhaltete jeder der beiden Teile zusätzlich eine Gruppe „ohne CLP“, die lediglich immunisiert wurde. Zusätzlich wurden zur versuchsinternen Standardisierung und zur Bestimmung der interindividuellen Schwankungsbreite noch 5 Mäuse immunisiert, die ebenfalls keine CLP erhalten hatten und deren Serum nicht zu einem Pool zusammengefasst wurde (Abb. 5).

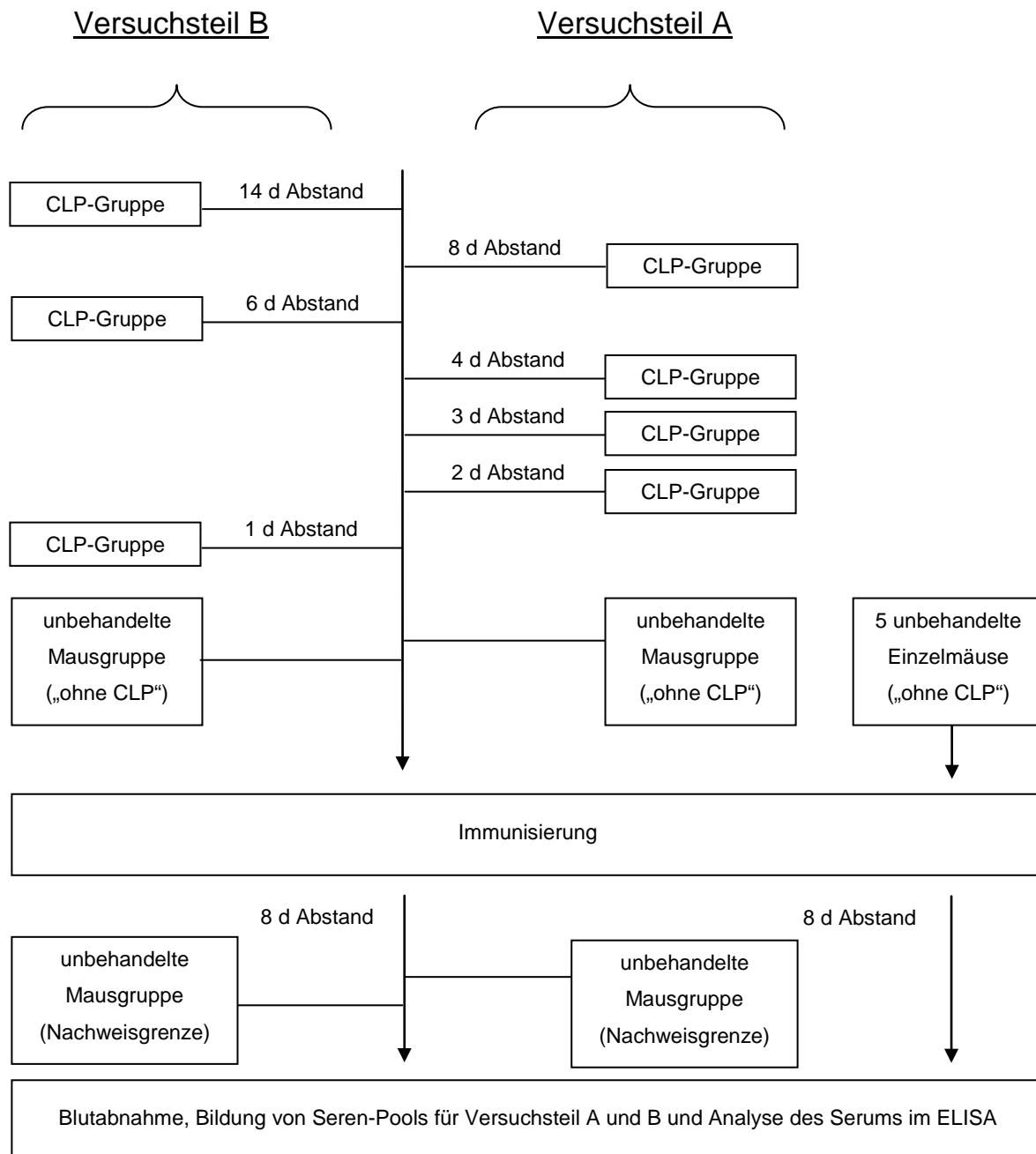


Abbildung 5:

Versuchsplan zur Untersuchung des zeitabhängigen Einflusses einer septischen Peritonitis auf die Antikörper-Antwort.

Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurde aus einem Pool der Seren bzw. aus den Einzelmäusen („ohne CLP“) die Antikörper-Menge bestimmt. Vor der Immunisierung wurden die Mäuse im angegebenen zeitlichen Abstand einer subletalen CLP unterzogen.

3.3 „Enzyme-linked immunosorbent assay“

3.3.1 Allgemeines Prinzip der ELISA-Methode

Zur quantitativen Bestimmung der Antikörper im Serum der Mäuse wurde ein ELISA durchgeführt. Die Detektion von Antikörpern mittels dieses Assays wurde erstmals 1972 von ENGVALL und PERLMANN beschrieben [81]. Das Prinzip des ELISAs besteht darin, dass zum Nachweis von Antikörpern diese in verschiedenen Verdünnungen direkt bzw. indirekt an die feste Phase einer Mikrotiterplatte gebunden werden. Sogenannte *Detection-Antikörper*, die mit einem Enzym markiert sind, binden spezifisch an die nachzuweisenden Antikörper und lösen nach Zugabe von Enzym-spezifischem Substrat eine Farbreaktion aus. Die Intensität der Farbe ist dabei von der an die Mikrotiterplatte gebundene Antikörpermenge abhängig. Mit monochromatischem Licht der Wellenlänge des Absorptionsmaximums λ_{\max} des entstandenen Produktes wird im Photometer die Transmission nach Farbreaktion gemessen (Formel 2) und direkt umgerechnet in die Absorption (Formel 3).

$$T = \frac{I}{I_0}$$

T = Transmission

I = Intensität des monochromatischen Lichtes bei λ_{\max} nach Durchgang durch Lösung

I_0 = Intensität des monochromatischen Lichtes bei λ_{\max} vor Durchgang durch Lösung

Formel 2:

Definition der Transmission.

$$A = -\log_{10} T$$

A = Absorption

T = Transmission

Formel 3:

Zusammenhang zwischen Absorption und Transmission.

3.3.2 Bestimmung der Ovalbumin-spezifischen Antikörper

Ovalbumin-spezifische Antikörper wurden mittels indirektem ELISA nachgewiesen (Abb. 6). Hierzu wurden die *wells* einer 96-Loch-Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno 96 MicroWell Plate Maxisorb) mit 100 µl/*well* einer Lösung von 10 µg/ml Ovalbumin in PBS beschichtet und über Nacht bei 4 °C inkubiert. In einem weiteren Schritt erfolgte das Waschen der Mikrotiterplatten mit TBS-Tween (dreimal 300 µl/*well*). Anschließend wurden alle noch offenen Proteinbindungsstellen mit 300 µl/*well* einer Blockierungs-Lösung, bestehend aus 5% (w/v) Magermilchpulver in PBS, besetzt. Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die ELISA-Platten gewaschen (siehe oben) und 100 µl/*well* des zu untersuchenden Serums in verschiedenen Verdünnungen in PBS aufgetragen. Nach Lagerung der Mikrotiterplatten für 4 Stunden bei Raumtemperatur wurden sie erneut gewaschen (siehe oben), um nicht-gebundene Antikörper wieder aus den ELISA-Platten zu spülen. Danach wurden die sog. *Detection*-Antikörper (100 µl/*well*) aufgetragen und für 90 Minuten bei Raumtemperatur auf den Platten belassen. Für die Messung der gesamten Ovalbumin-spezifischen IgG-Antikörper-Menge wurde der Detektions-Antikörper anti-mouse-IgG (whole molecule), der mit dem Enzym AP (alkalische Phosphatase) markiert ist, in einer Verdünnung von 1 : 30.000 in PBS verwendet. Die gleiche Verdünnung wurde bei dem ebenfalls AP-gekoppelten *Detection*-Antikörper anti-mouse-IgM (µ-chain specific) zur Messung der Ovalbumin-spezifischen IgM-Antikörper-Menge benutzt. Bei der Ovalbumin-spezifischen IgG1-Antikörper-Antwort (anti-mouse IgG1) bzw. IgG2a-Antikörper-Antwort (anti-mouse IgG2a) wurden beide Antikörper in einer Verdünnung von 1 : 1.000 in PBS aufgetragen. Diese beiden *Detection*-Antikörper sind mit dem Enzym HRP (Meerrettichperoxidase) gekoppelt. Nach einem letzten Waschschritt (siehe oben) erfolgte die Auftragung des Substrats (100 µl/*well*). Für die AP-gekoppelten Antikörper besteht das Substrat aus 0,1% (w/v) 4-Nitrophenylphosphat Dinatriumsalz in ELISA-Substratpuffer (AP). Nach etwa 30 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit 50 µl/*well* 3 M NaOH gestoppt und anschließend konnte im ELISA-Reader bei 405 nm die Absorption gemessen werden. Bei den HRP-gekoppelten Antikörpern wurde nach dem Auftragen der Substratlösung (TMB Substrate

Reagent Set) nach etwa 20 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur die Reaktion mit 50 µl/well 1 M H₂SO₄ abgestoppt und die Absorption der Mikrotiterplatten im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen.

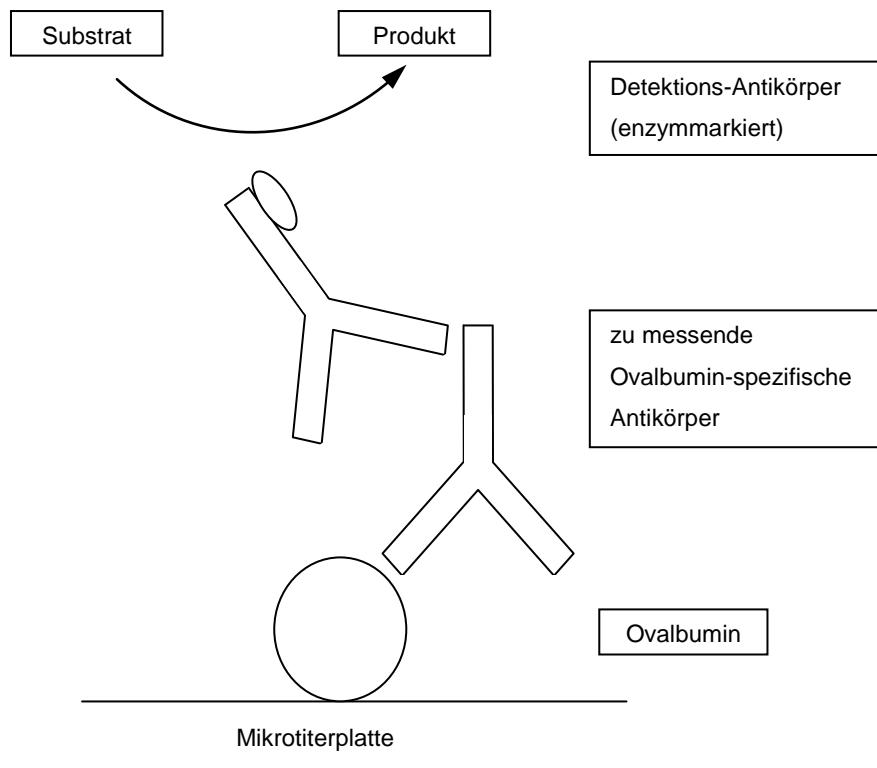


Abbildung 6:
Schematische Darstellung des verwendeten indirekten ELISAs zur Messung der Ovalbumin-spezifischen Antikörpermenge in den Seren der untersuchten Mäuse.

3.3.3 Bestimmung der unspezifischen Antikörper

Die Bestimmung der Gesamt-IgG- und Gesamt-IgM-Antikörper wurde mittels direktem ELISA durchgeführt (Abb. 7). Die 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden hierzu in verschiedenen Verdünnungen direkt mit Serum (100 µl/well) beschichtet. Nach Lagerung der 96-Loch-Platten bei 4 °C über Nacht wurden die Mikrotiterplatten gewaschen und die noch offenen Proteinbindungsstellen blockiert (analog zu Kapitel 3.3.2). Nach 2 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurden die ELISA-Platten wieder gewaschen (siehe oben) und anschließend die AP-gekoppelten *Detection-Antikörper anti-mouse IgG (whole*

molecule) bzw. anti-mouse IgM (μ -chain specific) in einer Verdünnung von 1 : 30.000 in PBS aufgetragen und für 90 Minuten bei Raumtemperatur in den Platten stehen gelassen. Dann wurde nochmals gewaschen (siehe oben), um die nicht gebundenen *Detection-Antikörper* wieder aus der Platte zu entfernen. Schließlich wurde die AP-Substratlösung (siehe oben) aufgetragen und nach etwa 30 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur die Reaktion mit 50 μ l/well 3 M NaOH gestoppt. Die Mikrotiterplatte wurde im ELISA-Reader bei 405 nm ausgelesen.

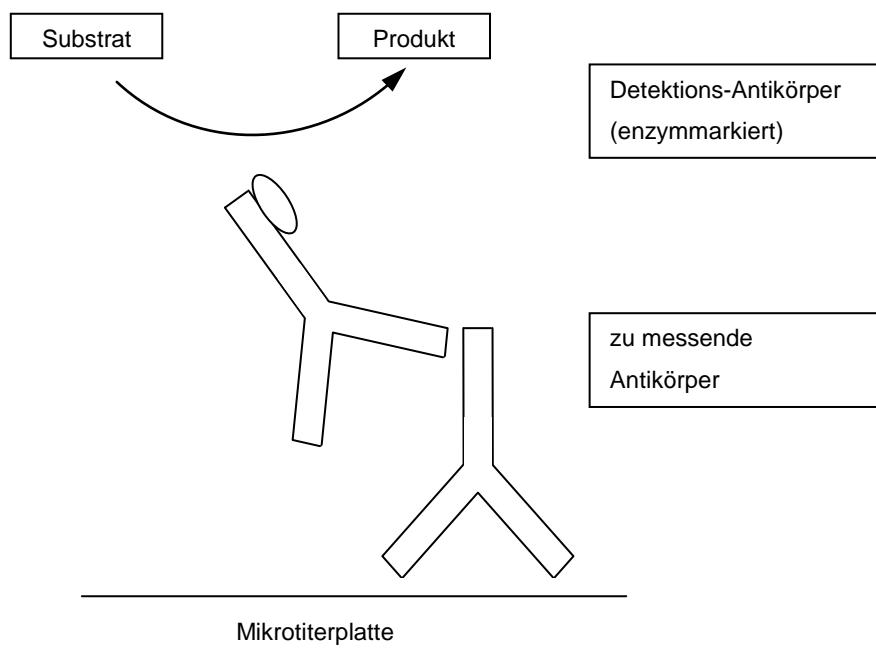


Abbildung 7:

Schematische Darstellung des verwendeten direkten ELISAs zur Messung der Gesamt-IgG- und Gesamt-IgM-Antikörpermenge in den Seren der untersuchten Mäuse.

3.3.4 ELISA-Auswertung

Auf jeder ELISA-Platte wurde ein Leerwert mitgeführt. Dieser wurde identisch wie der Rest der Platte behandelt, nur wurde hier PBS anstatt Serum aufgetragen. Ferner wurde auf jeder Mikrotiterplatte ein Standard-Serum in den gleichen Verdünnungsschritten wie das zu untersuchende Serum mitgeführt, um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Mikrotiterplatten sicherzustellen. Dieses

Standardserum enthielt Ovalbumin-spezifische Antikörper. Nach Subtraktion der Absorption des Leerwertes von allen gemessenen Werten einer Platte erfolgte die Auswertung mit Hilfe dieses aufgetragenen Standardserums. Hierzu wurde dessen Absorption bei verschiedenen Verdünnungen gegen die Verdünnungen (logarithmische Skalierung) aufgetragen (beispielhaft in Abb. 8). Dabei ergibt sich eine sigmoide Kurve. Alle Werte dieser Standardserumkurve, die sich im näherungsweise linearen Bereich des Graphen befanden, wurden verbunden und eine gemittelte Gerade durch diese Punkte gelegt (lineare Regression). Die Steigung dieser Geraden konnte dann errechnet werden. Anschließend wurde für jede Antikörperklasse (z.B. Gesamt-IgG) eine Verdünnung gesucht, bei der die Absorptionen aller analysierten Mäuse und aller mit aufgetragenen Standards im linearen Bereich liegen. Bei dieser Verdünnung konnte dann der Quotient Q gebildet werden (Formel 4), der sich aus der Absorption des zu analysierenden Mäuseserums und des für die Platte spezifischen aus der Standard-Geraden errechneten Standards ergibt. Durch diesen Quotienten ist es möglich, Schwankungen der Absorption verschiedener ELISA-Platten auszugleichen und die auf den Platten gemessenen Werte zu standardisieren.

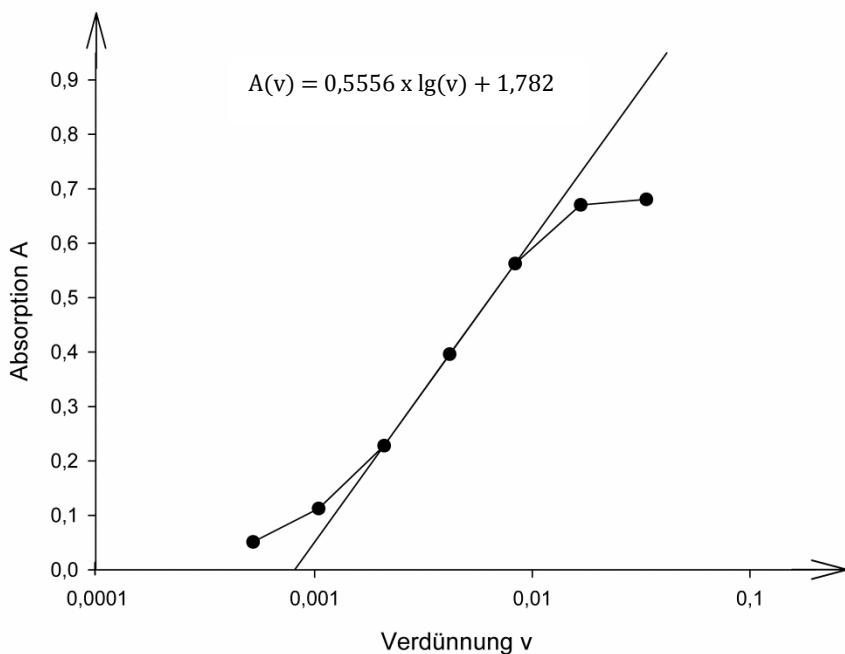


Abbildung 8:

Beispiel einer Standardkurve.

Verdünnungen des Standards jeder ELISA-Platte aufgetragen gegen die bei diesen Verdünnungen gemessenen Absorptionen ergibt eine sigmoidale Kurve. Der näherungsweise lineare Bereich dieser sigmoiden Kurve wurde bestimmt (lineare Regression) und eine Gerade durch diese Punkte gelegt.

$$Q = \frac{A_A}{A_{St}}$$

$$[Q] = rEU$$

A_A = Absorption des zu analysierenden Serums

(linearer Bereich der sigmoiden Kurve)

A_{St} = (aus Gleichung errechnete) Absorption des Standards auf derselben Mikrotiterplatte

(bei gleicher Verdünnung wie A_A und ebenfalls im linearen Bereich der Kurve)

Q = Quotient (in rEU = relativen ELISA-Units)

Formel 4:

Definition der Einheit „relative ELISA-Unit“.

3.4 Statistik

Bei allen Versuchen sind die Ergebnisse der Tierexperimente als Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben, sofern kein Serum-Pool eingesetzt worden war. Mittels Post-Hoc-Test nach Scheffé konnte auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen geprüft werden, nachdem in der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) ein signifikanter Unterschied der MW festgestellt wurde. Im Ergebnisteil wurden jeweils in Klammern die bei einfaktorieller Varianzanalyse resultierende Signifikanz (p), der F-Wert (F) und die Freiheitsgrade (df) mit angegeben. Das Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$. Sämtliche statistischen Analysen wurden mit dem Programm SPSS für Windows 15.0 durchgeführt.

Bei allen Versuchen wurden im ELISA sowohl für untersuchtes Serum als auch für Standard und Leerwert mindestens Duplikate aufgetragen und diese jeweils gemittelt.

4 Ergebnisse

4.1 Antikörperantwort nach Immunisierung während der Immunparalyse

Um den Einfluss der Immunparalyse auf die Antikörperproduktion zu untersuchen wurden Gruppen à 5 NMRI-Mäuse unterschiedlich behandelt (Abb. 4). Eine Gruppe („neg. Kontrolle“) wurde nur mit einer Ovalbumin-Aluminiumhydroxid-Lösung immunisiert. Die übrigen Gruppen erhielten zwei Tage vor der Immunisierung jeweils eine Vorbehandlung. Eine Mausgruppe („nur Narkose“) wurde nur narkotisiert. Tiere einer weiteren Gruppe („Sham-OP“) wurde das Peritoneum eröffnet und wieder verschlossen, ohne den Blinddarm abzubinden und zu perforieren. Den Mäusen der vierten Gruppe („CLP“) wurde der Blinddarm abgebunden und perforiert, wodurch bei dieser Gruppe die Immunisierung 2 Tage danach in die Immunparalyse-Phase fiel. Durch die Gruppen „nur Narkose“ und „Sham-OP“ sollte festgestellt werden, ob Narkose oder die reine Laparotomie ohne Darmperforation (Sham-OP) einen Einfluss auf die Antikörperantwort haben. Am 8. Tag nach Immunisierung wurde allen Mäusen Blut abgenommen und per ELISA die Antikörper im Serum gemessen.

4.1.1 Gesamt-IgM-Antwort

Bei der Untersuchung der IgM-Gesamtmenge (Abb. 9) im Serum der Mäuse wurden signifikante Unterschiede zwischen der CLP-Gruppe und den anderen Gruppen festgestellt ($F = 30,196$; $df = 3$; $p < 0,001$). Nach CLP fanden sich signifikant mehr IgM-Antikörper im Serum der Mäuse. Unter den anderen Gruppen war kein signifikanter Unterschied feststellbar.

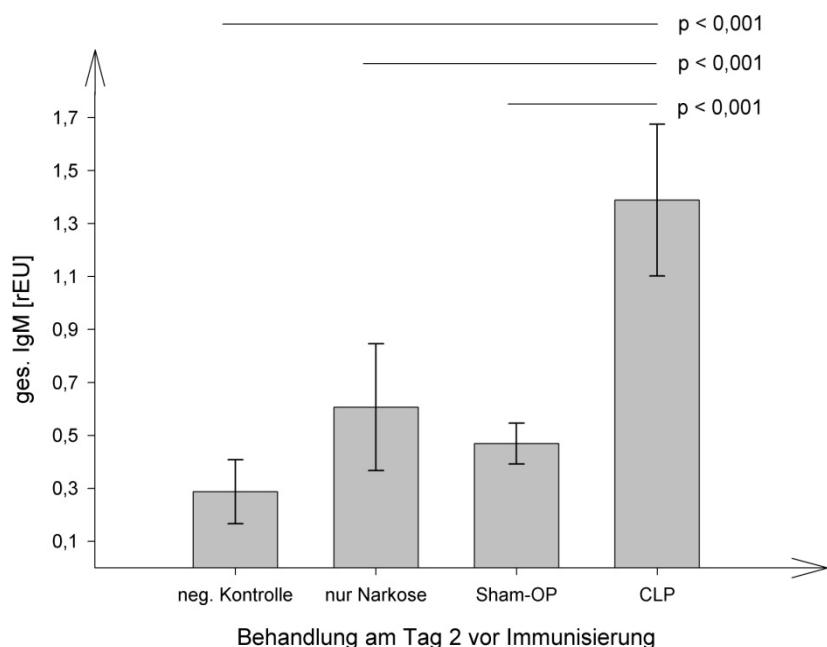


Abbildung 9:

Gesamt-IgM nach Immunisierung und unterschiedlicher Vorbehandlung.

Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurden die Gesamt-IgM-Werte im Serum bestimmt. Die Mäuse waren entweder nicht vorbehandelt („neg. Kontrolle“) oder wurden 2 Tage vor Immunisierung entweder nur narkotisiert („nur Narkose“), nur laparotomiert („Sham-OP“) oder einer CLP unterzogen. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche angegeben, bei denen im Post-Hoc-Test nach Scheffé ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Dargestellt sind MW \pm SD.

4.1.2 Ovalbumin-spezifische IgM-Antwort

Da mit Ovalbumin immunisiert worden war, war es auch möglich die Ovalbumin-spezifische IgM-Antikörpermenge (Abb. 10) zu messen. Alle Gruppen verhielten sich relativ ähnlich. Kein signifikanter Unterschied war unter den Gruppen zu erkennen.

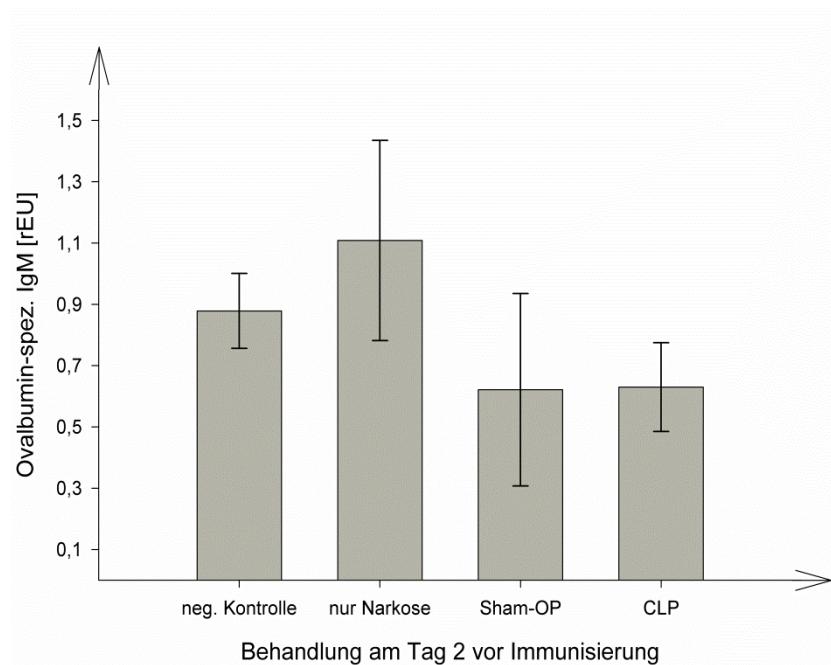


Abbildung 10:

Ovalbumin-spezifisches IgM nach Immunisierung und unterschiedlicher Vorbehandlung.

Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurden die Ovalbumin-spezifischen IgM-Werte im Serum bestimmt. Die Mäuse waren entweder nicht vorbehandelt („neg. Kontrolle“) oder wurden 2 Tage vor Immunisierung entweder nur narkotisiert („nur Narkose“), nur laparotomiert („Sham-OP“) oder einer CLP unterzogen. Im Post-Hoc-Test nach Scheffé wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden. Dargestellt sind MW \pm SD.

4.1.3 Gesamt-IgG-Antwort

Die Bestimmung der Gesamt-IgG-Menge ergab (Abb. 11), dass nach CLP signifikant mehr IgG-Antikörper im Serum waren ($F = 34,870$; $df = 3$; $p < 0,001$) als in den anderen Gruppen. Untereinander war bei diesen Gruppen kein signifikanter Unterschied feststellbar.

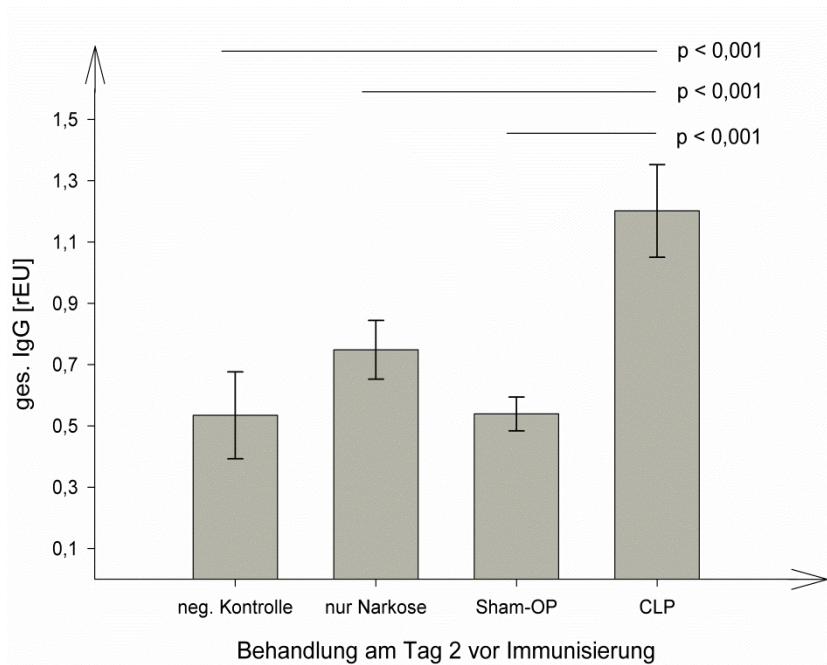


Abbildung 11:

Gesamt-IgG nach Immunisierung und unterschiedlicher Vorbehandlung.

Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurden die Gesamt-IgG-Werte im Serum bestimmt. Die Mäuse waren entweder nicht vorbehandelt („neg. Kontrolle“) oder wurden 2 Tage vor Immunisierung entweder nur narkotisiert („nur Narkose“), nur laparotomiert („Sham-OP“) oder einer CLP unterzogen. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche angegeben, bei denen im Post-Hoc-Test nach Scheffé ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Dargestellt sind MW \pm SD.

4.1.4 Ovalbumin-spezifische IgG-Antwort

Bei der Bestimmung der Ovalbumin-spezifischen IgG-Antikörpermenge (Abb. 12) bestand ein Unterschied zwischen den Gruppen ($F = 7,645$; $df = 3$; $p = 0,002$). Im Serum der Gruppe mit CLP-Vorbehandlung wurden signifikant weniger Antikörper als in den drei anderen Gruppen gefunden. Unter den letztgenannten war kein signifikanter Unterschied feststellbar.

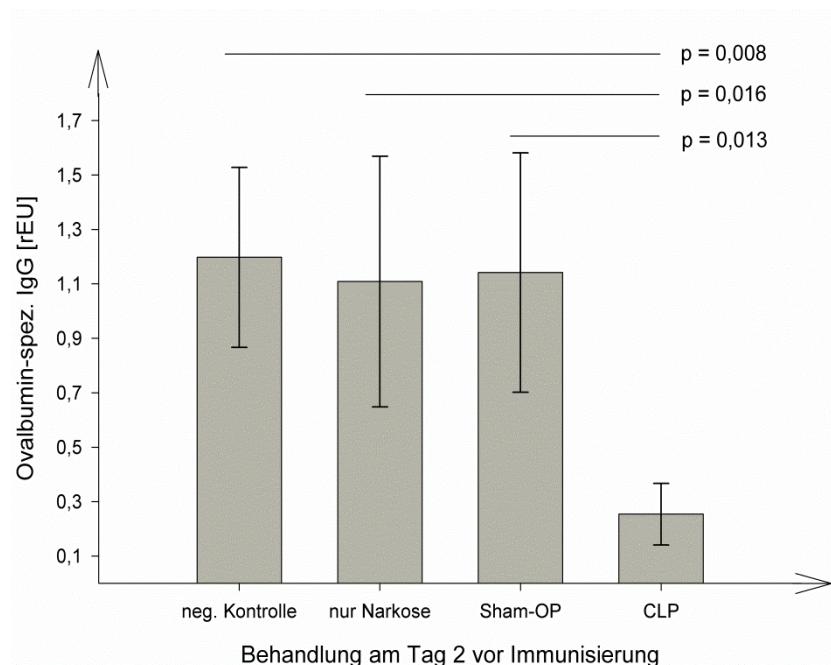


Abbildung 12:

Ovalbumin-spezifisches IgG nach Immunisierung und unterschiedlicher Vorbehandlung.

Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurden die Ovalbumin-spezifischen IgG-Werte im Serum bestimmt. Die Mäuse waren entweder nicht vorbehandelt („neg. Kontrolle“) oder wurden 2 Tage vor Immunisierung entweder nur narkotisiert („nur Narkose“), nur laparotomiert („Sham-OP“) oder einer CLP unterzogen. Der p-Wert wurde für alle Gruppenvergleiche angegeben, bei denen im Post-Hoc-Test nach Scheffé ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Dargestellt sind MW \pm SD.

4.1.5 Ovalbumin-spezifische IgG1-Antwort

Die Bestimmung der Ovalbumin-spezifischen IgG1-Antikörpermenge (Abb. 13) ergab, dass sich in der Gruppe nach CLP-Vorbehandlung signifikant weniger IgG1-Antikörper im Serum befanden, als in der Gruppe mit *Sham-OP* und der Gruppe ohne Vorbehandlung ($F = 8,704$; $df = 3$; $p = 0,001$). Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen der Gruppe, die nur Narkose erhalten hatte und der CLP-Gruppe gefunden ($p = 0,89$); hierfür ist jedoch eine Maus mit einem Extremwert in der Gruppe „nur Narkose“ verantwortlich. Zwischen den drei Gruppen ohne CLP-Vorbehandlung konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

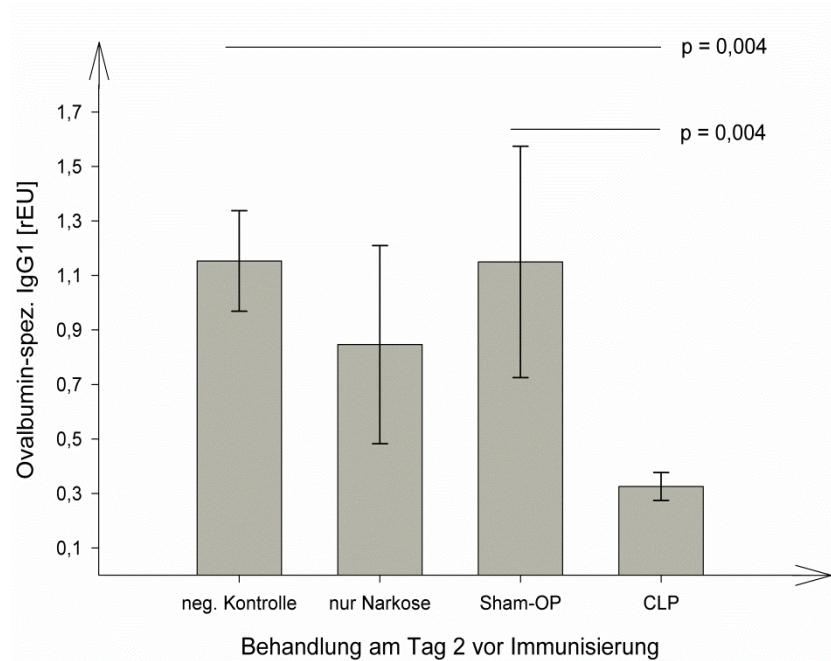


Abbildung 13:

Ovalbumin-spezifisches IgG1 nach Immunisierung und unterschiedlicher Vorbehandlung.

Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurden die Ovalbumin-spezifischen IgG1-Werte im Serum bestimmt. Die Mäuse waren entweder nicht vorbehandelt („neg. Kontrolle“) oder wurden 2 Tage vor Immunisierung entweder nur narkotisiert („nur Narkose“), nur laparotomiert („Sham-OP“) oder einer CLP unterzogen. Der p -Wert wurde für alle Gruppenvergleiche angegeben, bei denen im Post-Hoc-Test nach Scheffé ein signifikanter Unterschied gefunden wurde. Dargestellt sind MW \pm SD.

4.1.6 Ovalbumin-spezifische IgG2a-Antwort

Bei der Bestimmung der Ovalbumin-spezifischen IgG2a-Antikörpermenge (Abb. 14) zeigte sich zwar in der einfaktoriellen Varianzanalyse eine Mittelwerteungleichheit ($F = 3,584$; $df = 3$; $p = 0,039$), jedoch konnte aufgrund der starken Streuung der Werte zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied gefunden werden.

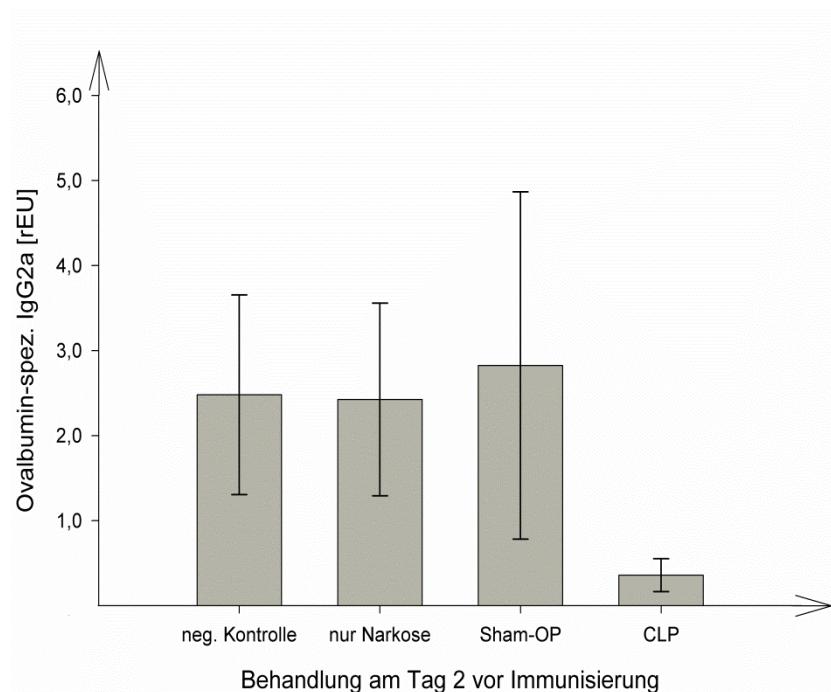


Abbildung 14:

Ovalbumin-spezifisches IgG2a nach Immunisierung und unterschiedlicher Vorbehandlung.

Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurden die Ovalbumin-spezifischen IgG2a-Werte im Serum bestimmt. Die Mäuse waren entweder nicht vorbehandelt („neg. Kontrolle“) oder wurden 2 Tage vor Immunisierung entweder nur narkotisiert („nur Narkose“), nur laparotomiert („Sham-OP“) oder einer CLP unterzogen. Im Post-Hoc-Test nach Scheffé wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gefunden. Dargestellt sind MW \pm SD.

4.2 Zeitabhängiger Einfluss einer septischen Peritonitis auf die Antikörper-Antwort

Um zu untersuchen, wie sich unterschiedliche zeitliche Abstände zwischen CLP und Immunisierung auf die Antikörperantwort auswirken, wurden Gruppen von NMRI-Mäusen an verschiedenen Tagen nach CLP immunisiert (Abb. 5). Acht Tage nach der Immunisierung wurde den Mäusen Blut abgenommen, das Serum jeder Gruppe gepoolt und die Antikörpermenge im ELISA gemessen. Der Versuch wurde aufgrund des Umfangs in zwei Teilen durchgeführt (Versuchsteil A und Versuchsteil B). Zur Detektion der Nachweigrenze des Testsystems enthielt jeder Versuchsteil eine Gruppe mit unbehandelten Mäusen (gestrichelte Linien in Abb. 15 - 20 A, B). Ferner beinhaltete jeder der beiden Teile zusätzlich eine Gruppe „ohne CLP“, die lediglich immunisiert wurde. Aus Abschnitt 4.1 war bereits ersichtlich, dass weitere Kontrollen nicht erforderlich sind, da bei keinem gemessenen Antikörperisotyp ein signifikanter Unterschied zwischen den nur immunisierten, nur narkotisierten oder lediglich laparotomierten Tieren messbar war. Zusätzlich wurden zur versuchsinternen Standardisierung und zur Bestimmung der interindividuellen Schwankungsbreite 5 Mäuse immunisiert, die ebenfalls keine CLP erhalten hatten und deren Seren nicht zu einem Pool zusammengefasst worden waren. Bei allen untersuchten Immunglobulin-Isotypen lagen die gepoolten Seren der Gruppen „ohne CLP“ innerhalb der Standardabweichung der gemessenen Werte aus den zuletzt genannten Einzelmäusen. Daher wurde bei Abb. 15 - 20 aus Übersichtsgründen auf die Darstellung der Werte aus den Seren-Pools der Gruppen „ohne CLP“ verzichtet. Zusätzlich wurden Versuchsteil A und Versuchsteil B zusammengefasst und in Verhältnis zu der nicht gepoolten Gruppe „ohne CLP“ gesetzt (Abb. 15 - 20 C).

4.2.1 Gesamt-IgM-Antwort

Die Immunisierung 8 Tage vor der Antikörperbestimmung im Serum hatte einen relativ geringen Einfluss auf die Gesamt-IgM-Antwort. Die Nachweisgrenze (gestrichelte Linie in Abb. 15 A, B), die hier den basalen Level von IgM-Antikörpern im Serum von Mäusen ohne CLP und ohne Immunisierung widerspiegelt, befand sich nur knapp unter den gemessenen Werten der Gruppe ohne vorangegangene CLP. Bei geringem zeitlichem Abstand zwischen CLP und Immunisierung von nur 1 (Abb. 15 B) bzw. 2 Tagen (Abb. 15 A) fanden sich deutlich mehr IgM-Antikörper im Serum als bei einem Abstand von 3 bzw. 6 Tagen. Bei noch größeren Abständen zwischen CLP und Immunisierung glichen sich die gemessenen Werte denen der ersten beiden Tage wieder an und überstiegen sie an Tag 8 sogar.

4.2.2 Ovalbumin-spezifische IgM-Antwort

Für die Ovalbumin-spezifische IgM-Antwort war zu erkennen, dass bei einem Abstand von 1 bzw. 2 Tagen zwischen CLP und Immunisierung die gemessenen Werte innerhalb der SD der Gruppe ohne vorangegangene CLP und insgesamt nur knapp über der Nachweisgrenze von 0,67 rEU (Abb. 16 A) bzw. 0,57 rEU (Abb. 16 B) lagen. Mit zunehmendem zeitlichen Abstand zwischen CLP und Immunisierung stiegen die Serum-Antikörper bis Tag 8 an; auch bei einem Abstand von 14 Tagen waren die Ovalbumin-spezifischen IgM-Antikörper im Serum der Mäuse noch deutlich erhöht (Abb. 16 C).

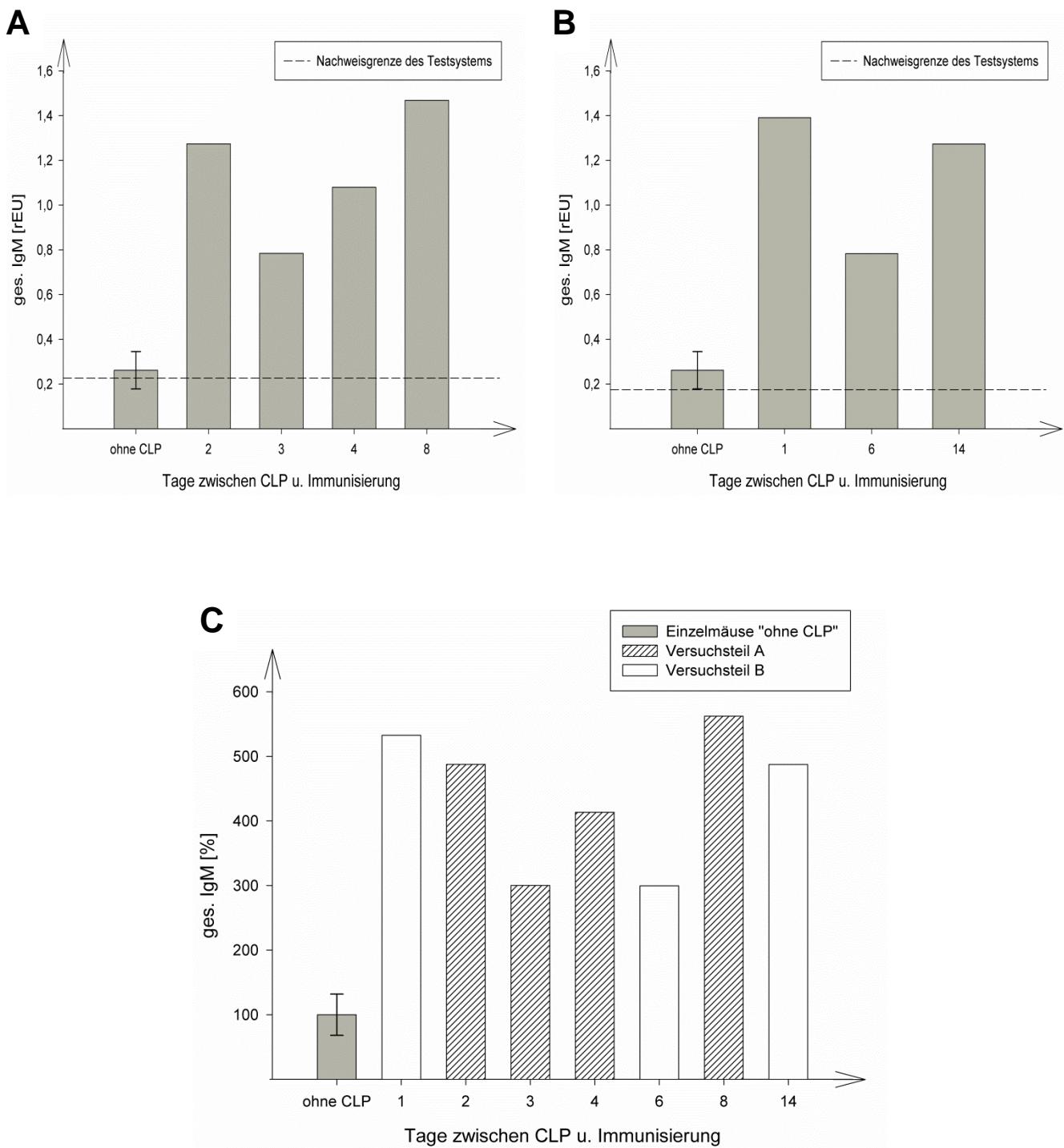


Abbildung 15:

Gesamt-IgM nach Immunisierung und unterschiedlichen zeitlichen Abständen zwischen CLP und Immunisierung.

Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurde aus einem Pool der Seren bzw. aus den Einzelmäusen („ohne CLP“) die Gesamt-IgM-Menge bestimmt. Vor der Immunisierung wurden die Mäuse im angegebenen zeitlichen Abstand einer subletalen CLP unterzogen. Versuchsteil A (A) und Versuchsteil B (B) werden zusätzlich zusammengefasst und in Verhältnis zur Gruppe ohne vorangegangene CLP gesetzt (C). Dargestellt sind MW \pm SD.

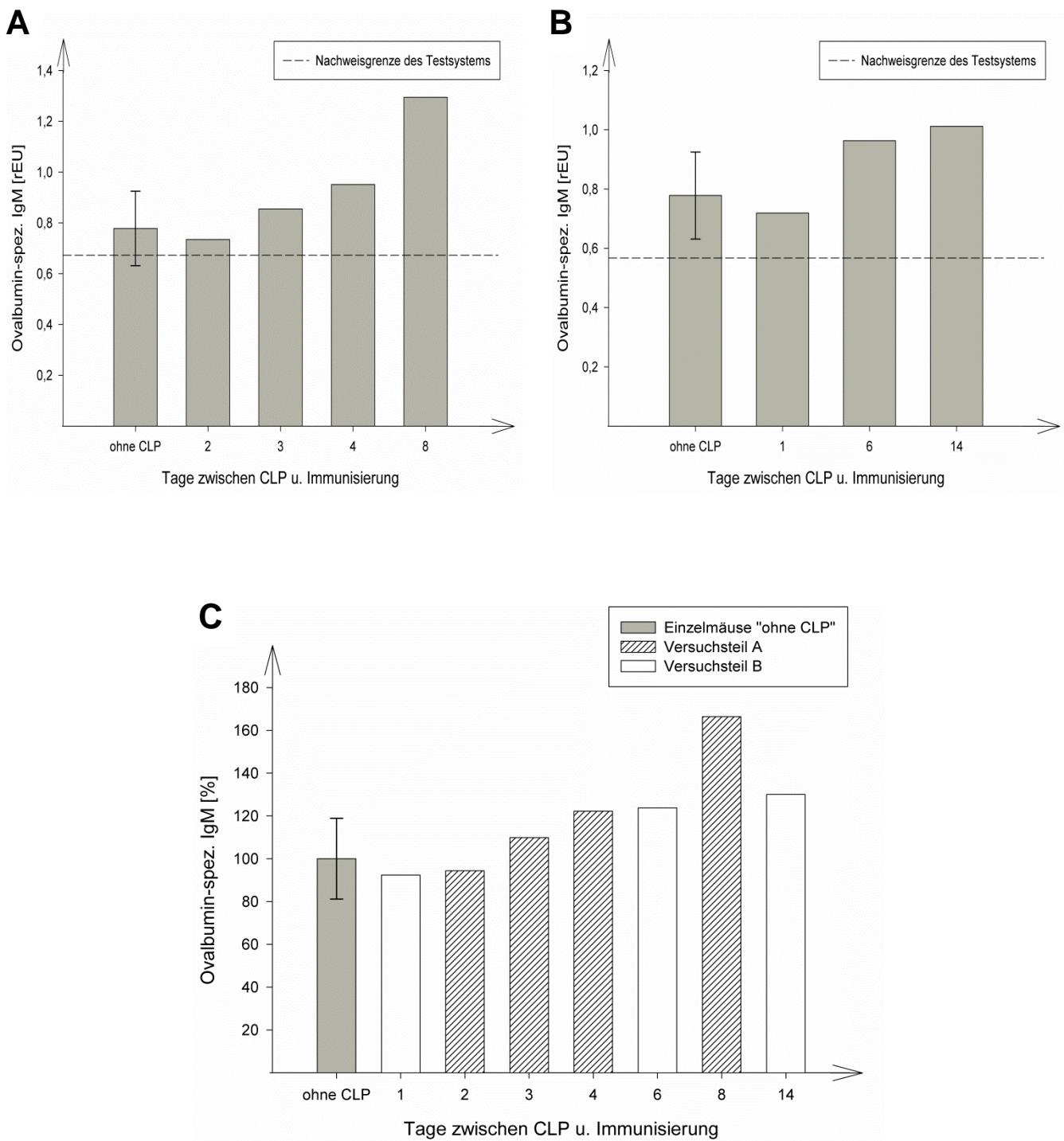


Abbildung 16:

Ovalbumin-spezifisches IgM nach Immunisierung und unterschiedlichen zeitlichen Abständen zwischen CLP und Immunisierung.

Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurde aus einem Pool der Seren bzw. aus den Einzelmäusen („ohne CLP“) die Ovalbumin-spezifische IgM-Menge bestimmt. Vor der Immunisierung wurden die Mäuse im angegebenen zeitlichen Abstand einer subletalen CLP unterzogen. Versuchsteil A (A) und Versuchsteil B (B) werden zusätzlich zusammengefasst und in Verhältnis zur Gruppe ohne vorangegangene CLP gesetzt (C).

Dargestellt sind MW \pm SD.

4.2.3 Gesamt-IgG-Antwort

In der Gesamt-IgG-Antwort zeigte sich, dass alle Mausgruppen, bei denen eine CLP vorangegangen war, wesentlich mehr Antikörper im Serum hatten als die Gruppe ohne vorangegangene CLP (Abb. 17). Die Immunisierung selbst hatte einen geringen Einfluss auf die Antikörperantwort, denn ohne vorangegangene CLP lag mit 0,46 rEU die IgG-Menge nur leicht über der Nachweigrenze, die den IgG-Level von Mäusen ohne Immunisierung und ohne CLP widerspiegelt. Nach anfänglich stark gestiegenen IgG-Serumwerten bei 1 und 2 Tagen Abstand zwischen CLP und Immunisierung fielen die Serumspiegel bei 3 Tagen wieder etwas ab; bei größeren zeitlichen Abständen kommt es zunehmend zu einem Anstieg der gemessenen Antikörpermengen.

4.2.4 Ovalbumin-spezifische IgG-Antwort

Bei der Messung von IgG-Antikörpern, die für Ovalbumin spezifisch sind, war der höchste Wert in der Gruppe ohne vorangegangene CLP zu finden (Abb. 18). Der niedrigste Wert wurde bei einem Abstand von 2 Tagen zwischen CLP und Immunisierung bestimmt. Dieser lag immer noch weit über der Nachweigrenze; bei längeren zeitlichen Abständen zwischen CLP und Immunisierung stiegen die Werte wieder an und hatten bei einem Abstand von 14 Tagen fast wieder das Niveau des Wertes ohne vorangegangene CLP erreicht.

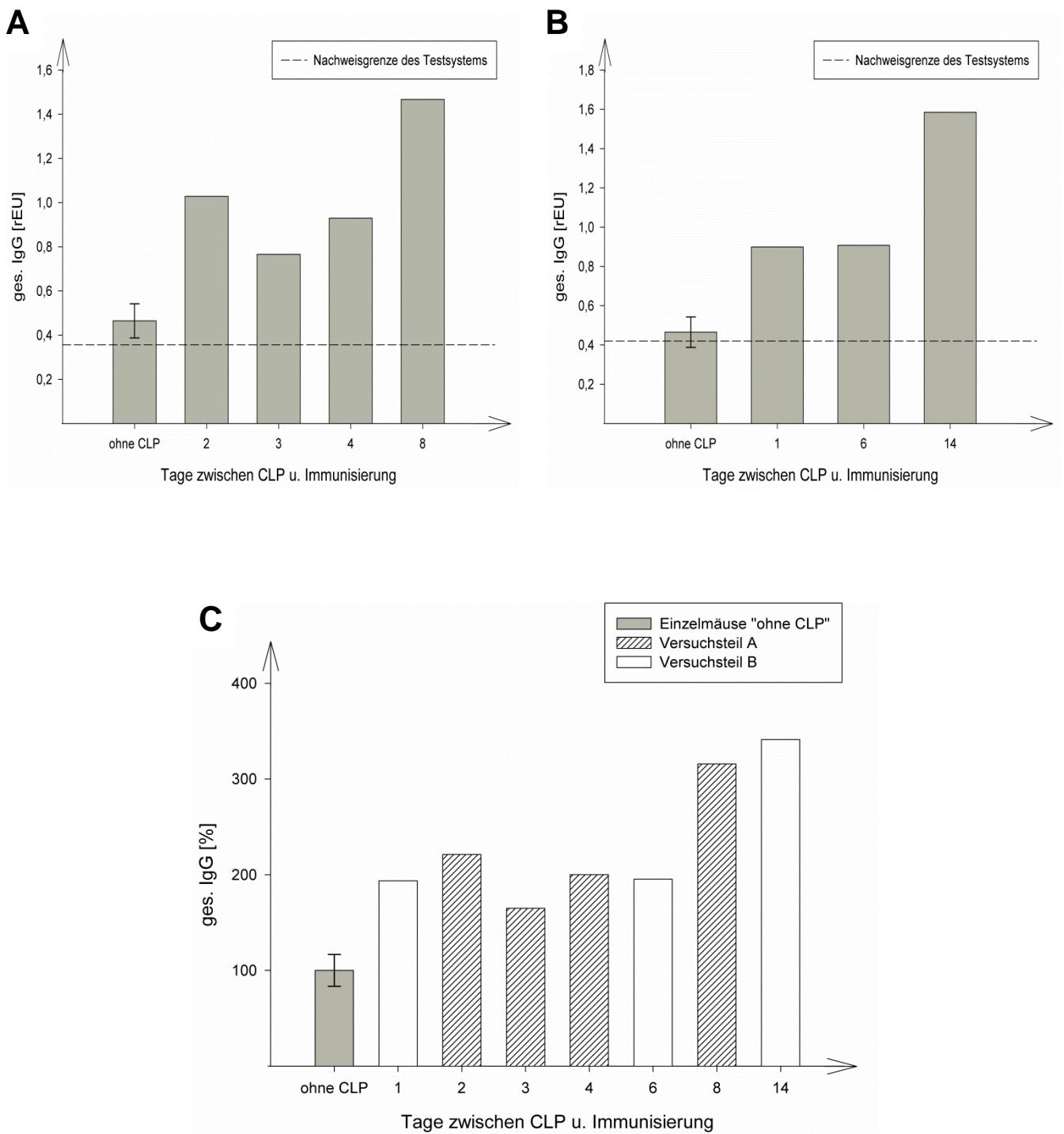


Abbildung 17:

Gesamt-IgG nach Immunisierung und unterschiedlichen zeitlichen Abständen zwischen CLP und Immunisierung.

Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurde aus einem Pool der Seren bzw. aus den Einzelmäusen („ohne CLP“) die Gesamt-IgG-Menge bestimmt. Vor der Immunisierung wurden die Mäuse im angegebenen zeitlichen Abstand einer subletalen CLP unterzogen. Versuchsteil A (A) und Versuchsteil B (B) werden zusätzlich zusammengefasst und in Verhältnis zur Gruppe ohne vorangegangene CLP gesetzt (C). Dargestellt sind MW \pm SD.

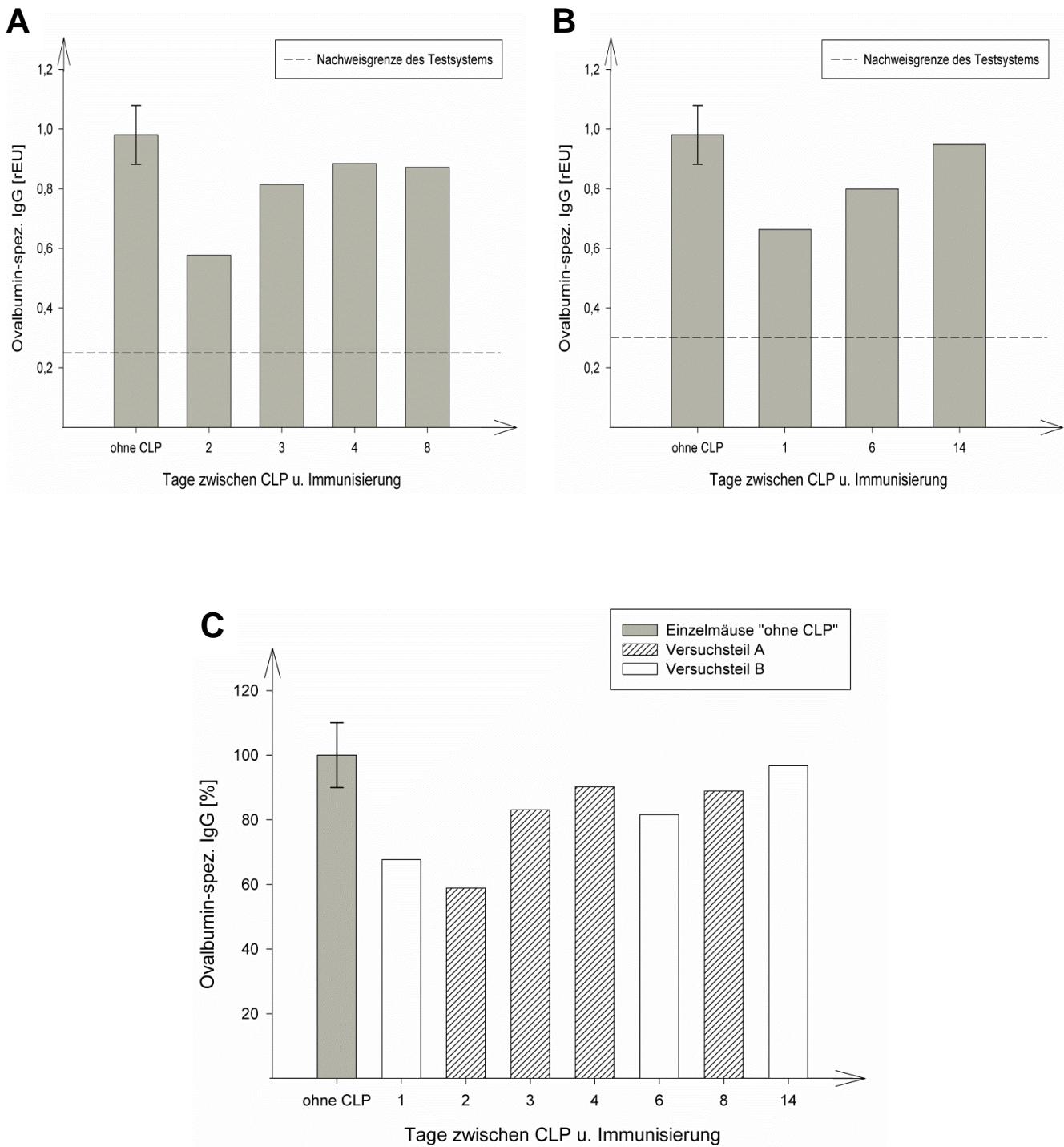


Abbildung 18:

Ovalbumin-spezifisches IgG nach Immunisierung und unterschiedlichen zeitlichen Abständen zwischen CLP und Immunisierung.

Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurde aus einem Pool der Seren bzw. aus den Einzelmäusen („ohne CLP“) die Ovalbumin-spezifische IgG-Menge bestimmt. Vor der Immunisierung wurden die Mäuse im angegebenen zeitlichen Abstand einer subletalen CLP unterzogen. Versuchsteil A (A) und Versuchsteil B (B) werden zusätzlich zusammengefasst und in Verhältnis zur Gruppe ohne vorangegangene CLP gesetzt (C).

Dargestellt sind MW \pm SD.

4.2.5 Ovalbumin-spezifische IgG1-Antwort

Die Nachweisgrenze für Ovalbumin-spezifische IgG1-Antikörper, detektiert durch Mäuse, die weder immunisiert wurden noch eine CLP erhalten hatten, war sehr niedrig (<< 0,1 rEU). Es kam also nur zu wenig unspezifischer Bindung der IgG1-spezifischen Antikörper im ELISA. Aufgrund dessen ist die Nachweisgrenze in Abb. 19 A, B nicht abgebildet. Der höchste Wert, der für Ovalbumin-spezifische IgG1-Antikörper gemessen wurde, lag mit 1,12 rEU in der Gruppe der Mäuse ohne vorangegangene CLP. Die spezifischen IgG1-Werte, die in Seren der Tiere gemessen wurden, die 1 oder 2 Tage nach CLP immunisiert wurden, waren um mehr als die Hälfte erniedrigt. Mit größerem zeitlichem Abstand zwischen CLP und Immunisierung stieg der spezifische IgG1-Serumlevel zunehmend wieder an und hatte bei einem Abstand von 14 Tagen fast wieder den Wert im Serum von Mäusen ohne vorangegangene CLP erreicht.

4.2.6 Ovalbumin-spezifische IgG2a-Antwort

Auch die Ovalbumin-spezifischen Immunglobuline vom Isotyp IgG2a zeigten in der Gruppe ohne vorangegangene CLP die höchsten Werte (Abb. 20). Hier lagen die spezifischen IgG2a-Serumwerte bis zu einem Abstand von 4 Tagen zwischen CLP und Immunisierung nahe der Nachweisgrenze. Auch bei einem Abstand von 14 Tagen zwischen CLP und Immunisierung wurden die Werte der Tiere ohne vorangegangene CLP nicht wieder erreicht.

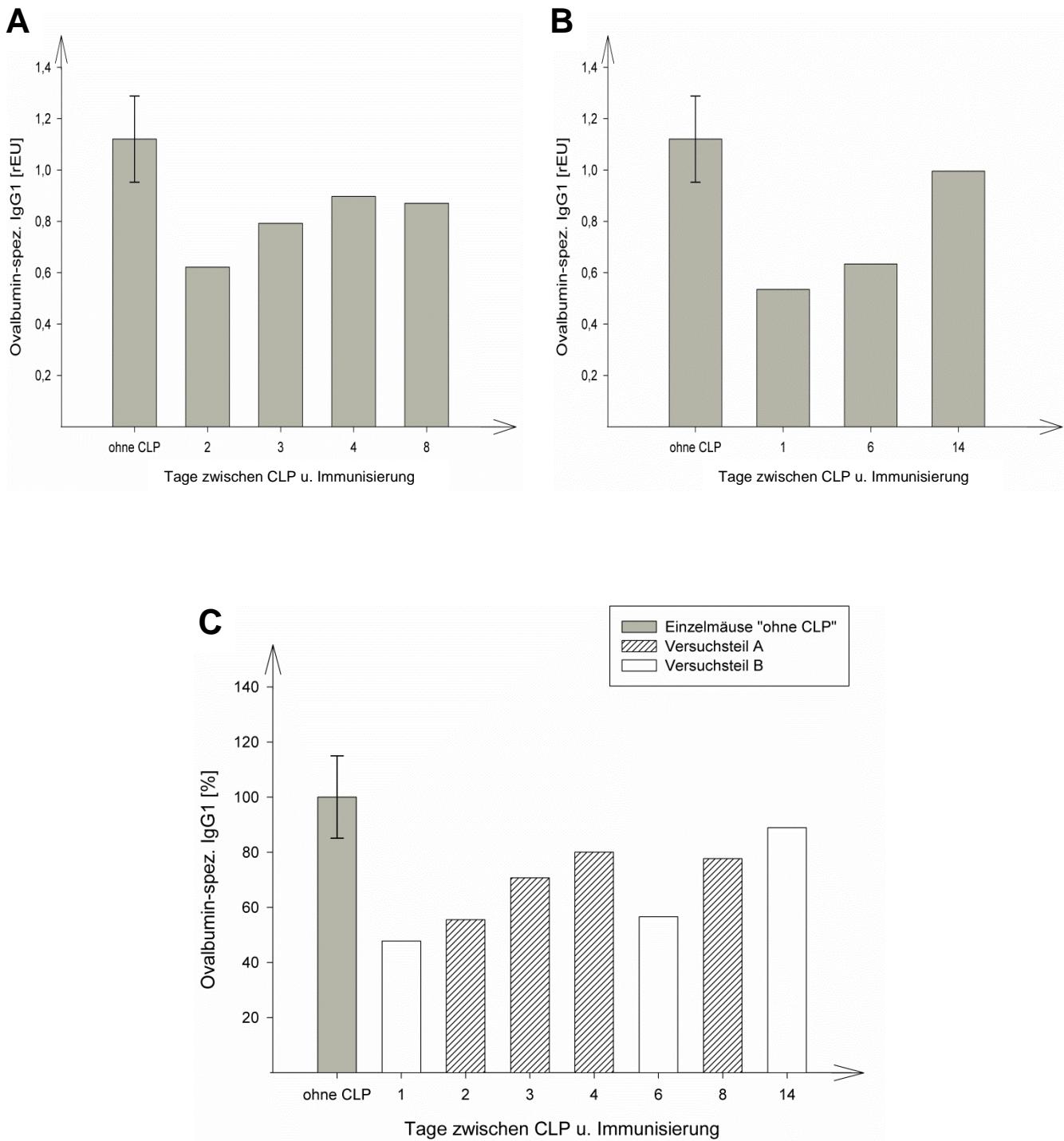


Abbildung 19:

Ovalbumin-spezifisches IgG1 nach Immunisierung und unterschiedlichen zeitlichen Abständen zwischen CLP und Immunisierung.

Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurde aus einem Pool der Seren bzw. aus den Einzelmäusen („ohne CLP“) die Ovalbumin-spezifische IgG1-Menge bestimmt. Vor der Immunisierung wurden die Mäuse im angegeben zeitlichen Abstand einer subletalen CLP unterzogen. Versuchsteil A (A) und Versuchsteil B (B) werden zusätzlich zusammengefasst und in Verhältnis zur Gruppe ohne vorangegangene CLP gesetzt (C). Dargestellt sind MW \pm SD.

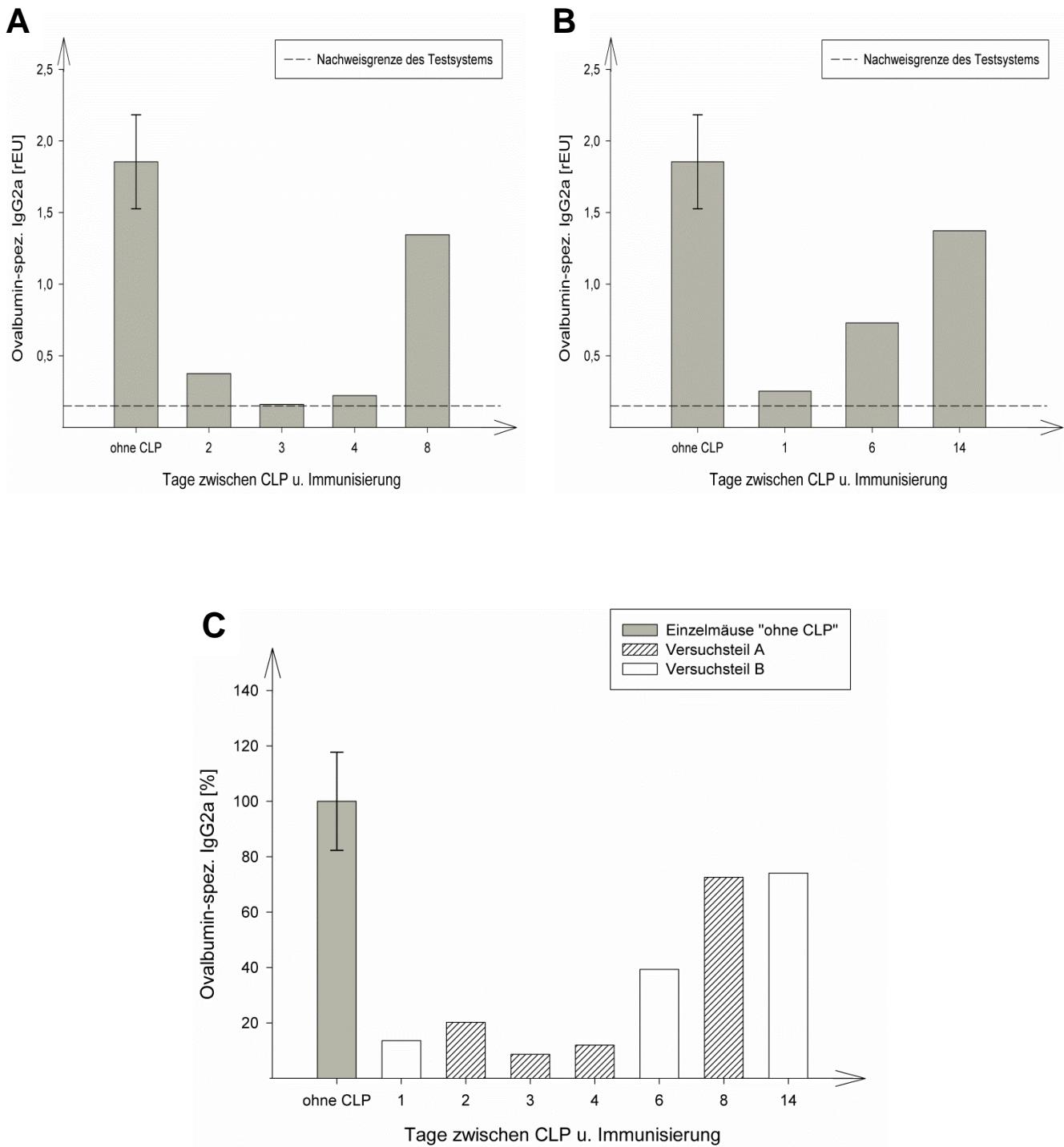


Abbildung 20:

Ovalbumin-spezifisches IgG2a nach Immunisierung und unterschiedlichen zeitlichen Abständen zwischen CLP und Immunisierung.

Mäuse ($n = 5$ pro Gruppe) wurden mit Ovalbumin immunisiert. Nach 8 Tagen wurde aus einem Pool der Seren bzw. aus den Einzelmäusen („ohne CLP“) die Ovalbumin-spezifische IgG2a-Menge bestimmt. Vor der Immunisierung wurden die Mäuse im angegebenen zeitlichen Abstand einer subletalen CLP unterzogen. Versuchsteil A (A) und Versuchsteil B (B) werden zusätzlich zusammengefasst und in Verhältnis zur Gruppe ohne vorangegangene CLP gesetzt (C). Dargestellt sind MW \pm SD.

5 Diskussion

Sepsis stellt eine Erkrankung mit einer enormen gesundheitsökonomischen Bedeutung dar, bei der es in den letzten 20 Jahren zu entscheidenden Fortschritten im Verständnis der Pathogenese gekommen ist. So weiß man inzwischen, dass die Erkrankung einen biphasischen Verlauf hat; man unterscheidet eine pro- und eine antiinflammatorische Phase in der es durch überschießende Gegenregulation des Körpers zu Immunsuppression Erkrankter kommt [26], die ihrerseits zu Multiorganversagen und Tod führen kann. Jedoch ist es trotz intensiver Forschung bisher nicht gelungen, Erfolge aus Tiermodellen - z.B. durch Beeinflussung der proinflammatorischen Zytokinkaskade - auf die Humanmedizin zu übertragen [69-75]. Zur Entwicklung erfolgreicher Therapiekonzepte ist es daher offensichtlich nötig, weitere Bestandteile des komplexen Pathomechanismus der Sepsis zu entschlüsseln.

Früher hatte man Sepsis als Entgleisung des angeborenen Immunsystems verstanden. Da man aber in den letzten Jahren eine intensive Verflechtung beider Immunsysteme erkannt hat, ist inzwischen klar, dass auch das erworbene Immunsystem eine wichtige Rolle bei dieser Erkrankung spielt. So wurde u.a. festgestellt, dass es sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen zu exzessiver Apoptose von Lymphozyten kommt [82-84]. Auch im Rahmen dieser Arbeit wird die adaptive Immunantwort bei Sepsis untersucht. Analysiert wurde im Tiermodell der Einfluss der Immunparalyse bei Sepsis auf die primäre B-Zell-Antwort.

5.1 Auswirkungen der CLP auf die primäre Antikörperantwort

Bei allen untersuchten Antikörper-Isotypen hatte die reine *Sham-OP* keine statistisch signifikante Auswirkung auf die Immunglobulinproduktion; die gemessenen Ergebnisse sind daher tatsächlich auf den Kontakt des Immunsystems der Mäuse mit den Darmbakterien zurückzuführen. Ebenfalls keinen Einfluss auf die Antikörperproduktion hatte, wie bereits in der Literatur beschrieben [85], die Anästhesie mit Ketamin und Xylazin.

Bei der Untersuchung auf die Gesamtmenge an IgM und IgG im Serum zeigt sich, dass die CLP als Stimulus die Produktion dieser Antikörper fördert (Abb. 9, Abb. 11, Abb. 15 und Abb. 17). Der überwiegende Anteil an IgM, der nach CLP produziert wird, ist wahrscheinlich gegen Darmbakterien gerichtet, mit denen der Organismus durch den operativen Eingriff in Kontakt kommt. Zur exzessiven Bildung von Immunglobulinen vom Typ IgG kommt es, da die Mäuse zuvor schon in Kontakt mit Darmbakterien gekommen sind; diese „physiologische Immunisierung“ ist dafür verantwortlich, dass bei erneutem Kontakt vermehrt IgG produziert wird. Die in Abb. 15 A, B und Abb. 17 A, B zu erkennende gestrichelte Linie ist bei Gesamt-IgG und Gesamt-IgM weniger als Nachweisgrenze des Testsystems zu verstehen, sondern vielmehr als Gesamt-IgM- und Gesamt-IgG-Antikörper-Basallevel in Mäusen ohne Immunisierung und ohne CLP. Unschwer ist daher zu erkennen, dass die reine Immunisierung mit Ovalbumin und Adjuvans einen sehr geringen Einfluss auf die Gesamt-IgG- bzw. Gesamt-IgM-Antikörpermenge hat, denn der geringe Anteil, der bei Mäusen ohne CLP über diesen Basalleveln liegt, repräsentiert wahrscheinlich zum größten Teil Ovalbumin-spezifisches IgM bzw. IgG. Obgleich IgG kein typischer Antikörper der primären Immunantwort ist, kommt es dennoch bereits auch ohne zuvor stattgefundenen Kontakt mit Ovalbumin früh und in geringer Menge zur Produktion wohl relativ niedrig-affiner Immunglobuline vom Typ IgG. Jedoch müssen bei den Mausgruppen in denen zuvor eine CLP durchgeführt wurde nicht alle die im Vergleich zum Basallevel erhöhten Gesamt-IgM- bzw. IgG-Antikörperlevel gegen antigene Strukturen von Bakterien oder Ovalbumin gerichtet sein. Vielmehr könnte interessanterweise ein Teil des nach CLP erhöhten Gesamt-IgG und Gesamt-IgM auch autoreaktiv sein. Zumindest konnte im Tiermodell 14 Tage nach CASP gezeigt werden, dass die starke Erhöhung der Gesamt-Antikörper zu einem Teil auf die Bildung antinukleärer Antikörper zurückzuführen ist (bisher nicht publizierte, aber auf Kongress präsentierte Daten der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Bröker vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität Greifswald) [86]. Während Sham-OP und Narkose keinen Einfluss auf die Immunglobulinmenge hatten, konnte dies für den Faktor Zeit hingegen sehr wohl nachgewiesen werden (Abb. 15 und Abb. 17). Bei Gesamt-IgG nimmt im

Prinzip mit zunehmendem Abstand zwischen CLP und Immunisierung die Antikörpermenge zu. Auffallend bei Gesamt-IgM ist, dass auch 22 Tage (Tag 14 + 8 Tage) nach CLP die Gesamt-IgM-Antikörpermenge im Körper der Mäuse nicht wieder auf Normallevel abgesunken ist und dass der höchste Wert am Tag 16 (Tag 8 + 8 Tage) nach CLP gemessen wurde. Auch bei der Untersuchung auf Ovalbumin-spezifische Antikörper vom Typ IgM ist zu erkennen, dass mit zunehmendem zeitlichem Abstand nach Immunisierung es zu vermehrter Produktion dieses Isotyps kommt (Abb. 10). Im Gegensatz zu den Ovalbumin-spezifischen IgG-Antikörpern zeigte sich bei der Immunisierung zwei Tage nach CLP kein signifikanter Unterschied zu der Gruppe „ohne CLP“ und insgesamt hat die reine Immunisierung einen eher geringen Anstieg der Ovalbumin-spezifischen IgM-Antikörper zur Folge, was sich im Vergleich der Gruppe „ohne CLP“ zur Nachweisgrenze widerspiegelt (Abb. 16). Wie schon beschrieben, kommt es bereits bei der ersten Immunisierung zu einer geringen Produktion von Ovalbumin-spezifischem IgG. An den beiden ersten Tagen nach CLP ist jedoch eine Abnahme der Antikörpermenge im Vergleich zur Gruppe „ohne CLP“ zu beobachten (Abb. 18); dies deckt sich mit dem Zeitraum, für den bereits nachgewiesen wurde, dass Mäuse in der Immunparalyse sind [47, 48]. Somit konnte gezeigt werden, dass es in der sepsisbedingten Immunparalyse auch zur Suppression der spezifischen Antikörperproduktion kommt. Mit zunehmendem Abstand zwischen CLP und Immunisierung scheint der immunsuppressive Effekt wieder aufgehoben zu werden (Abb. 18). Ein sehr ähnliches Bild wie bei den gesamten Ovalbumin-spezifischen IgG-Antikörpern zeigt sich bei der Untersuchung der Mäuseseren auf Ovalbumin-spezifische IgG1-Antikörper. Auch auf diesen Subtyp wirkt sich die Immunparalyse offenbar aus, denn es kann eine signifikante Abnahme der Antikörper bei Immunisierung zwei Tage nach CLP nachgewiesen (Abb. 13) und eine mit zunehmendem Abstand von CLP beobachte Erholung aufgezeigt werden (Abb. 19). Die größten Unterschiede zwischen der nur immunisierten Gruppe „ohne CLP“ und den Gruppen mit vorangegangener CLP zeigt sich jedoch bei Isotyp IgG2a, obgleich hier aufgrund der hohen Streuung im Versuch keine Signifikanz nachweisbar war (Abb. 14). Da die Konzentration der IgG1- und IgG2a-Antikörper im Standardmausserum nicht

bekannt sind, kann man nicht „errechnen“ (siehe Formel 1) welcher T-Helferzelltyp an der Immunantwort beteiligt ist; diese Konzentrationen müssten jedoch bekannt sein, denn sie fließen in die Berechnung der Einheit „rEU“ (siehe Formel 4) ein. Trotzdem ist es möglich abzuschätzen, dass es durch die im Vergleich zur Gruppe „ohne CLP“ relativ höheren Abnahme der Mittelwerte der IgG2a-Antikörper wahrscheinlich - wie für die Phase der Immunsuppression typisch [44] - zu einer Verschiebung des T-Helferzelltyps während Tag 1 und Tag 2 in Richtung T_H2 kommt.

5.2 Therapeutische Ansatzmöglichkeiten

Für eine erfolgreiche Therapie der Sepsis ist entscheidend Mechanismen zu entschlüsseln, die zur Immunparalyse führen. Darüberhinaus kann das hierbei gewonnene Wissen unser Verständnis über Immunsuppression insgesamt erweitern und so dazu beitragen bessere Immunsuppressiva zu entwickeln, die eine sichere und spezifische Hemmung unterschiedlicher Bereiche des Immunsystems ermöglichen. Damit eröffnen sich im Rahmen von Organtransplantationen, Autoimmunerkrankungen und Allergien neue therapeutische Möglichkeiten. Denn ein Problem aller derzeit verwendeter Immunsuppressiva ist, dass bei Therapie sehr unspezifisch große Teile der Immunantwort gestört werden und damit eine hohe Rate an Infektionen und malignen Erkrankungen in Kauf genommen wird [87]. Die Erforschung der Immunparalyse bei Sepsis hingegen könnte Möglichkeiten für eine spezifischere Hemmung des Immunsystems aufzeigen, denn schließlich scheinen vor allem die B-Zell-Klone von der Immunsuppression betroffen zu sein, die spezifisch Antikörper gegen solche antigenen Strukturen produzieren, die in der Phase der Immunsuppression appliziert wurden (siehe 4.2.4, 4.2.5 und 4.2.6). Aber nicht nur in Bezug auf Autoimmunerkrankungen und Allergien sind die gewonnenen Erkenntnisse von großer Bedeutung. Interessanterweise ist bekannt, dass auch nach Verbrennungen, invasiven chirurgischen Eingriffen und Blutungen es zu einer ähnlichen Suppressionen der Immunantwort kommen kann, wie dies bei Sepsis der Fall

ist [88-91]. Es ist daher umso wichtiger, Mechanismen, die den Körper in solch einen vulnerablen Zustand versetzen, zu identifizieren und zu verstehen.

In der Literatur lassen sich viele - teils auch widersprüchliche - Erkenntnisse über die Ursache der Immunparalyse finden. Im Folgenden werden nun einige mögliche Komponenten der Sepsis und besonders der Immunparalyse so wie therapeutische Interventionen diskutiert. Erst im Laufe der nächsten Jahre wird sich zeigen, welchen Stellenwert die im Folgenden beschriebenen Faktoren in der Sepsis des Menschen tatsächlich haben und ob im Sinne einer Kaskade ein hier beschriebener Punkt einen anderen erwähnten beeinflusst oder ob eine Summe von Einzelfaktoren verantwortlich ist für die Immunsuppression.

5.2.1 „Indolamin 2,3-Dioxygenase“ (IDO)

Die Blockade des Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) mittels 1-Methyl-Tryptophan stellt einen möglichen Ansatzpunkt dar, der Immunparalyse nach Sepsis entgegenzuwirken. Vermehrte Expression des Enzyms, v.a. auf dendritischen Zellen, wird durch IFN- γ gefördert [92]. IDO supprimiert durch Abbau der essenziellen Aminosäure Tryptophan die Teilung von T-Zellen, wobei die Ursache für diese Suppression noch nicht gänzlich geklärt ist. Zum einen scheinen T-Zellen, die bei Vorliegen von Tryptophan-Mangel in den Zellzyklus gehen, apoptotisch zu werden [93], anderseits fördern offenbar die bei Tryptophan-Abbau entstehenden Produkte die Apoptose von T_H1 -Zellen (nicht aber von T_H2 -Zellen) [94]. Diese, wie in der Immunparalyse bei Sepsis beobachtete Verschiebung des Verhältnisses der T-Helferzellen [44], wird mit einer gestörten Immunantwort in Verbindung gebracht [95]. Zusätzlich konnte inzwischen gezeigt werden, dass Tryptophan-Mangel, hervorgerufen durch IDO, die Umwandlung von CD4+CD25- T-Zellen in regulatorische CD4+CD25+ T-Zellen fördert [96]. Und auch diese Zellen werden mit einer Immunparalyse in Verbindung gebracht (siehe 5.2.2). Während Bindung an TLR9 bei systemischem Auftreten bakterieller DNA-Bestandteile (wie bei Sepsis der Fall) zu vermehrter IDO-Expression in der Milz und folglich zur T-Zell-Suppression führt, wirkt eine lokale, subkutane Injektion bakterieller DNA als potentes Adjuvans, das die

adaptive Immunantwort verstärkt [97]. Ursache hierfür ist wohl, dass es nach Bindung an TLR9 zu vermehrter T-Zell-Aktivierung in den nächst drainierenden Lymphknoten kommt, in denen keine IDO Aktivität nachweisbar ist [97]. Möglicherweise ist diese unterschiedliche Wirkung bakterieller Bestandteile bedingt durch die Verteilung des Enzyms IDO für den biphasischen Verlauf der Sepsis mitverantwortlich.

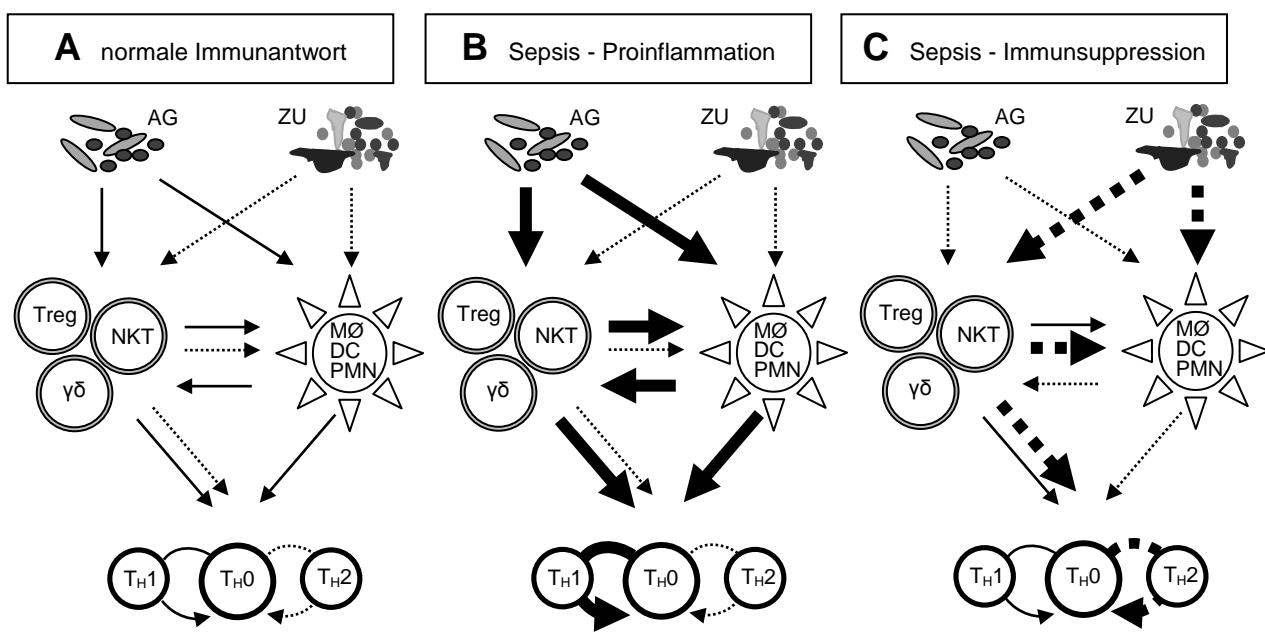
Sicher nachweisbar ist aber schon jetzt, dass es nach IDO-Blockade mittels 1-Methyl-Tryptophan CLP-bedingt zu keinem Abfall der Ovalbumin-spezifischen IgG-Antikörpermenge kommt (eigene bisher nicht publizierte Daten).

5.2.2 Lymphozyten und regulatorische Zellen

Um die Immunantwort nach Sepsis zu modulieren wurden schon vor mehr als 30 Jahren eine große Zahl verschiedener Studien durchgeführt, die untersuchten, ob sich die Substitution von Antikörpern positiv auf das Überleben nach Sepsis auswirkt [98-103]. Erfolg versprach man sich zum einen durch eine unspezifische immunmodulierende Wirkung der Immunglobuline, zum anderen durch die Tatsache, dass pharmazeutische Immunglobulinkonzentrate Antikörper gegen Bakterien enthalten, die häufig Ursache einer Sepsis sind [104]. Insgesamt aber, so wurde es in einer Metaanalyse aus dem Jahr 2004 festgestellt, zeigte sich in Studien, denen eine hohe Qualität bescheinigt wurde, kein Erfolg bei der Therapie mit Immunglobulinen [105]. Aufgrund mangelnder Evidenz eines Nutzens wird diese extrem kostenintensive Therapie daher auch nicht in den Leitlinien der Sepsistherapie empfohlen [56]. Zudem birgt natürlich auch eine Therapie mit Antikörpern Risiken [106] und könnte daher das *Outcome* sogar verschlechtern. Ein Grund für die vielen unterschiedlichen Ergebnisse für die Therapie mit Immunglobulinen, die in der Meta-Studie verglichen wurden, liegt nicht nur im Studiendesign und den Einschlusskriterien, sondern auch in dem verabreichten Antikörpersubtyp und der Tatsache, dass nicht zu eruieren ist, ob ein Patient sich in der proinflammatorischen oder in der Phase der Immun-suppression befindet. Es wäre aber durchaus denkbar, dass in der Phase der Immunsuppression, die mit geringen spezifischen Antikörperspiegeln einhergeht

(siehe 4.2.4, 4.2.5 und 4.2.6) Patienten von einer gezielten „kalkulierten Immunoglobulingabe“ nur gegen die vermuteten Erreger profitieren könnten.

Eine wichtige Rolle bei Sepsis wird in den letzten Jahren vermehrt den so genannten regulatorischen T-Zellen zugesprochen [107]. Die Bedeutung dieser kleinen heterogenen Zell-Subpopulation, bestehend aus CD4+CD25+, $\gamma\delta$ und NK T-Zellen, ergibt sich aus der Tatsache, dass sie einen großen regulierenden Einfluss auf Zellen der angeborenen Immunantwort haben, aber auch mit Zellen des adaptiven Immunsystems interagieren (Abb. 21).



AG = Erreger-Antigene und Toxine

MØ = Makrophage

DC = dendritische Zelle

PMN = neutrophiler Granulozyt

TH = T-Helferzelle

ZU = Zelltuntergang

Treg = CD4+CD25+ regulatorische T-Zelle

NKT = NK T-Zelle

$\gamma\delta$ = $\gamma\delta$ T-Zelle

Abbildung 21:

Hypothetische Rolle und Interaktion von regulatorischen Zellen bei Sepsis (in Anlehnung an VENET et al [107]).

Dargestellt sind ein mögliches Zusammenspiel der regulatorischen Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems und die Beeinflussung des T_{H1}/T_{H2} -Verhältnisses im Gesunden (A), in der Phase der Proinflammation bei Sepsis (B) und in der Phase der Immunsuppression (C).

Die Ende des letzten Jahrhunderts [108] erstmalig beschriebenen CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen (siehe 1.1.2.1) werden mit einer Reihe von Erkrankungen in Zusammenhang gebracht, bei denen das Immunsystem eine wichtige Rolle spielt [109, 110]. Auch die Immunparalyse nach Sepsis ist in der Literatur in Verbindung mit dieser Zellpopulation zu finden. Die physiologische Aufgabe dieser Zellen liegt in einer Suppression von Effektorzellen, um eine zu starke proinflammatorische Reaktion zu begrenzen. Anderseits kann eine zu starke Hemmung aber auch zum Versagen einer angemessenen Immunantwort, wie sie in der Phase der Immunparalyse bei Sepsis vorliegt, beitragen [111]. Die regulatorische Aktivität der Zellen scheint durch Ausschüttung von Zytokinen und durch direkte Zell-Zell-Kontakte auch den Tryptophanstoffwechsel dendritischer Zellen zu beeinflussen [112]; dieser hat Einfluss auf die Teilung von T-Zellen (siehe 5.2.1). Tatsächlich findet sich im Tiermodell [113] sowie bei Trauma-Patienten [114] und Patienten im septischen Schock eine relativ erhöhte Anzahl CD4+CD25+ T-Zellen [115]. Die relative Zunahme dieser Zellpopulation ist wohl zum größten Teil mit der Reduzierung von CD4+CD25- T-Zellen [116] zu erklären. Diese wiederum könnte darauf zurückzuführen sein, dass sich, wie bereits in Kapitel 5.2.1 angesprochen, unter Tryptophanmangel CD4+CD25- T-Zellen in CD4+CD25+ regulatorische Zellen umwandeln können [96]. Ferner trägt zur Verschiebung dieses Verhältnisses bei, dass regulatorische T-Zellen vermindert empfindlich sind für Apoptose-Signale im Vergleich zu Effektor T-Zellen, die während Sepsis apoptotisch werden [117-119]. Während Zelluntergang sowie das vermehrte Auftreten defekter Effektor-Lymphozyten in der Phase der Pro-inflammation wahrscheinlich tatsächlich vorteilhaft wäre, führt dies in der CARS-Phase zur Verschlechterung der Situation Erkrankter [120, 121]. Die Bedeutung bei Sepsis ergibt sich vor allem daraus, dass durch Hemmung der Apoptose von T-Zellen es zu einem besseren Überleben nach Sepsis kommt [84]. Weiterhin können CD4+CD25+ T-Zellen offensichtlich Einfluss auf das T_H1/T_H2 -Verhältnis nehmen (Abb. 21). So kann nachgewiesen werden, dass sich dieses Verhältnis in Richtung T_H2 verschieben kann [114]. Anderseits scheinen die regulatorischen Zellen nicht nur suppressiv zu wirken; zum Beispiel konnte bei Mäusen, die vor oder 6 Stunden nach CLP diese regulatorischen Zellen transferiert bekamen, eine

größere Menge TNF im Peritoneum nachgewiesen werden, jedoch auch eine verbesserte bakterielle *Clearance* und besseres Überleben [122]. Zudem hat man in weiteren Tiermodellen festgestellt, dass eine Depletion der regulatorischen CD4+CD25+T-Zellen zwei bis drei Tage vor CLP nicht zu einem verbesserten Überleben nach Sepsis führt und dass eine Depletion zu diesem Zeitpunkt weder eine Beeinflussung der pro- noch der antiinflammatorischen Zytokinkonzentration zur Folge hat [113, 123].

Insgesamt gibt es in der Literatur eine große Anzahl an Studien, die sich mit CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen und Sepsis befassen. Bisher wurden nur wenige wissenschaftliche Arbeiten veröffentlicht, die einen zeitabhängigen Transfer aktivierter regulatorischer T-Zellen bzw. deren Depletion nach CLP untersuchen. Dies wäre aber bei einem immunologisch dynamischen Vorgang wie der Sepsis sehr interessant und könnte zeigen, welche Rolle die Zellen in den jeweiligen Phasen der Sepsis tatsächlich spielen.

Neben den CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen wird den erst in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts identifizierten NK T-Zellen [124] eine mögliche Bedeutung bei Sepsis zugesprochen. Nach Antigenkontakt sezernieren die Zellen im Rahmen der primären Immunantwort sehr rasch IFN- γ oder IL-4 und haben somit einen Einfluss auf die Differenzierung von T-Helferzellen [125, 126]. Derzeit gibt es noch wenige Studien, die sich mit dem Zusammenhang von Immun-suppression bei Sepsis und NK T-Zellen beschäftigen. Es konnte jedoch in einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2003 gezeigt werden, dass durch Gabe von Anti-CD1d-Antikörpern und somit einer Hemmung der Aktivierung von NK T-Zellen 18 Stunden vor CLP eine wesentlich geringere Zahl von NK T-Zellen 24 Stunden nach CLP in der Milz zu finden war [127]. Bedingt durch diese Abnahme kam es bei den mit dem Antikörper behandelten Mäusen zu einer geringeren Produktion antiinflammatorischer Zytokine und zu einer geringeren Mortalität. Anderseits gibt es gerade in der letzten Zeit aus Tiermodellen Hinweise darauf, dass weniger die NK T-Zellen sondern eher die gewöhnlichen NK-Zellen eine wichtige Rolle bei Sepsis spielen [128].

Weiterhin wird den - ebenfalls wie die NK T-Zellen - dem angeborenen Immunsystem zugerechneten $\gamma\delta$ T-Zellen (siehe 1.1.1.1) eine Bedeutung bei Sepsis zugesprochen. Ein Fehlen dieser Zellen führt wenige Stunden nach CLP zu einer geringeren Produktion proinflammatorischer Zytokine, einer größeren Zahl vorhandener Bakterien und einer erhöhten frühen Mortalität [129-131]. Nach CLP scheint es zur Aktivierung der Zellen in der Milz zu kommen [132]; darüber hinaus kann im Tiermodell eine Abnahme dieser Zellpopulation im lymphatischen Gewebe registriert werden [133]. Einer der Gründe hierfür scheint zu sein, dass die Zellen in Richtung Infektion auswandern und daher dort vermehrt zu finden sind [130]. Man nimmt an, dass $\gamma\delta$ T-Zellen, die per Chemotaxis an den Ort der Infektion gelockt werden, durch Beeinflussung von Makrophagen eine eher anti-inflammatorische Rolle einnehmen und somit die Entzündungsreaktion begrenzen helfen. So wurde in einer Untersuchung im Jahr 2001 festgestellt, dass es 2 Tage nach einer intraperitonealen Injektion von *Listeria monocytogenes* in Mäusen ohne $\gamma\delta$ T-Zellen zu einer vermehrten Produktion von IFN- γ kommt [134]. Dies würde sich mit einer eher antiinflammatorischen Wirkung der Zellen in Einklang bringen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verschiedenen regulatorischen Zellen abhängig von Ort und Zeit der Aktivierung wahrscheinlich auf die Entwicklung von SIRS und CARS einen großen und komplexen Einfluss nehmen. Dies zu untersuchen bleibt weiteren Studien vorbehalten.

5.2.3 Makrophagen und dendritische Zellen

Auch Zellen des angeborenen Immunsystems, besonders den Makrophagen und dendritischen Zellen wird eine Bedeutung bei Sepsis und auch bei der Entstehung der Immunsuppression zugesprochen [135].

Wie bereits beschrieben, kommt es während Sepsis zu einer ausgeprägten Apoptose von Lymphozyten. Zu einem großen Teil werden die in Apoptose gegangen Zellen von Makrophagen abgebaut; so ist zu erklären, dass eine Abnahme des Levels aktiverter Makrophagen zu vermehrtem Anfallen

apoptotischer Zellen führt [136, 137]. Während dieses Abbaus, der auch physiologischerweise stattfindet [138, 139], produzieren Makrophagen nicht mehr proinflammatorische [138], sondern antiinflammatorische Zytokine [140, 141].

Bedingt durch das vermehrte Anfallen apoptotischer Zellen kommt es zu einer Steigerung der Phagozytoseaktivität der Makrophagen in der Milz [142], nicht jedoch in der frühen Phase der Sepsis; diese Aktivitätssteigerung korreliert zeitlich mit dem Beginn der Phase der Immunsuppression [142]. So könnte zur Immunsuppression nach Sepsis nicht nur die direkte Apoptose immunkompetenter Zellen beitragen, sondern auch die indirekte Beeinflussung von Makrophagen durch die in Apoptose gegangenen Zellen. Auch dieses Konzept würde erklären, dass die Hemmung der Apoptose von Lymphozyten im Tiermodell zu besserem Überleben führen kann [84].

Eine phänotypisch relativ heterogene Zellpopulation stellen die dendritischen Zellen dar, die allein durch die Tatsache, dass v.a. auf ihnen IDO exprimiert wird (siehe 5.2.1), eine wichtige Rolle bei der Immunparalyse spielen könnten. DCs zeichnen sich durch eine sehr gute Fähigkeit zur Präsentation von Antigenen aus und haben daher eine große Bedeutung bei der Interaktion mit Lymphozyten. Somit stellen sie eine wichtige Verbindung zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar. In Patienten nach Sepsis ist in der Milz weniger ein Defekt oder eine verringerte Expression von MHC II-Molekülen, als vielmehr eine dramatische Abnahme dieser Zellpopulation zu beobachten [143, 144]. Im Tiermodell zeigt sich, dass es nicht nur in der Milz zur Abnahme dendritischer Zellen kommt sondern dass apoptosebedingt auch in den Lymphknoten der Tiere die Zellpopulation dezimiert ist [145]. Im Gegensatz zur Apoptose von Lymphozyten, die in den ersten Stunden nach CLP stattfindet, findet der Zelluntergang dendritischer Zellen erst deutlich später statt [145]. Physiologischerweise reifen abhängig vom Stimulus, der zur Aktivierung dendritischer Zellen führt, unterschiedliche DC-Subtypen heran, die sowohl über ihr Zytokinprofil als auch über die Dauer der Interaktion mit T-Lymphozyten Einfluss auf deren Differenzierung ausüben [146]. So unterstützen DC1-Zellen eher eine T_H1 -getriggerte Immunantwort, wohingegen DC2-Zellen eher eine T_H2 -Immunantwort fördern [147]. Inadäquate Stimulation oder das Fehlen costimulatorischer

Faktoren führt zu Apoptose oder funktionell inaktiven T-Lymphozyten [148]. Diese wiederum verhindern eine Reifung der dendritischen Zellen [149]. Zu funktionell inaktiven Lymphozyten bzw. deren Zelluntergang kommt es auch durch Verhinderung der Reifung dendritischer Zellen bedingt durch erhöhte systemische IL-10-Level [150]. Erhöhte systemische IL-10-Level werden auch in der CARS-Phase der Sepsis beobachtet. Die Beeinflussung der dendritischen Zellen durch das Zytokin ist vielleicht einer der Gründe, weshalb stetig erhöhte IL-10-Level bei Sepsis mit einer schlechten Prognose einhergehen [151]. Einen weiteren Beitrag zur Immunsuppression wird neben der Apoptose von Lymphozyten auch einem erhöhten Noradrenalin-Level zugesprochen. In vitro sezernieren dendritische Zellen, die wie bei Sepsis mehrere Stunden Noradrenalin ausgesetzt sind, durch Bindung sowohl an β - als auch an α_2 -Adrenozeptoren ein Zytokinprofil, das prinzipiell die Differenzierung von T-Zellen zu T_H2-Zellen fördert [152]. Jedoch konnte gezeigt werden, dass die bei Sepsis zu messende Noradrenalin-Konzentration insgesamt durch Bindung an andere Zellen eher die proinflammatorische Zytokinkaskade fördert (siehe 5.2.5). Es ist daher eher davon auszugehen, dass die Apoptose von Lymphozyten während der Immunparalyse bei Sepsis zu einem Teil auf fehlende oder unangemessene Stimulation von dendritischen Zellen zurückzuführen ist. Experimentell sollte versucht werden die Reifung dieses Zelltyps zu fördern und den Phänotyp zu beeinflussen.

5.2.4 „Macrophage migration inhibitory factor“ (MIF)

Eine mögliche Rolle bei der Immunparalyse nach Sepsis könnte auch der *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) spielen. Dieses Zytokin, das in den 60er Jahren des letzten Jahrhunderts entdeckt wurde, wird von einer Vielzahl verschiedener Zellen produziert, wie z.B. Lymphozyten, Makrophagen aber auch von Endothelzellen sowie Zellen des Hypophysenvorderlappens und wird v.a. bei Infektion bzw. Stress sezerniert [153-155]. Dem Zytokin wird nicht nur eine Rolle bei Erkrankungen, wie Arteriosklerose [156], verschiedenen Tumorarten [157-159] sowie Autoimmunkrankheiten, wie Diabetes mellitus Typ I [160]

zugeschrieben, sondern eben auch ein Einfluss auf den septischen Schock [155, 161]. MIF kann als Gegenspieler von Glukokortikoiden [162] im Sinne einer Zytokinkaskade die Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Botenstoffe fördern und so die Situation während der Proinflammation für den Körper verschärfen [155, 163, 164]. Dies erklärt, dass MIF-defiziente Mäuse nach LPS-Stimulation eine geringere Menge entzündungsfördernder Zytokine produzieren als gewöhnliche Mäuse [163] und dass im Tiermodell in der frühen Phase der Sepsis monoklonale Antikörper gegen MIF zu einem besseren Überleben führen. Anderseits wirkt MIF, wie unter bestimmten Bedingungen bereits bei anderen proinflammatorischen Zytokinen [48] beobachtet, während der Immunparalyse protektiv [47]. Diese schützende Wirkung in der immunsupprimierten Phase könnte einerseits zurückzuführen sein auf die Hemmung der Glukokortikoid-Wirkung [162] oder auch auf die Hemmung der Apoptose von neutrophilen Granulozyten [165] und Makrophagen [166].

Voraussetzung einer erfolgreichen klinischen Anwendung wäre jedoch, dass vor therapeutischer Anwendung des Zytokins bzw. dessen Blockade eine sichere Differenzierung zwischen SIRS und CARS gegeben sein müsste, um betroffenen Patienten nicht mehr Schaden zuzufügen. Dies ist bisher jedoch nicht möglich. Denkbar wäre auch ohne diese Unterscheidung eine MIF DNA-Immunisierung von Patienten, die Gefahr laufen in naher Zukunft eine Sepsis zu entwickeln; eventuell könnte dadurch die Phase der Proinflammation von Beginn an unterbunden werden. Experimentell wurde bereits solch ein Impfstoff, der zur Aktivierung des Immunsystems Oligonukleotide gegen Tetanustoxin enthält, hergestellt [167]. Es zeigt sich im CLP-Modell tatsächlich, dass Mäuse, die prophylaktisch aktiv mit MIF/Tetanustoxin DNA immunisiert wurden, in der frühen Phase der Sepsis verringerte TNF-Spiegel und ein besseres Überleben haben [168]. Auch wenn in einzelnen Untersuchungen eine geringe Gefahr von Auto-Antikörpern gegen Zytokine beschrieben wird [168-170] sollte solch eine Immunisierung beim Menschen durchaus sehr kritisch gesehen werden. Viel zu wenig ist über solch eine Immunisierung gegen körpereigene Zytokine und die physiologischen Funktionen des sehr vielfältigen Zytokins MIF bekannt.

5.2.5 Vegetatives Nervensystem

Lange Zeit außer Acht gelassen wurde das Nervensystem bei der Betrachtung von Sepsis, obwohl es zwischen Immunsystem und zentralem Nervensystem eine enge wechselseitige Beeinflussung gibt. Eine wichtige Rolle spielt hier das vegetative Nervensystem, bestehend vor allem aus Sympathikus und seinem Gegenspieler Parasympathikus. Diese innervieren zum größten Teil glatte Muskelzellen verschiedener Organe und steuern so deren Funktion und Aktivität. Offensichtlich erhält das Gehirn überwiegend über afferente Fasern des Nervus vagus schnell Informationen über Entzündungsprozesse im Körper [171-173]. Wie bei einer Art Reflex wird dann über vegetatives Nervensystem und Hypothalamus-Adenohypophysen-Achse auf den erhaltenen Input reagiert. So ist bereits nachgewiesen, dass es bei vagotomierten Mäusen aufgrund des mangelnden regulierenden Einflusses nach Sepsis zu schlechterem Überleben kommt [174]. Auf verschiedenen Immunzellen, konnten nikotinerge und muscarinerge Acetylcholin-Rezeptoren nachgewiesen werden. Erhöhte Aktivität des Parasympathikus (experimentell entweder pharmakologisch oder durch elektrische Reizung) wird in erster Linie mit Blockade der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [175] und verbessertem Überleben [176-178] in Verbindung gebracht. Einen Einfluss auf antiinflammatorische Zytokinlevel scheint der Parasympathikus jedoch nicht zu haben. Zwar werden teilweise dem Sympathikus durch Bindung an β_2 -Adrenozeptoren auf der Oberfläche von Monozyten und Lymphozyten antiinflammatorische Wirkungen zugesprochen [179, 180], jedoch konnte inzwischen nachgewiesen werden, dass die bei Sepsis zu messenden Konzentrationen von Noradrenalin in erster Linie zu einer Förderung der Produktion proinflammatorischer Zytokine beitragen, v.a. durch Aktivierung von α_2 -Adrenozeptoren auf der Oberfläche von Kupfferschen Sternzellen in der Leber [181, 182].

Mit diesem Wissen stellt sich die Frage, ob es nicht in Zukunft denkbar ist, durch Beeinflussung des autonomen Nervensystems auf den Verlauf der Sepsis Einfluss zu nehmen.

5.2.6 Traditionelle chinesische Medizin

In China erzielt man Erfolge in der experimentellen Sepsistherapie durch die Verwendung verschiedener Mixturen aus der traditionellen chinesischen Medizin. Exemplarisch werden kurz die beiden in der Literatur am häufigsten mit Sepsis in Verbindung gebrachten Mixturen vorgestellt.

Für „Xuebijing“, bestehend aus verschiedenen pflanzlichen Komponenten [183] kann im Tiermodell gezeigt werden, dass Injektion der Mixtur in der Phase der Proinflammation offenbar zu einer geringeren Erhöhung des T_H1/T_H2 -Verhältnisses sowie zu einer Abnahme des TNF-Spiegels [184] führt. Interessanterweise wird diese Kräutermixtur in der chinesischen Fachliteratur öfters mit einer positiven Wirkung auf den Sepsisverlauf [185-187] in Verbindung gebracht. Und auch durch die Verwendung der Mixtur „Liu-Shen-Wan“, die in pharmakologischen Studien antiinflammatorische Eigenschaften gezeigt hat [188], konnten im Tiermodell in der frühen Phase der Sepsis niedrigere TNF-Spiegel gemessen sowie ein besseres Überleben nach CLP erreicht werden [189].

Es könnte durchaus interessant sein mit Bestandteilen dieser Mixturen in weiteren Experimenten Wirksamkeit und mögliche Wirkmechanismen zu überprüfen.

6 Zusammenfassung

Sepsis als Entgleisung v.a. des angeborenen Immunsystems mündet primär in eine Phase der Proinflammation und sekundär in eine Immunparalyse. Die Suppression des Immunsystems in letztgenannter Phase ist mitverantwortlich für die hohe Mortalität und Letalität der Sepsis. Es ist daher von enormer Bedeutung weitere Bestandteile des Pathomechanismus, der dieser Immunparalyse zu Grunde liegt, zu entschlüsseln. In dieser Arbeit wurde hierzu erstmals der Einfluss der Immunparalyse auf die primäre B-Zell-Antwort untersucht.

Als Sepsis-Modell wurde das gut etablierte CLP-Modell verwendet, für das bereits nachgewiesen ist, dass Mäuse am zweiten Tag nach CLP im Zustand der Immunparalyse sind. Nach Immunisierung mit Ovalbumin zu verschiedenen Zeitpunkten wurde per ELISA die Antikörpermenge im Serum der Mäuse gemessen.

Es kann gezeigt werden, dass die verwendete Anästhesie und eine Sham-OP keinen Einfluss auf die primäre B-Zell-Antwort haben. Die CLP führt insgesamt zu unspezifischem Anstieg der Antikörper-Menge im Serum (Gesamt-IgG und Gesamt-IgM) sowie der Ovalbumin-spezifischen IgM-Antikörper. Mit zunehmendem zeitlichen Abstand zwischen CLP und Immunisierung kommt es zu einem weiteren Anstieg der Antikörper-Menge. Zudem ist nach CLP eine Suppression der Ovalbumin-spezifischen IgG-, IgG1- und am deutlichsten der Ovalbumin-spezifischen IgG2a- Antikörper zu beobachten. Während nach 1-2 Tagen Abstand zwischen CLP und Immunisierung dieser immunsuppressive Effekt auf die Antikörperproduktion am deutlichsten zu sehen ist, gleicht er sich mit größerem zeitlichem Abstand zunehmend dem Wert von Mäusen ohne CLP an.

Somit wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass bei Sepsis die Immunparalyse tatsächlich einen Einfluss auf die primäre B-Zell-Antwort hat. Von der Suppression betroffen sind IgG-, IgG1- und IgG2a-produzierende B-Zell-Klone, die Antikörper gegen antigene Strukturen produzieren, die in der Phase der Immunparalyse appliziert wurden. Der stärkere Abfall der IgG2a-Ovalbumin-

spezifischen Antikörper (im Vergleich zu IgG1) könnte zeigen, dass es - wie für die Phase der Immunparalyse typisch - zu einer Verschiebung des T_H1/T_H2-Verhältnisses in Richtung T_H2 kommt. Die Hemmung des Enzyms „IDO“ kann die supprimierte Antikörperantwort nach CLP partiell aufheben.

7 Literaturverzeichnis

1. Janeway C: Immunologie. Heidelberg, Berlin, Spektrum, Akadem. Verl., 2002.
2. Shelley O, Murphy T, Paterson H, Mannick JA, Lederer JA: Interaction between the innate and adaptive immune systems is required to survive sepsis and control inflammation after injury. *Shock* 20:123, 2003.
3. Ballas ZK, Rasmussen W: NK1.1+ thymocytes. Adult murine CD4-, CD8-thymocytes contain an NK1.1+, CD3+, CD5hi, CD44hi, TCR-V beta 8+ subset. *J Immunol* 145:1039, 1990.
4. Hansen DS, Schofield L: Regulation of immunity and pathogenesis in infectious diseases by CD1d-restricted NKT cells. *Int J Parasitol* 34:15, 2004.
5. Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M: The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 5:405, 2007.
6. Motohashi S: Clinical application of NKT cell system for lung cancer. *Nippon Rinsho* 63 Suppl 4:574, 2005.
7. Smyth MJ, Wallace ME, Nutt SL, Yagita H, Godfrey DI, Hayakawa Y: Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer. *J Exp Med* 201:1973, 2005.
8. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC: Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294:605, 2001.
9. Kabelitz D, Wesch D, Pitters E, Zoller M: Potential of human gammadelta T lymphocytes for immunotherapy of cancer. *Int J Cancer* 112:727, 2004.
10. Witherden DA, Rieder SE, Boismenu R, Havran WL: A role for epithelial gamma delta T cells in tissue repair. *Springer Semin Immunopathol* 22:265, 2000.
11. Andrew EM, Carding SR: Murine gammadelta T cells in infections: beneficial or deleterious? *Microbes Infect* 7:529, 2005.
12. Bluestone JA, Abbas AK: Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 3:253, 2003.

13. Hayday A, Tigelaar R: Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 3:233, 2003.
14. Carding SR, Egan PJ: Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2:336, 2002.
15. Nishimura H, Emoto M, Hiromatsu K, Yamamoto S, Matsuura K, Gomi H, Ikeda T, Itohara S, Yoshikai Y: The role of gamma delta T cells in priming macrophages to produce tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 25:1465, 1995.
16. Janeway C: Immunobiology the immune system in health and disease. New York, Garland Science, 2005.
17. Snapper CM, Paul WE: Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* 236:944, 1987.
18. Hochreiter R, Ferreira F, Thalhamer J, Hammerl P: TH1-promoting DNA immunization against allergens modulates the ratio of IgG1/IgG2a but does not affect the anaphylactic potential of IgG1 antibodies: no evidence for the synthesis of nonanaphylactic IgG1. *J Allergy Clin Immunol* 112:579, 2003.
19. Maassen CB, Boersma WJ, van Holten-Neelen C, Claassen E, Laman JD: Growth phase of orally administered Lactobacillus strains differentially affects IgG1/IgG2a ratio for soluble antigens: implications for vaccine development. *Vaccine* 21:2751, 2003.
20. Geroulanos S, Douka ET: Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med* 32:2077, 2006.
21. Werdan K: Sepsis und MODS. Heidelberg, Springer, 2005.
22. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 101:1644, 1992.
23. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA: Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med* 17:389, 1989.

24. Hebert PC, Drummond AJ, Singer J, Bernard GR, Russell JA: A simple multiple system organ failure scoring system predicts mortality of patients who have sepsis syndrome. *Chest* 104:230, 1993.
25. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL: Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 16:83, 2001.
26. Hotchkiss RS, Karl IE: The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348:138, 2003.
27. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K: Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 33:606, 2007.
28. Martin GS, Mannino DM, Moss M: The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med* 34:15, 2006.
29. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M: The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348:1546, 2003.
30. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL: Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. *Crit Care Med* 35:1244, 2007.
31. Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K, Schneider H, Burchardi H: Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med* 28:1440, 2002.
32. Brun-Buisson C, Roudot-Thoraval F, Girou E, Grenier-Sennelier C, Durand-Zaleski I: The costs of septic syndromes in the intensive care unit and influence of hospital-acquired sepsis. *Intensive Care Med* 29:1464, 2003.

33. Adrie C, Alberti C, Chaix-Couturier C, Azoulay E, De Lassence A, Cohen Y, Meshaka P, Cheval C, Thuong M, Troche G, Garrouste-Orgeas M, Timsit JF: Epidemiology and economic evaluation of severe sepsis in France: age, severity, infection site, and place of acquisition (community, hospital, or intensive care unit) as determinants of workload and cost. *J Crit Care* 20:46, 2005.
34. Brunkhorst FM: Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet). *Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 41:43, 2006.
35. Bone RC: A critical evaluation of new agents for the treatment of sepsis. *Jama* 266:1686, 1991.
36. Garnacho-Montero J, Aldabo-Pallas T, Garnacho-Montero C, Cayuela A, Jimenez R, Barroso S, Ortiz-Leyba C: Timing of adequate antibiotic therapy is a greater determinant of outcome than are TNF and IL-10 polymorphisms in patients with sepsis. *Crit Care* 10:R111, 2006.
37. MacArthur RD, Miller M, Albertson T, Panacek E, Johnson D, Teoh L, Barchuk W: Adequacy of early empiric antibiotic treatment and survival in severe sepsis: experience from the MONARCS trial. *Clin Infect Dis* 38:284, 2004.
38. Butt MA, Coulson AK, Hull JH, Ho TB: Early treatment strategies in sepsis. *Bmj* 336:521, 2008.
39. Garnacho-Montero J, Ortiz-Leyba C, Herrera-Melero I, Aldabo-Pallas T, Cayuela-Dominguez A, Marquez-Vacaro JA, Carbajal-Guerrero J, Garcia-Garmendia JL: Mortality and morbidity attributable to inadequate empirical antimicrobial therapy in patients admitted to the ICU with sepsis: a matched cohort study. *J Antimicrob Chemother* 61:436, 2008.
40. Annane D, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B: Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. *Am J Respir Crit Care Med* 168:165, 2003.

41. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulme R, Lepage E, Le Gall R: Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 28:108, 2002.
42. Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420:885, 2002.
43. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW, Hariri RJ, Fahey TJ, 3rd, Zentella A, Albert JD, et al.: Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234:470, 1986.
44. Song GY, Chung CS, Chaudry IH, Ayala A: Immune suppression in polymicrobial sepsis: differential regulation of Th1 and Th2 responses by p38 MAPK. *J Surg Res* 91:141, 2000.
45. Volk HD, Thieme M, Heym S, Docke WD, Ruppe U, Tausch W, Manger D, Zuckermann S, Golosubow A, Nieter B, et al.: Alterations in function and phenotype of monocytes from patients with septic disease--predictive value and new therapeutic strategies. *Behring Inst Mitt*:208, 1991.
46. Munoz C, Carlet J, Fitting C, Misset B, Bleriot JP, Cavaillon JM: Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. *J Clin Invest* 88:1747, 1991.
47. Pollak N, Sterns T, Echtenacher B, Männel DN: Improved resistance to bacterial superinfection in mice by treatment with macrophage migration inhibitory factor. *Infect Immun* 73:6488, 2005.
48. Echtenacher B, Urbaschek R, Weigl K, Freudenberg MA, Männel DN: Treatment of experimental sepsis-induced immunoparalysis with TNF. *Immunobiology* 208:381, 2003.
49. Grimminger F, Mayer K, Seeger W: Is there a reliable immunotherapy in infection? *Internist (Berl)* 38:541, 1997.
50. Weigand MA, Bardenheuer HJ, Bottiger BW: Clinical management of patients with sepsis. *Anaesthetist* 52:3, 2003.
51. Aird WC: Natural anticoagulant inhibitors: activated Protein C. *Best Pract Res Clin Haematol* 17:161, 2004.

52. Vincent JL, Angus DC, Artigas A, Kalil A, Basson BR, Jamal HH, Johnson G, 3rd, Bernard GR: Effects of drotrecogin alfa (activated) on organ dysfunction in the PROWESS trial. *Crit Care Med* 31:834, 2003.
53. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A, Steingrub JS, Garber GE, Helterbrand JD, Ely EW, Fisher CJ, Jr.: Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344:699, 2001.
54. Ely EW, Laterre PF, Angus DC, Helterbrand JD, Levy H, Dhainaut JF, Vincent JL, Macias WL, Bernard GR: Drotrecogin alfa (activated) administration across clinically important subgroups of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 31:12, 2003.
55. Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 36:296, 2008.
56. Reinhart K, Brunkhorst F, Bone H, Gerlach H, Grundling M, Kreymann G, Kujath P, Marggraf G, Mayer K, Meier-Hellmann A, Peckelsen C, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Werdan K: Diagnosis and therapy of sepsis. Guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine. *Internist (Berl)* 47:356, 2006.
57. Marti-Carvajal A, Salanti G, Cardona AF: Human recombinant activated protein C for severe sepsis. *Cochrane Database Syst Rev*:CD004388, 2008.
58. Neilson AR, Burchardi H, Chinn C, Clouth J, Schneider H, Angus D: Cost-effectiveness of drotrecogin alfa (activated) for the treatment of severe sepsis in Germany. *J Crit Care* 18:217, 2003.

59. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Clermont G, Ball DE, Basson BR, Ely EW, Laterre PF, Vincent JL, Bernard G, van Hout B: Cost-effectiveness of drotrecogin alfa (activated) in the treatment of severe sepsis. Crit Care Med 31:1, 2003.
60. Manns BJ, Lee H, Doig CJ, Johnson D, Donaldson C: An economic evaluation of activated protein C treatment for severe sepsis. N Engl J Med 347:993, 2002.
61. Bernard GR, Macias WL, Joyce DE, Williams MD, Bailey J, Vincent JL: Safety assessment of drotrecogin alfa (activated) in the treatment of adult patients with severe sepsis. Crit Care 7:155, 2003.
62. Annane D, Sebille V, Troche G, Raphael JC, Gajdos P, Bellissant E: A 3-level prognostic classification in septic shock based on cortisol levels and cortisol response to corticotropin. Jama 283:1038, 2000.
63. Bone RC, Fisher CJ, Jr., Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA: A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. N Engl J Med 317:653, 1987.
64. Cronin L, Cook DJ, Carlet J, Heyland DK, King D, Lansang MA, Fisher CJ, Jr.: Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. Crit Care Med 23:1430, 1995.
65. Briegel J, Forst H, Haller M, Schelling G, Kilger E, Kuprat G, Hemmer B, Hummel T, Lenhart A, Heyduck M, Stoll C, Peter K: Stress doses of hydrocortisone reverse hyperdynamic septic shock: a prospective, randomized, double-blind, single-center study. Crit Care Med 27:723, 1999.
66. Bollaert PE, Charpentier C, Levy B, Debouverie M, Audibert G, Larcan A: Reversal of late septic shock with supraphysiologic doses of hydrocortisone. Crit Care Med 26:645, 1998.
67. Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troche G, Chaumet-Riffaut P, Bellissant E: Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. Jama 288:862, 2002.

68. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, Weiss YG, Benbenishty J, Kalenka A, Forst H, Laterre PF, Reinhart K, Cuthbertson BH, Payen D, Briegel J: Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. *N Engl J Med* 358:111, 2008.
69. Zeni F, Freeman B, Natanson C: Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment. *Crit Care Med* 25:1095, 1997.
70. Angus DC, Birmingham MC, Balk RA, Scannon PJ, Collins D, Kruse JA, Graham DR, Dedhia HV, Homann S, MacIntyre N: E5 murine monoclonal antiendotoxin antibody in gram-negative sepsis: a randomized controlled trial. *E5 Study Investigators*. *Jama* 283:1723, 2000.
71. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, Bone R, Wenzel RP, Balk R, Allred R, et al.: Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. *TNF-alpha MAb Sepsis Study Group*. *Jama* 273:934, 1995.
72. Reinhart K, Menges T, Gardlund B, Harm Zwaveling J, Smithes M, Vincent JL, Tellado JM, Salgado-Remigio A, Zimlichman R, Withington S, Tschaikowsky K, Brase R, Damas P, Kupper H, Kempeni J, Eiselstein J, Kaul M: Randomized, placebo-controlled trial of the anti-tumor necrosis factor antibody fragment afelimomab in hyperinflammatory response during severe sepsis: The RAMSES Study. *Crit Care Med* 29:765, 2001.
73. Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC, Abraham E, Schein RM, Benjamin E: Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. *The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group*. *N Engl J Med* 334:1697, 1996.
74. Opal SM, Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF, Sadoff JC, Slotman GJ, Levy H, Balk RA, Shelly MP, Pribble JP, LaBrecque JF, Lookabaugh J, Donovan H, Dubin H, Baughman R, Norman J, DeMaria E, Matzel K, Abraham E, Seneff M: Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group*. *Crit Care Med* 25:1115, 1997.

75. Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, Iberti TJ, Rackow EC, Shapiro MJ, Greenman RL, et al.: Recombinant human interleukin 1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome. Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Phase III rhIL-1ra Sepsis Syndrome Study Group. *Jama* 271:1836, 1994.
76. Männel DN: Advances in sepsis research derived from animal models. *Int J Med Microbiol* 297:393, 2007.
77. Neugebauer E, Rixen D, Raum M, Schafer U: Thirty years of anti-mediator treatment in sepsis and septic shock--what have we learned? *Langenbecks Arch Surg* 383:26, 1998.
78. Zantl N, Uebe A, Neumann B, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B, Heidecke CD, Pfeffer K: Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. *Infect Immun* 66:2300, 1998.
79. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH: Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29:189, 1980.
80. Echtenacher B, Weigl K, Lehn N, Männel DN: Tumor necrosis factor-dependent adhesions as a major protective mechanism early in septic peritonitis in mice. *Infect Immun* 69:3550, 2001.
81. Engvall E, Perlmann P: Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 109:129, 1972.
82. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, Osborne DF, Freeman BD, Cobb JP, Buchman TG, Karl IE: Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 166:6952, 2001.
83. Hotchkiss RS, Swanson PE, Cobb JP, Jacobson A, Buchman TG, Karl IE: Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice. *Crit Care Med* 25:1298, 1997.

84. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Chang KC, Cobb JP, Buchman TG, Korsmeyer SJ, Karl IE: Prevention of lymphocyte cell death in sepsis improves survival in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14541, 1999.
85. Lockwood LL, Silbert LH, Laudenslager ML, Watkins LR, Maier SF: Anesthesia-induced modulation of in vivo antibody levels: a study of pentobarbital, chloral hydrate, methoxyflurane, halothane, and ketamine/xylazine. *Anesth Analg* 77:769, 1993.
86. Riefenstahl A, Pötschke C, Ehlers M, Bröker, BM: Septic mice produce autoreactive IgM and IgG antibodies. *Wien Klin Wochenschr* 120 (Suppl. 1):168, 2008
87. Vial T, Choquet-Kastylevsky G, Descotes J: Adverse effects of immunotherapeutics involving the immune system. *Toxicology* 174:3, 2002.
88. Hansbrough JF, Zapata-Sirvent R, Hoyt D: Postburn immune suppression: an inflammatory response to the burn wound? *J Trauma* 30:671, 1990.
89. Greenfeld K, Avraham R, Benish M, Goldfarb Y, Rosenne E, Shapira Y, Rudich T, Ben-Eliyahu S: Immune suppression while awaiting surgery and following it: dissociations between plasma cytokine levels, their induced production, and NK cell cytotoxicity. *Brain Behav Immun* 21:503, 2007.
90. Lundy J, Ford CM: Surgery, trauma and immune suppression. Evolving the mechanism. *Ann Surg* 197:434, 1983.
91. Stipancic I, Zarkovic N: The effect of trauma surgery on immune system function. *Lijec Vjesn* 119:279, 1997.
92. Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA: Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 164:3596, 2000.
93. Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL: Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 107:452, 2002.
94. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P: T cell apoptosis by kynurenes. *Adv Exp Med Biol* 527:183, 2003.

95. Romagnani S: Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 12:227, 1994.
96. Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Puccetti P: The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol* 176:6752, 2006.
97. Wingender G, Garbi N, Schumak B, Jungerkes F, Endl E, von Bubnoff D, Steitz J, Striegler J, Moldenhauer G, Tuting T, Heit A, Huster KM, Takikawa O, Akira S, Busch DH, Wagner H, Hammerling GJ, Knolle PA, Limmer A: Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur J Immunol* 36:12, 2006.
98. Margulies M, Voto LS, Mathet E, Margulies M: High-dose intravenous IgG for the treatment of severe rhesus alloimmunization. *Vox Sang* 61:181, 1991.
99. Grundmann R, Hornung M: Immunoglobulin therapy in patients with endotoxemia and postoperative sepsis--a prospective randomized study. *Prog Clin Biol Res* 272:339, 1988.
100. Chen JY: Intravenous immunoglobulin in the treatment of full-term and premature newborns with sepsis. *J Formos Med Assoc* 95:839, 1996.
101. Mancilla-Ramirez J, Gonzalez-Yunes R, Castellanos-Cruz C, Garcia-Roca P, Santos-Preciado JI: Intravenous immunoglobulin in the treatment of neonatal septicemia. *Bol Med Hosp Infant Mex* 49:4, 1992.
102. De Simone C, Delogu G, Corbetta G: Intravenous immunoglobulins in association with antibiotics: a therapeutic trial in septic intensive care unit patients. *Crit Care Med* 16:23, 1988.
103. Burns ER, Lee V, Rubinstein A: Treatment of septic thrombocytopenia with immune globulin. *J Clin Immunol* 11:363, 1991.
104. Lamari F, Anastassiou ED, Tsegenidis T, Dimitracopoulos G, Karamanos NK: An enzyme immunoassay to determine the levels of specific antibodies toward bacterial surface antigens in human immunoglobulin preparations and blood serum. *J Pharm Biomed Anal* 20:913, 1999.

105. Pildal J, Gotzsche PC: Polyclonal immunoglobulin for treatment of bacterial sepsis: a systematic review. *Clin Infect Dis* 39:38, 2004.
106. Pierce LR, Jain N: Risks associated with the use of intravenous immunoglobulin. *Transfus Med Rev* 17:241, 2003.
107. Venet F, Chung CS, Monneret G, Huang X, Horner B, Garber M, Ayala A: Regulatory T cell populations in sepsis and trauma. *J Leukoc Biol* 83:523, 2008.
108. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151, 1995.
109. Brusko T, Atkinson M: Treg in type 1 diabetes. *Cell Biochem Biophys* 48:165, 2007.
110. Venken K, Hellings N, Broekmans T, Hensen K, Rummens JL, Stinissen P: Natural Naive CD4+CD25+CD127low Regulatory T Cell (Treg) Development and Function Are Disturbed in Multiple Sclerosis Patients: Recovery of Memory Treg Homeostasis during Disease Progression. *J Immunol* 180:6411, 2008.
111. Belkaid Y, Rouse BT: Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 6:353, 2005.
112. Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P: Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:1206, 2003.
113. Wisnoski N, Chung CS, Chen Y, Huang X, Ayala A: The contribution of CD4+ CD25+ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. *Shock* 27:251, 2007.
114. MacConmara MP, Maung AA, Fujimi S, McKenna AM, Delisle A, Lapchak PH, Rogers S, Lederer JA, Mannick JA: Increased CD4+ CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. *Ann Surg* 244:514, 2006.

115. Monneret G, Debard AL, Venet F, Bohe J, Hequet O, Bienvenu J, Lepape A: Marked elevation of human circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in sepsis-induced immunoparalysis. *Crit Care Med* 31:2068, 2003.
116. Venet F, Pachot A, Debard AL, Bohe J, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G: Increased percentage of CD4+CD25+ regulatory T cells during septic shock is due to the decrease of CD4+CD25- lymphocytes. *Crit Care Med* 32:2329, 2004.
117. Fritzsching B, Oberle N, Eberhardt N, Quick S, Haas J, Wildemann B, Krammer PH, Suri-Payer E: In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol* 175:32, 2005.
118. Wesche DE, Lomas-Neira JL, Perl M, Chung CS, Ayala A: Leukocyte apoptosis and its significance in sepsis and shock. *J Leukoc Biol* 78:325, 2005.
119. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL: Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *Faseb J* 15:879, 2001.
120. Hensler T, Hecker H, Heeg K, Heidecke CD, Bartels H, Barthlen W, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B: Distinct mechanisms of immunosuppression as a consequence of major surgery. *Infect Immun* 65:2283, 1997.
121. Heidecke CD, Hensler T, Weighardt H, Zantl N, Wagner H, Siewert JR, Holzmann B: Selective defects of T lymphocyte function in patients with lethal intraabdominal infection. *Am J Surg* 178:288, 1999.
122. Heuer JG, Zhang T, Zhao J, Ding C, Cramer M, Justen KL, Vonderfecht SL, Na S: Adoptive transfer of in vitro-stimulated CD4+CD25+ regulatory T cells increases bacterial clearance and improves survival in polymicrobial sepsis. *J Immunol* 174:7141, 2005.
123. Scumpia PO, Delano MJ, Kelly KM, O'Malley KA, Efron PA, McAuliffe PF, Brusko T, Ungaro R, Barker T, Wynn JL, Atkinson MA, Reeves WH, Salzler MJ, Moldawer LL: Increased natural CD4+CD25+ regulatory T cells and their suppressor activity do not contribute to mortality in murine polymicrobial sepsis. *J Immunol* 177:7943, 2006.

124. Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, Weston MA, Coligan JE, Schwartz RH, Pardoll DM: A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* 329:251, 1987.
125. Onoe K, Yanagawa Y, Minami K, Iijima N, Iwabuchi K: Th1 or Th2 balance regulated by interaction between dendritic cells and NKT cells. *Immunol Res* 38:319, 2007.
126. Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Van Kaer L, Saiki I, Okumura K: Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways. *J Immunol* 166:6012, 2001.
127. Rhee RJ, Carlton S, Lomas JL, Lane C, Brossay L, Cioffi WG, Ayala A: Inhibition of CD1d activation suppresses septic mortality: a role for NK-T cells in septic immune dysfunction. *J Surg Res* 115:74, 2003.
128. Etogo AO, Nunez J, Lin CY, Toliver-Kinsky TE, Sherwood ER: NK but not CD1-restricted NKT cells facilitate systemic inflammation during polymicrobial intra-abdominal sepsis. *J Immunol* 180:6334, 2008.
129. Tschope J, Martignoni A, Goetzman HS, Choi LG, Wang Q, Noel JG, Ogle CK, Pritts TA, Johannigman JA, Lentsch AB, Caldwell CC: Gammadelta T cells mitigate the organ injury and mortality of sepsis. *J Leukoc Biol* 83:581, 2008.
130. Chung CS, Watkins L, Funches A, Lomas-Neira J, Cioffi WG, Ayala A: Deficiency of gammadelta T lymphocytes contributes to mortality and immunosuppression in sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291:R1338, 2006.
131. Takano M, Nishimura H, Kimura Y, Mokuno Y, Washizu J, Itohara S, Nimura Y, Yoshikai Y: Protective roles of gamma delta T cells and interleukin-15 in Escherichia coli infection in mice. *Infect Immun* 66:3270, 1998.
132. Berguer R, Ferrick DA: Differential production of intracellular gamma interferon in alpha beta and gamma delta T-cell subpopulations in response to peritonitis. *Infect Immun* 63:4957, 1995.

133. Aguilar MM, Battistella FD, Owings JT, Olson SA, MacColl K: Posttraumatic lymphocyte response: a comparison between peripheral blood T cells and tissue T cells. *J Trauma* 45:14, 1998.
134. Skeen MJ, Rix EP, Freeman MM, Ziegler HK: Exaggerated proinflammatory and Th1 responses in the absence of gamma/delta T cells after infection with *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 69:7213, 2001.
135. Cavaillon JM, Adib-Conquy M: Monocytes/macrophages and sepsis. *Crit Care Med* 33:S506, 2005.
136. Simovart HE, Poldoja E, Kokk K, Tapfer H, Liigant A, Talvik R, Roosaar P: Changes of activated macrophages and apoptotic cell count in the organs of rats during experimental sepsis. *Medicina (Kaunas)* 39:932, 2003.
137. Simovart HE, Arend A, Tapfer H, Kokk K, Aunapuu M, Poldoja E, Selstam G, Liigant A: Experimental sepsis: characteristics of activated macrophages and apoptotic cells in the rat spleen. *Ann N Y Acad Sci* 1090:253, 2006.
138. Fadok VA, Bratton DL, Henson PM: Phagocyte receptors for apoptotic cells: recognition, uptake, and consequences. *J Clin Invest* 108:957, 2001.
139. Henson PM, Hume DA: Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol* 27:244, 2006.
140. Lucas M, Stuart LM, Zhang A, Hodivala-Dilke K, Febraio M, Silverstein R, Savill J, Lacy-Hulbert A: Requirements for apoptotic cell contact in regulation of macrophage responses. *J Immunol* 177:4047, 2006.
141. Lucas M, Stuart LM, Savill J, Lacy-Hulbert A: Apoptotic cells and innate immune stimuli combine to regulate macrophage cytokine secretion. *J Immunol* 171:2610, 2003.
142. Swan R, Chung CS, Albina J, Cioffi W, Perl M, Ayala A: Polymicrobial sepsis enhances clearance of apoptotic immune cells by splenic macrophages. *Surgery* 142:253, 2007.
143. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Grayson MH, Osborne DF, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith C, Karl IE: Depletion of dendritic cells, but not macrophages, in patients with sepsis. *J Immunol* 168:2493, 2002.

144. Tinsley KW, Grayson MH, Swanson PE, Drewry AM, Chang KC, Karl IE, Hotchkiss RS: Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. *J Immunol* 171:909, 2003.
145. Efron PA, Martins A, Minnich D, Tinsley K, Ungaro R, Bahjat FR, Hotchkiss R, Clare-Salzler M, Moldawer LL: Characterization of the systemic loss of dendritic cells in murine lymph nodes during polymicrobial sepsis. *J Immunol* 173:3035, 2004.
146. Lanzavecchia A, Sallusto F: Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290:92, 2000.
147. Whelan M, Harnett MM, Houston KM, Patel V, Harnett W, Rigley KP: A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *J Immunol* 164:6453, 2000.
148. Lipscomb MF, Masten BJ: Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev* 82:97, 2002.
149. Vendetti S, Chai JG, Dyson J, Simpson E, Lombardi G, Lechler R: Anergic T cells inhibit the antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol* 165:1175, 2000.
150. Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH: Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 159:4772, 1997.
151. van der Poll T, de Waal Malefyt R, Coyle SM, Lowry SF: Antiinflammatory cytokine responses during clinical sepsis and experimental endotoxemia: sequential measurements of plasma soluble interleukin (IL)-1 receptor type II, IL-10, and IL-13. *J Infect Dis* 175:118, 1997.
152. Maestroni GJ: Short exposure of maturing, bone marrow-derived dendritic cells to norepinephrine: impact on kinetics of cytokine production and Th development. *J Neuroimmunol* 129:106, 2002.
153. Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R: The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 179:1895, 1994.
154. Bloom BR, Bennett B: Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 153:80, 1966.

155. Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R: MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 365:756, 1993.
156. Schober A, Bernhagen J, Weber C: Chemokine-like functions of MIF in atherosclerosis. *J Mol Med*, 2008.
157. Taylor JA, 3rd, Kuchel GA, Hegde P, Voznesensky OS, Claffey K, Tsimikas J, Leng L, Bucala R, Pilbeam C: Null mutation for macrophage migration inhibitory factor (MIF) is associated with less aggressive bladder cancer in mice. *BMC Cancer* 7:135, 2007.
158. Meyer-Siegler KL, Vera PL, Iczkowski KA, Bifulco C, Lee A, Gregersen PK, Leng L, Bucala R: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene polymorphisms are associated with increased prostate cancer incidence. *Genes Immun* 8:646, 2007.
159. Camlica H, Duranyildiz D, Oguz H, Oral EN, Yasasever V: The Diagnostic Value of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) in Gastric Cancer. *Pathol Oncol Res*, 2008.
160. Stosic-Grujicic S, Stojanovic I, Maksimovic-Ivanic D, Momcilovic M, Popadic D, Harhaji L, Miljkovic D, Metz C, Mangano K, Papaccio G, Al-Abed Y, Nicoletti F: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is necessary for progression of autoimmune diabetes mellitus. *J Cell Physiol* 215:665, 2008.
161. Sprong T, Pickkers P, Geurts-Moespot A, van der Ven-Jongekrijg J, Neeleman C, Knaup M, Leroy D, Calandra T, van der Meer JW, Sweep F, van Deuren M: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in meningococcal septic shock and experimental human endotoxemia. *Shock* 27:482, 2007.
162. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R: MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377:68, 1995.
163. Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR: Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* 189:341, 1999.

164. Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, Heumann D, Männel DN, Bucala R, Glauser MP: Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* 6:164, 2000.
165. Baumann R, Casaulta C, Simon D, Conus S, Yousefi S, Simon HU: Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *Faseb J* 17:2221, 2003.
166. Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:345, 2002.
167. Onodera S, Ohshima S, Tohyama H, Yasuda K, Nishihira J, Iwakura Y, Matsuda I, Minami A, Koyama Y: A novel DNA vaccine targeting macrophage migration inhibitory factor protects joints from inflammation and destruction in murine models of arthritis. *Arthritis Rheum* 56:521, 2007.
168. Tohyama S, Onodera S, Tohyama H, Yasuda K, Nishihira J, Mizue Y, Hamasaka A, Abe R, Koyama Y: A novel DNA vaccine-targeting macrophage migration inhibitory factor improves the survival of mice with sepsis. *Gene Ther*, 2008.
169. Jouvenne P, Fossiez F, Banchereau J, Miossec P: High levels of neutralizing autoantibodies against IL-1 alpha are associated with a better prognosis in chronic polyarthritis: a follow-up study. *Scand J Immunol* 46:413, 1997.
170. Dalum I, Butler DM, Jensen MR, Hindersson P, Steinaa L, Waterston AM, Grell SN, Feldmann M, Elsner HI, Mouritsen S: Therapeutic antibodies elicited by immunization against TNF-alpha. *Nat Biotechnol* 17:666, 1999.
171. Wang X, Wang BR, Zhang XJ, Duan XL, Guo X, Ju G: Fos expression in the rat brain after intraperitoneal injection of *Staphylococcus enterotoxin B* and the effect of vagotomy. *Neurochem Res* 29:1667, 2004.

172. Marquette C, Linard C, Galonnier M, Van Uye A, Mathieu J, Gourmelon P, Clarencon D: IL-1beta, TNFalpha and IL-6 induction in the rat brain after partial-body irradiation: role of vagal afferents. *Int J Radiat Biol* 79:777, 2003.
173. Goehler LE, Gaykema RP, Nguyen KT, Lee JE, Tilders FJ, Maier SF, Watkins LR: Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? *J Neurosci* 19:2799, 1999.
174. Kessler W, Traeger T, Westerholz A, Neher F, Mikulcak M, Muller A, Maier S, Heidecke CD: The vagal nerve as a link between the nervous and immune system in the instance of polymicrobial sepsis. *Langenbecks Arch Surg* 391:83, 2006.
175. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ: Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405:458, 2000.
176. Wang H, Liao H, Ochani M, Justiniani M, Lin X, Yang L, Al-Abed Y, Wang H, Metz C, Miller EJ, Tracey KJ, Ulloa L: Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med* 10:1216, 2004.
177. van Westerloo DJ, Giebelan IA, Florquin S, Daalhuisen J, Bruno MJ, de Vos AF, Tracey KJ, van der Poll T: The cholinergic anti-inflammatory pathway regulates the host response during septic peritonitis. *J Infect Dis* 191:2138, 2005.
178. Wu R, Dong W, Cui X, Zhou M, Simms HH, Ravikumar TS, Wang P: Ghrelin down-regulates proinflammatory cytokines in sepsis through activation of the vagus nerve. *Ann Surg* 245:480, 2007.
179. Vizi ES, Elenkov IJ: Nonsynaptic noradrenaline release in neuro-immune responses. *Acta Biol Hung* 53:229, 2002.
180. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES: The sympathetic nerve -an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 52:595, 2000.

181. Zhou M, Yang S, Koo DJ, Ornan DA, Chaudry IH, Wang P: The role of Kupffer cell alpha(2)-adrenoceptors in norepinephrine-induced TNF-alpha production. *Biochim Biophys Acta* 1537:49, 2001.
182. Yang S, Koo DJ, Zhou M, Chaudry IH, Wang P: Gut-derived norepinephrine plays a critical role in producing hepatocellular dysfunction during early sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279:G1274, 2000.
183. Wang Q, Wang YBW, W.J., Yao YJ, Dou KF: Effect of Xuebijing Injection on Liver High Mobility Group Box-1 Protein Expression in Rats with Delayed Resuscitation after Scald Injury. *Journal of US-China Medical Science* 4:13, 2007.
184. Zhang SW, Sun CD, Wen Y, Yin CH: Effect of treatment with Xuebijing injection on serum inflammatory mediators and Th1/2 of spleen in rats with sepsis. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 18:673, 2006.
185. Mao YS, Lv T, Sun XD, Zhou L, Ying LJ, Jin LZ: Influence of Xuebijing injection on hemodynamics and oxygen metabolism in patients with septic shock. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 19:627, 2007.
186. Li YP, Qiao YJ, Wu ZX, Qian FF, Yao YM, Yu Y, Wu Y: Effects of Xuebijing injection on protein C and tumor necrosis factor-alpha mRNA in rats with sepsis. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 19:488, 2007.
187. Zhu XQ, Wang L, Liu QQ, Yao YM: Protective effects of Xuebijing injection on kidney in rats with sepsis. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 18:680, 2006.
188. Kimura M, Osada E, Matsui T, Kobayashi C: Fundamental research for the pharmacological activity of Oriental drugs. IX. On the combined action of several crude drugs consisting in "Rokusingan" for the anti-inflammatory effect. *Yakugaku Zasshi* 88:135, 1968.
189. Ma H, Kou J, Zhu D, Yan Y, Yu B: Liu-Shen-Wan, a traditional Chinese medicine, improves survival in sepsis induced by cecal ligation and puncture via reducing TNF-alpha levels, MDA content and enhancing macrophage phagocytosis. *Int Immunopharmacol* 6:1355, 2006.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Ablauf der B-Zell-Aktivierung (in Anlehnung an JANEWAY [16]).....	7
Abbildung 2: Aufbau der verschiedenen sezernierten Antikörper-Isotypen.....	8
Abbildung 3: Zeitverlauf der Immunreaktion bei Sepsis (in Anlehnung an GRIMMINGER et al [49])	15
Abbildung 4: Versuchsplan zur Untersuchung der Antikörperantwort nach Immunisierung während der Immunparalyse.	26
Abbildung 5: Versuchsplan zur Untersuchung des zeitabhängigen Einflusses einer septischen Peritonitis auf die Antikörper-Antwort.	28
Abbildung 6: Schematische Darstellung des verwendeten indirekten ELISAs zur Messung der Ovalbumin-spezifischen Antikörpermenge in den Seren der untersuchten Mäuse.....	31
Abbildung 7: Schematische Darstellung des verwendeten direkten ELISAs zur Messung der Gesamt-IgG- und Gesamt-IgM-Antikörpermenge in den Seren der untersuchten Mäuse.....	32
Abbildung 8: Beispiel einer Standardkurve.	34
Abbildung 9: Gesamt-IgM nach Immunisierung und unterschiedlicher Vorbehandlung.....	37
Abbildung 10: Ovalbumin-spezifisches IgM nach Immunisierung und unterschiedlicher Vorbehandlung.....	38
Abbildung 11: Gesamt-IgG nach Immunisierung und unterschiedlicher Vorbehandlung.	39
Abbildung 12: Ovalbumin-spezifisches IgG nach Immunisierung und unterschiedlicher Vorbehandlung.....	40
Abbildung 13: Ovalbumin-spezifisches IgG1 nach Immunisierung und unterschiedlicher Vorbehandlung.	41

Abbildung 14: Ovalbumin-spezifisches IgG2a nach Immunisierung und unterschiedlicher Vorbehandlung.....	42
Abbildung 15: Gesamt-IgM nach Immunisierung und unterschiedlichen zeitlichen Abständen zwischen CLP und Immunisierung.....	45
Abbildung 16: Ovalbumin-spezifisches IgM nach Immunisierung und unterschiedlichen zeitlichen Abständen zwischen CLP und Immunisierung.....	46
Abbildung 17: Gesamt-IgG nach Immunisierung und unterschiedlichen zeitlichen Abständen zwischen CLP und Immunisierung.....	48
Abbildung 18: Ovalbumin-spezifisches IgG nach Immunisierung und unterschiedlichen zeitlichen Abständen zwischen CLP und Immunisierung.....	49
Abbildung 19: Ovalbumin-spezifisches IgG1 nach Immunisierung und unterschiedlichen zeitlichen Abständen zwischen CLP und Immunisierung.....	51
Abbildung 20: Ovalbumin-spezifisches IgG2a nach Immunisierung und unterschiedlichen zeitlichen Abständen zwischen CLP und Immunisierung.....	52
Abbildung 21: Hypothetische Rolle und Interaktion von regulatorischen Zellen bei Sepsis (in Anlehnung an VENET et al [107]).	59

9 Formelverzeichnis

Formel 1:	Abschätzung welcher Typus von T-Helferzelle an der Immunantwort in der Maus mitwirkt.....	10
Formel 2:	Definition der Transmission.....	29
Formel 3:	Zusammenhang zwischen Absorption und Transmission.	29
Formel 4:	Definition der Einheit „relative ELISA-Unit“.	34

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Daniela Männel, Leiterin des Instituts für Immunologie an der Universität Regensburg, die mir freundlicherweise dieses sehr interessante Thema überließ, mich hervorragend betreute und für auftauchende Probleme immer eine gute Lösung parat hatte.

Frau Prof. Dr. Gabriele Kirchner aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I am Klinikum der Universität Regensburg danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Ebenfalls ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Sybille Grießl bedanken, die mir durch ihre freundliche, geduldige Art, ihre intensive und unermüdliche Unterstützung bei der Planung der Tierexperimente sowie bei Erlernung labortechnischer Methoden kompetent zur Seite stand.

Zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die mich während meines Studiums und bei dieser Arbeit in jeglicher Art unterstützt haben.

