

Aus dem Zentrum der Chirurgie  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main  
Klinik für Allgemein- und Gefäßchirurgie  
Direktor: Professor Dr. med. W.O. Bechstein

**Untersuchungen zur Sauerstoffradikalproduktion  
emigrierter und zirkulierender polymorphkerniger  
Leukozyten bei Patienten mit sekundärer Peritonitis**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von  
**Andrea Richter**  
aus Hanau

Frankfurt am Main, 2002

Dekan: Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter

Referent : Prof. Dr. med. A. Encke

Korreferent: PD Dr. med. T. Zollner

Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.04

## **Meinen Eltern**

## ABKÜRZUNGEN

APACHE	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score
ARDS	Adult Respiratory Distress Syndrome
ATP	Adenosintriphosphat
BFM	Buflomedilhydrochlorid
C5a	Komplement 5a
cAMP	zyklisches Adenosin-5`-monophosphat
CD	cluster of differentiation
cpm	counts per minute
DIO	Diocetadecyloxacarbozianine
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendinitrilo-Tetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EU	Endotoxin Units
FL-1	Fluorescence 1
FL-2	Fluorescence 2
FMLP	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC-SSC	Forwardscatter-sidewardsscatter
g	Erdbeschleunigung
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBBA	Hanks balanced salt solution with bovine serum albumin
HBSS	Hanks balanced salt solution
HOCl	Hypochlorige Säure
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
ICAM-2	intercellular adhesion molecule-2
IE	Internationale Einheiten
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL-10	Interleukin 10
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
LBP	Lipopolysaccharid-Binde-Protein
LPS	Lipopolysaccharid

MPI	Mannheimer Peritonitis Index
NADPH	Nicotinsäureamidadenindinucleotidphosphat
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Anion
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singulett-sauerstoff
OH <sup>-</sup>	Hydroxylradikal
PBS	Phosphat buffered saline
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMNL	polymorphkernige Leukozyten
ePMNL	emigrierte polymorphkernige Leukozyten
zPMNL	zirkulierende polymorphkernige Leukozyten
iPMNL	isolierte polymorphkernige Leukozyten
niPMNL	nichtisolierte polymorphkernige Leukozyten
PTF	Pentoxiphyllin
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor alpha

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Definition der Peritonitis	1
1.2	Therapie der Peritonitis	2
1.3	Pathophysiologie der Peritonitis	3
1.3.1	Chemotaxis	4
1.3.2	Diapedese	4
1.3.3	Antimikrobielle Aktivität	4
1.4	Sauerstoffradikale	5
1.5	Chemilumineszenz	7
1.6	Nichtoxidative Mechanismen der Zellschädigung	7
1.7	Bisherige Erkenntnisse	8
1.8	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	8
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>10</b>
2.1	Präparation der Chemilumineszenzreagenzien	10
2.1.1	5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalazined-Ion (Luminol)	10
2.1.2	Bis-N-Methylacridinium- Nitrat (Luzigenin)	10
2.1.3	Cytochalasin B	10
2.2	Reagenzien zur Aktivierung der Sauerstoffradikalproduktion	11
2.2.1	Komplement 5a	11
2.2.2	N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin	12
2.2.3	Lipopolysaccharid von Escherichia coli	12
2.2.4	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha	12
2.2.5	Ca-Ionophore	13
2.2.6	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat	13
2.2.7	Zymosan	13
2.2.8	C3-Zymosan	14
2.3	Reagenzien zur Hemmung der Sauerstoffradikalproduktion	14
2.3.1	Buflomedilhydrochlorid	14
2.3.2	Chloraminlösung	14
2.3.3	2-Chloro-Adenosin	15
2.3.4	Pentoxiphyllin	15
2.4	Materialien des Phagozytosassays	15
2.4.1	D3,3'-Diocadecyloxacarbocyanine Perchlorat-Färbelösung	15
2.4.2	Fixierlösung	16
2.4.3	Lysing Solution	16
2.4.4	Propidiumjodid	16
2.5	Patienten- und Kontrollgruppe	16
2.6	Erfassung des klinischen Gesundheitszustands	20
2.7	Probenentnahme	21
2.8	Verarbeitung des gewonnenen Materials	21
2.8.1	Bestimmung der Endotoxin-, IL-8-, IL-10-, und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen	21
2.8.2	Vorbereitung, Differenzierung und Isolierung der Vollblutproben	22
2.8.3	Vorbereitung der Peritonealsekretproben	22
2.9	Messung der Sauerstoffradikalproduktion	24
2.9.1	Verhältnis von eingesetzter Zellzahl zu Chemilumineszenz	25
2.9.2	Vergleichende Untersuchung isolierter und nichtisolierter PMNL	25
2.9.3	Etablierung der Untersuchungskonditionen	25
2.9.4	Dosis-Wirkungsbeziehung der eingesetzten Stimuli	25
2.9.5	Hemmung der Sauerstoffradikalproduktion	26

<b>2.10 Phagozytoseassay</b>	26
2.10.1 Messung	28
2.10.2 Auswertung	28
<b>2.11 Bestimmung pro- und antiinflammatorischer Mediatoren</b>	30
2.11.1 Endotoxin	30
2.11.2 Interleukin-8	30
2.11.3 Interleukin-10	31
2.11.4 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$	31
<b>2.12 Statistische Auswertung</b>	31
<b>3 ERGEBNISSE</b>	32
<b>3.1 Pro- und antiinflammatorische Mediatoren im Peritonealsekret und Plasma</b>	32
<b>3.2 Reinheit und Vitalität der PMNL</b>	33
<b>3.3 Sauerstoffradikalproduktion polymorphkerniger Leukozyten</b>	34
3.3.1 Einfluß der Isolation von PMNL auf die Sauerstoffradikalproduktion	34
3.3.2 Einfluß der Lagerungszeit auf die Sauerstoffradikalbildung	35
3.3.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung	35
3.3.4 Spontane Sauerstoffradikalproduktion emigrierter und zirkulierender PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis und Kontrollen	37
3.3.5 Stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter und zirkulierender PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis und Kontrollen	39
3.3.5.1 Stimulierte (luzigeninverstärkte) extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL bei Patienten mit Peritonitis	40
3.3.5.2 Stimulierte (luzigeninverstärkte) extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter und zirkulierender PMNL bei Kontrollen	41
3.3.5.3 Durch LPS und Plasma stimulierte extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL (Kontrollen, Peritonitis)	42
3.3.5.4 Stimulierte (luminolverstärkte) Phagozytose-assoziierte intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL	43
3.3.6 Untersuchungen der Sauerstoffradikalproduktion von Patienten mit unkompliziertem und kompliziertem Verlauf einer Peritonitis	44
3.3.6.1 Reinheit und Vitalität der emigrierten PMNL	45
3.3.6.2 Stimulierte Sauerstoffradikalproduktion bei Patienten mit unkompliziertem Verlauf einer Peritonitis	45
3.3.6.3 Stimulierte Sauerstoffradikalproduktion bei Patienten mit kompliziertem Verlauf einer Peritonitis	46
3.3.6.4 Phagozytose-assoziierte (luminolverstärkte) intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL	49
3.3.7 Ätiologie der Peritonitis	50
3.3.7.1 Reinheit und Vitalität der PMNL	50
3.3.7.2 Stimulierte Sauerstoffradikalproduktion der ePMNL bei Patienten mit Peritonitis unterschiedlicher Ätiologie	51
<b>3.4 Relaparotomie</b>	54
<b>3.5 Hemmung der Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL</b>	55
3.5.1 Hemmung der extrazellulären Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL	55
3.5.2 Hemmung der Phagozytose-assoziierten intrazellulären Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL	56
<b>3.6 Einfluß der Reduktion der Sauerstoffradikalproduktion auf die Phagozytoseaktivität emigrierter PMNL</b>	58

<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	59
4.1	Methodenkritik	61
4.2	Zytokine	61
4.3	Endotoxin	62
4.4	Sauerstoffradikalproduktion	63
4.4.1	Extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion	63
4.4.2	LPS- und TNF- $\alpha$ -stimulierte extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion	67
4.4.3	<b>Intrazelluläre Phagozytose-assoziierte Sauerstoffradikalproduktion</b>	69
4.4.4	Sauerstoffradikalproduktion nach Relaparotomie	70
4.5	Therapeutische Ansätze	71
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	73
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	75



# 1 EINLEITUNG

Durch die Einführung der operativen Sanierung der Bauchhöhle Ende des 19. Jahrhunderts konnte die Letalität der abdominalen Sepsis hervorgerufen durch eine Peritonitis auf etwa 50 % gesenkt werden. Trotz weiter entwickelter chirurgischer Techniken, potenter Antibiotikatherapie und erheblicher intensivmedizinischer Fortschritte ist die Peritonitis jedoch noch immer mit einer hohen Letalität assoziiert (1). Häufig entwickelt sich aus der lokalisierten Entzündung der Bauchhöhle eine generalisierte Sepsis mit multiplem Organversagen.

Die hohe Inzidenz der Peritonitis sowie eine Letalität von 20 - 50% erfordern ein besseres Verständnis der Pathophysiologie, um so neue Therapieformen entwickeln zu können (2, 3, 4, 5).

## 1.1 Definition der Peritonitis

Die Peritonitis bezeichnet die entzündliche Reaktion des Peritoneums aufgrund bakterieller, viraler oder chemisch-toxischer Ursachen (6, 7). Nach Ursprung der Peritonitis wird zwischen primärer, sekundärer sowie tertiärer Peritonitis unterschieden.

Die primäre Peritonitis stellt eine spontane bakterielle Infektion des Peritoneums dar. Sie entsteht durch hämatogene oder lymphogene Invasion der Bauchhöhle durch Bakterien. Die Pneumokokkenperitonitis im Kindesalter sowie Aszitesinfektionen bei Leberfunktionsstörungen oder Peritonitis bei Peritonealdialyse stellen Beispiele einer primären Peritonitis dar (2).

Die sekundäre Peritonitis bezeichnet die lokalisierte oder diffuse Peritonitis durch endogene Kontamination mit aeroben bzw. anaeroben Bakterien der Darmflora nach Perforation eines Hohlorgans (5, 7). Sie liegt in ca. 80 % der Fälle vor. Häufige Ursache der sekundären Peritonitis ist eine Ulkusperforation, Appendizitis, Divertikulitis oder postoperative Anastomoseninsuffizienz.

Die tertiäre Peritonitis stellt eine persistierende sekundäre Peritonitis dar. Nach adäquater chirurgischer Sanierung des entzündlichen Herdes sowie antibiotischer Therapie bleibt die peritoneale und systemische Infektion bestehen. Es findet eine

Selektionierung niedrig-pathogener, z.T. aber auch multiresistenter Keime statt (6,7). Diese rekurrente Infektion der Bauchhöhle ist mit den üblichen Verfahren wie Sonographie, Computertomographie oder auch Laparotomie nur schwer zu lokalisieren.

## **1.2 Therapie der Peritonitis**

Die primäre Peritonitis stellt häufig eine monomikrobielle Infektion dar und wird konservativ durch intravenöse Infusion von Antibiotika therapiert. Die chirurgische Intervention ist nur bei einer Verschlechterung der Organfunktion über einen Zeitraum von mehr als drei Tagen indiziert (7).

Vorrangiges Ziel in der Behandlung der sekundären Peritonitis ist die frühzeitige chirurgische Sanierung der Bauchhöhle. Wiederholt konnte gezeigt werden, daß die erfolgreiche Kontrolle des Infektionsherdes für die Prognose des Patienten von entscheidender Bedeutung ist (3, 6, 7). Nach erstmals erfolgreicher operativer Behandlung eines perforierten Magenulkus durch den Chirurgen Mikulicz wurden Anfang des 20. Jahrhunderts Behandlungsstrategien der sekundären Peritonitis aufgestellt, die bis heute in modifizierter Art Gültigkeit haben: die frühzeitige Operation mit Elimination des Infektionsherdes, die Beseitigung des Exsudates, der Bakterien sowie des Zelldébris durch intraoperative Lavage und das Einlegen von Drainagen. Systemisch applizierte Antibiotika unterstützen die chirurgische Therapie (6, 7, 8, 9).

Ist die Erstversorgung der Peritonitis unsicher und kann die Infektion nicht ausreichend beherrscht werden, stehen verschiedene chirurgische Verfahren zur Wahl:

- Relaparotomie „on demand“: Bei intensiver postoperativer Überwachung indizierte Relaparotomie, falls Zeichen der Organdysfunktion oder Sepsis auf eine persistierende peritoneale Infektion hinweisen
- Programmierter Relaparotomie: Unabhängig vom klinischen Verlauf wird die geplante Relaparotomie in festen Zeitintervallen, vorzugsweise innerhalb der ersten 48 Stunden nach primärer chirurgischer Herdsanierung, durchgeführt (10)

- Kontinuierliche postoperative Peritoneallavage: bei primärem chirurgischem Verschluss des Abdomens Plazieren von Drainagen in den Bauchraum, die bei verschlossener Abdominalhöhle eine postoperative Spülbehandlung über mehrere Tage ermöglichen
- Laparostomie („offenes Abdomen“): Verschluss der Bauchhöhle erst nach makroskopischer Sanierung der entzündlichen Reaktion. Dieses Verfahren bietet Vorteile bei hämodynamisch instabilen Patienten oder starkem peritonealem Ödem und wird heute meistens nur noch bei Patienten mit nekrotisierender Pankreatitis angewandt

Welche der genannten Methoden in der Behandlung der schweren Peritonitis die größten Erfolge erzielt, ist nicht endgültig gesichert (1, 7, 11, 12).

### **1.3 Pathophysiologie der Peritonitis**

Die Pathophysiologie der Peritonitis ist noch nicht hinreichend geklärt. Jedoch ist die zentrale Rolle polymorphkerniger Leukozyten (PMNL) in der Abwehr pathogener Mikroorganismen durch Phagozytose unumstritten (13).

In der gesunden Peritonealhöhle befindet sich wenig Sekret, das zum größten Teil Lymphozyten, Makrophagen sowie Mesothelzellen enthält. Polymorphkernige Leukozyten befinden sich vornehmlich im peripheren Blutstrom. Existiert in der Peritonealhöhle ein Entzündungsherd, so wandern PMNL durch chemotaktile Botenstoffe angelockt zum Fokus. Der Diapedese durch das Endothel in entzündliches extravasales Gewebe schließt sich die Elimination pathogener Mikroorganismen durch Phagozytose sowie der Produktion von Sauerstoffradikalen und proteolytischer Zerstörung durch PMNL an.

### **1.3.1 Chemotaxis**

Das Vorhandensein von Bakterien und bakteriellen Toxinen (z.B. Endotoxin) in der Peritonealhöhle führt zur Aktivierung von ortsständigen Makrophagen und Mesothelzellen, die proinflammatorische Mediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6) sowie Interleukin-8 (IL-8) verstärkt freisetzen. Der hohe Gradient von proinflammatorischen Mediatoren löst einen Einstrom von PMNL in die Bauchhöhle aus (14, 15, 16). Ebenso werden chemotaktile Mediatoren wie Formylpeptide, Makrophagen-inflammatorisches-Protein-1 $\alpha$  und Makrophagen-inflammatorisches-Protein-1 $\beta$  sowie Komplement 5a (C5a) durch eingedrungene Bakterien, ortsständige Makrophagen bzw. die Aktivierung von Serum-Komplement freigesetzt. Binden diese Mediatoren an polymorphkernige Leukozyten, so findet eine G-Protein gekoppelte Aktivierung der Proteinkinase C statt, aus der Chemotaxis (Wanderung in Richtung des Entzündungsherds) der PMNL resultiert (16, 17, 18, 19).

### **1.3.2 Diapedese**

Die Auswanderung von PMNL aus der Blutbahn in die Bauchhöhle ist nur durch eine intakte Wechselwirkung mit umgebenden Endothelzellen möglich. Die kurzfristige Adhäsion polymorphkerniger Leukozyten an Endothel wird durch Selektine vermittelt. L-Selektin wird vermehrt auf PMNL, E-Selektin auf Endothelzellen exprimiert. Zum festen Anhaften der PMNL an Endothel sind Rezeptoren der Integrinfamilie bzw. Ig-ähnliche Rezeptoren notwendig. Nach Kontakt mit Endotoxinen findet man auf der Oberfläche polymorphkerniger Leukozyten vermehrt die Integrine CD 11/ CD 18, während die Ig-ähnlichen Rezeptoren ICAM-1 sowie ICAM-2 auf Endothelzellen exprimiert werden (20, 21, 22).

### **1.3.3 Antimikrobielle Aktivität**

Nach erfolgter Migration in entzündetes Gewebe adhären PMNL über Oponine wie Komplement oder Immunglobuline an Mikroorganismen. Polymorphkernige Leukozyten identifizieren Immunglobulin G oder Komplement auf der Oberfläche opsonierter Bakterien durch Komplement- und Fc-Rezeptoren. Es folgt die

Phagozytose der Mikroorganismen. Der Umschließung der bakteriellen Bestandteile sowie des Zelldébris durch PMNL in Phagosomen schließt sich die Fusion mit Lysosomen zu Phagolysosomen an. Die Zersetzung und Verdauung pathogener Mikroorganismen findet im Phagolysosom durch die Produktion von Sauerstoffradikalen sowie die Freisetzung proteolytischer Enzyme statt (17, 18).

Neben der Elimination pathogener Mikroorganismen durch polymorphkernige Leukozyten werden Bakterien in die Lymphbahn und in die systemische Zirkulation absorbiert (22).

#### 1.4 Sauerstoffradikale

Sauerstoffradikale bezeichnen reaktive oxidative Intermediate, die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen auf dem äußeren Orbital besitzen. Sie entstehen durch die Reduktion molekularen Sauerstoffs. Zu der Gruppe der Sauerstoffradikale gehören das Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ), Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ), hypochlorige Säure (HOCl), sowie das Hydroxylradikal ( $OH^\cdot$ ) (17, 18, 23, 24).

Die Aktivierung polymorphkerniger Leukozyten durch chemotaktile bzw. diapedese- und phagozytosevermittelnde Rezeptorinteraktionen mit dem Ziel der Elimination pathogener Mikroorganismen hat eine Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase und konsekutiv die Produktion von Sauerstoffradikalen zur Folge (25). Die aktivierte NADPH-Oxidase katalysiert die Reduktion molekularen Sauerstoffs zu Superoxid-Anion:

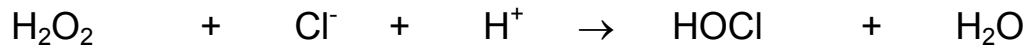


\*NADPH-Oxidase

Superoxid-Anion verbindet sich spontan bzw. durch die Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid:



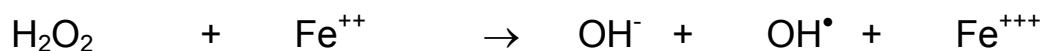
Chlor steht als Reaktionspartner für die durch die Myeloperoxidase katalysierte Reaktion in großer Menge zur Verfügung. Aus der Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Chlor entsteht hypochlorige Säure:



Superoxid-Anion, Wasserstoffperoxid und hypochlorige Säure stellen starke Oxidantien dar. Neben der protektiven Elimination eingedrungener pathogener Mikroorganismen sind die Sauerstoffradikale jedoch ebenso für die Verursachung von Schäden des umgebenden Gewebes verantwortlich. Durch die Inaktivierung von Proteinaseinhibitoren und der damit einhergehenden ungehemmten Aktivierung eiweißabbauender Enzyme wird eine verstärkte Proteolyse vermittelt. Zelluläre Bestandteile wie Plasmamembranen sowie Plasmaproteine werden durch Digestion der zellulären Matrix zerstört (26).

Einen weiteren äußerst toxischen Metaboliten des Wasserstoffperoxids stellt das Hydroxylradikal dar. Das Hydroxylradikal initiiert die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Plasmamembranen und Zellorganellen. Darüber hinaus inaktiviert das Hydroxylradikal zelleigene Proteine, woraus ausgedehnte Gewebeschäden resultieren (27).

Unklar bleibt, ob die Produktion des Hydroxyl-Radikals im PMNL stattfindet. Die Umwandlung von Wasserstoffperoxid zum Hydroxyl-Radikal wird durch zweifach positiv geladenes Eisen ( $\text{Fe}^{++}$ ) in der Haber-Weiss-Reaktion katalysiert:



Gewöhnlich extrazellulär gebundenes Eisen steht nach Meinung einiger Autoren für die Katalysierung der Haber-Weiss-Reaktion nicht zur Verfügung (17, 25).

## **1.5 Chemilumineszenz**

Die Chemilumineszenz ist eine Aussendung von Kaltlicht ohne vorherige Energiezufuhr. Sauerstoffradikale können eine native Chemilumineszenz erzeugen. Durch sogenannte „chemilumigenic probes“ wie Luminol oder Luzigenin kann die native Chemilumineszenz erheblich verstärkt werden.

Die Chemilumineszenz wurde erstmals von Allen et al 1972 beschrieben (28). Die Sauerstoffradikalproduktion und damit verbundene Chemilumineszenz ist durch bakterielle Peptide, Komplementspaltprodukte, proinflammatorische Zytokine, Lipopolysaccharide und opsonierte Zymosanpartikel, die zu einer Aktivierung der Leukozyten führen, zu erhöhen (29, 30, 31, 32).

## **1.6 Nichtoxidative Mechanismen der Zellschädigung**

Neben oxidativen Mechanismen wie der Bildung von Sauerstoffradikalen sind auch nichtoxidative Mechanismen für die Schädigung körpereigenen Gewebes verantwortlich. Durch die kapilläre Akkumulation polymorphkerniger Leukozyten sowie die Freisetzung von Fibrinogenspaltprodukten und Thrombin werden Gefäßverschlüsse verursacht. Daraus resultieren ischämische Endothelschäden und ein perivaskuläres Ödem. Darüber hinaus führt die Aktivierung hydrolytischer Enzyme wie Elastase, Kathepsin G, Lysozym und Kollagenase zur Zerstörung der Zellwand und Zellorganellen. Tierexperimentell konnten durch die Sequestration von Leukozyten ausgelöste morphologische Schäden an der Leber, der Lunge sowie der Milz festgestellt werden (27, 33, 34). Eine Beteiligung polymorphkerniger Leukozyten an der Pathogenese des Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS), Ischämie-Reperfusionsschäden an Herz und Skelettmuskel sowie rheumatoider Arthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist erwiesen (22, 35, 36).

## **1.7 Bisherige Erkenntnisse**

Die sekundäre Peritonitis ist mit einer hohen endogenen Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  assoziiert (37, 38). In der infizierten Peritonealhöhle konnten in bisherigen Untersuchungen erheblich größere Konzentrationen an Entzündungsmediatoren als in der systemischen Zirkulation nachgewiesen werden. Die perioperativ erfaßte lokale Konzentration an TNF- $\alpha$  bei Patienten mit sekundärer Peritonitis entsprach im Peritonealexsudat der 25fachen systemischen Konzentration, während die Konzentration an IL-8 in der Bauchhöhle sogar den 100fachen Wert der Konzentration des Plasmas annahm (39, 40). Diese Kompartimentierung von Entzündungsmediatoren in der Abdominalhöhle könnte die Zellfunktion emigrierter polymorphkerniger Leukozyten modulieren.

Nach Emigration humaner und tierischer PMNL zeigte sich in bisher vorliegenden Studien eine erhöhte Sauerstoffradikalproduktion der Leukozyten (41, 42). Die Phagozytosekapazität polymorphkerniger Leukozyten war hingegen durch proteolytische sowie oxidative Zerstörung der Opsonine nach Emigration deaktiviert (43, 44). Bislang wurde die Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL vornehmlich im Rahmen tierexperimentell verursachter Peritonitis (42, 43) oder der Einwanderung humaner Granulozyten in nichtentzündetes Gewebe (41) analysiert. Es existieren jedoch nur wenige Untersuchungen zur Funktion emigrierter intraabdominaler polymorphkerniger Leukozyten bei Patienten mit sekundärer Peritonitis (26).

## **1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit**

Die vorliegende Untersuchung charakterisiert die Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender sowie emigrierter, intraabdominaler polymorphkerniger Leukozyten bei Patienten mit sekundärer Peritonitis. Dabei wurde die spontane und stimulierte extrazelluläre sowie intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion der Leukozyten analysiert. Patienten nach abdominalchirurgischer Operation dienten als Kontrollen. Pro- und antiinflammatorische Zytokine wurden in der Abdominalhöhle sowie in der systemischen Zirkulation im Hinblick auf folgende Fragestellungen bestimmt:



- Wie hoch sind die Konzentrationen an Entzündungsmediatoren in der Peritonealhöhle im Vergleich zum Plasma bei Patienten mit Peritonitis bzw. bei Kontrollen nach abdominalchirurgischem Eingriff?
- Welchen Einfluß hat die Kompartimentierung der Entzündungsmediatoren auf die Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL? Läßt sich die Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL mit der Sauerstoffradikalproduktion emigrierter polymorphkerniger Leukozyten bei Patienten mit sekundärer Peritonitis vergleichen? Wie läßt sich die Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender und emigrierter Leukozyten durch verschiedene lösliche und partikuläre Stimuli beeinflussen?
- Welche Unterschiede bezüglich der Sauerstoffradikalproduktion lassen sich bei Patienten mit sekundärer Peritonitis gegenüber Kontrollen nach abdominalchirurgischer Operation feststellen?
- Welchen Einfluß hat die Schwere der Peritonitis auf die Funktion zirkulierender sowie emigrierter PMNL? Wie unterscheidet sich die Sauerstoffradikalproduktion polymorphkerniger Leukozyten bei Patienten mit kompliziertem Verlauf einer sekundären Peritonitis von der Sauerstoffradikalproduktion der PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis ohne Komplikationen?
- Hat die Ätiologie der Peritonitis Einfluß auf die Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender und emigrierter PMNL?
- Läßt sich die Sauerstoffradikalproduktion von PMNL durch antiinflammatorische Substanzen modulieren? Hat der Einsatz dieser Substanzen Einfluß auf die Phagozytoseaktivität polymorphkerniger Leukozyten ?

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Präparation der Chemilumineszenzreagenzien**

#### **2.1.1 5-Amino-2,3-Dihydro-1,4-Phthalazined-Ion (Luminol)**

Luminol wird durch die von polymorphkernigen Leukozyten gebildeten Sauerstoffradikale über mehrere Reaktionsschritte zu 3-Aminophthalate oxidiert. Dieser Prozeß ist von einer Lichtemission bei 425 nm begleitet, woraus eine ca. 1000fache Verstärkung des durch die Sauerstoffradikalproduktion entstehenden Photonenstroms resultiert (45). Durch die Fähigkeit der Diffusion des Luminols über biologische Membranen werden vor allem intra-, aber auch extrazelluläre Sauerstoffradikale erfaßt (46, 47). Luminol (MG=177,2 g, Sigma, Deisenhofen) wurde zu  $10^{-2}$  Mol/l lichtgeschützt in Ammoniumchlorid solubilisiert und mit Hanks balanced salt solution (HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup>, Sigma) auf eine Konzentration von  $10^{-3}$  Mol/l eingestellt. Die Aufbewahrung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### **2.1.2 Bis-N-Methylacridinium-Nitrat (Luzigenin)**

Die durch reaktive Sauerstoffspezies katalysierte Oxidation des Luzigenins ist von einer Lichtemission bei 510 nm begleitet. Aufgrund der hydrophilen Eigenschaften sowie der Größe des Moleküls kann Luzigenin die Zellmembran nicht durchdringen. Es wird demzufolge durch Luzigenin die extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion nachgewiesen (30, 47). Luzigenin hat eine hohe Spezifität für Superoxidanionen (48). Luzigenin (MG= 510,5 g, Sigma) wurde lichtgeschützt zu  $10^{-3}$  Mol/l in HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> gelöst und nach Aliquotierung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.1.3 Cytochalasin B**

Cytochalasin B verhindert die Phagozytose der eingesetzten Stimuli durch polymorphkernige Leukozyten. Cytochalasin B (MG= 479,6 g, Fluka, Deisenhofen) wurde in reinem Ethanol solubilisiert und durch Zugabe von HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> auf eine Endkonzentration von 100 µg/ml eingestellt. Die Aliquots wurden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## **2.2 Reagenzien zur Aktivierung der Sauerstoffradikalproduktion**

Zur Aktivierung der extrazellulären Sauerstoffradikalproduktion wurden rezeptorabhängige und rezeptorunabhängige Stimuli eingesetzt. Eine rezeptorabhängige Stimulation der Sauerstoffradikalproduktion kann durch Komplement 5a (C5a), N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP), Lipopolysaccharid (LPS) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) erzielt werden. Eine rezeptorunabhängige Aktivierung der Sauerstoffradikalproduktion ist durch das Calciumionophore A23187 und Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) möglich. Die partikulären Stimuli Zymosan und C3b-Zymosan wurden zur Verstärkung der Phagozytose-assoziierten intrazellulären Sauerstoffradikalproduktion verwendet.

### **2.2.1 Komplement 5a**

Komplement 5a (C5a) ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 11500 Dalton, das bei der Spaltung der fünften Komponente des Komplementsystems durch die C5-Konvertase entsteht. C5a wird nach Aktivierung der Komplementkaskade durch bakterielle Mikroorganismen eine zentrale Rolle in der Infektabwehr zugeschrieben. Die Vermittlung der Chemotaxis sowie Aggregation polymorphkerniger Leukozyten und Aktivierung der Sauerstoffradikalproduktion durch C5a initiieren eine akute Entzündungsreaktion (49, 50, 51). Diese Effekte werden über einen auf der Zelloberfläche symmetrisch exprimierten spezifischen Rezeptor vermittelt (52, 53). Die Aktivierung von C5a hat zudem eine mikrozirkulatorische Permeabilitätserhöhung und die Freisetzung lysosomaler Enzyme zur Folge (19).

Rekombinantes humanes Komplement 5a (Sigma) wurde in auf 0°C gekühlter Hanks balanced salt solution mit bovinem Serumalbumin (HBBA) solubilisiert und nach Aliquotierung zu 10 µg/ml bei – 80 °C aufbewahrt. Für die Lösung benötigtes HBBA bestand aus HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> und 0,25% bovinem Serumalbumin (Sigma).

### **2.2.2 N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin**

Das chemotaktische Peptid N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (FMLP) aktiviert als ein natürlich vorkommendes bakterielles Peptid die Phospholipase C (54). Die resultierende intrazelluläre Calciumfreisetzung und Phosphorylierung der Proteinkinase C ist Voraussetzung für die gesteigerte Produktion von Sauerstoffradikalen durch PMNL sowie Freisetzung lysosomaler Enzyme (54, 55). Die chemotaktische Wirkung des FMLP wird durch eine Zytoskelettorganisation durch Aktinpolymerisation vermittelt (56). FMLP (MG= 437,6 g, Sigma) wurde zu  $10^{-3}$  Mol/l aliquotiert. Dazu wurde FMLP in Dimethylsulfoxid (DMSO, Serva, Heidelberg) aufgelöst und mit HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.3 Lipopolysaccharid von Escherichia coli**

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteil der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien. LPS wird in großen Mengen beim Untergang bakterieller Mikroorganismen freigesetzt. Strukturelle Bestandteile des LPS sind Polysaccharide sowie ein für die pathophysiologischen Wirkungen verantwortliches Lipid A. Die Begriffe „Endotoxin“ und „Lipopolysaccharid“ werden häufig synonym verwendet. Der Terminus „Endotoxin“ bezeichnet die Kombination aus Lipopolysaccharid und umgebenden Proteinen. Im Plasma befindliches „Lipopolysaccharid-bindendes-Protein“ (LBP) vermittelt die Aktivierung der PMNL durch LPS. Speziell die R-Form des LPS induziert die Sauerstoffradikalproduktion durch polymorphkernige Leukozyten (57, 58, 59, 60). LPS (Sigma) wurde mit HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt, unter Mischen auf dem Vortex MS1 Minishaker (Ika Labortechnik, Wilmington, USA) aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### **2.2.4 Tumor-Nekrose-Faktor-alpha**

Das Akut-Phase-Protein und proinflammatorische Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) wird durch Monozyten, ortsständige Makrophagen, Lymphozyten und Granulozyten während Entzündungsreaktionen synthetisiert.

P55-TNF-Rezeptor- bzw. p75-TNF-Rezeptor-vermittelt (61) aktiviert TNF- $\alpha$  polymorphkernige Leukozyten und führt zu einer erhöhten Sauerstoffradikalproduktion und Phagozytoseaktivität. Die Adhärenz und Aggregation der Leukozyten sowie

deren Degranulation werden gefördert (62). 50000 IU Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (R&D Systems, Wiesbaden) wurden in 1 ml gekühltem HBBA solubilisiert (50000 U/ml). Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Für die Präparation von TNF- $\alpha$  benötigtes HBBA bestand aus HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> und 0,1% bovinem Serumalbumin.

### **2.2.5 Ca-Ionophore**

Das Calcium-Ionophore A23187 induziert durch Calciummobilisation eine Aktivitätssteigerung der NADPH-Oxidase und daraus folgende Verstärkung der Sauerstoffradikalproduktion. Darüber hinaus initiiert A 23187 die Aktivierung der Phospholipase A2 und Arachidonsäurefreisetzung (63, 64).

Unter dem Einfluß von A23187 wurde eine Steigerung der zellulären Aktinpolymerisation und Zytoskelettorganisation beschrieben (56).

A 23187 (MG= 523,6 g, Sigma) wurde zu  $2 \times 10^{-2}$  Mol/l in Dimethylsulfoxid gelöst und mit Aqua ad injectabilia (Braun, Melsungen) auf eine Konzentration von  $10^{-3}$  Mol/l eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.2.6 Phorbol-12-Myristat-13-Acetat**

Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) induziert rezeptorunabhängig eine Aktivierung der Proteinkinase C. Die PMA-stimulierte Produktion reaktiver oxidativer Metabolite wird durch Calcium verstärkt (55, 65, 66). PMA (MG=616,8 g, Sigma) wurde zu  $1,62 \times 10^{-2}$  Mol/l in Dimethylsulfoxid aufgelöst und mit HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> zu  $10^{-3}$  Mol/l resuspendiert. PMA wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.7 Zymosan**

Die Phagozytose des Hefepolysaccharides Zymosan stellt eine Modell für die Elimination bakterieller Bestandteile dar. 1000 mg Zymosan A (Sigma) wurden mit 100 ml NaCl 0,9% solubilisiert und nachfolgend 2 Minuten auf  $100^{\circ}\text{C}$  erhitzt (beheizbarer Magnetprüher RCT Basic, Ika Labortechnik, Wilmington, USA). Dieser Präparation folgte eine 15minütige Behandlung im Ultraschallbad (Buehler-Met AG, Basel, Schweiz) sowie ein zweimaliger Waschvorgang mit NaCl 0,9% (Zentrifugation bei  $1400 \times g$ , Raumtemperatur, 5 Minuten). Zymosan wurde zu  $1,2 \times 10^9$  Partikel/ml bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.8 C3-Zymosan**

Die Opsonierung der Zymosanpartikel erleichtert die Phagozytose des partikulären Stimuli durch polymorphkernige Leukozyten. Die Präparation von C3-Zymosan folgt dem Prinzip der Entfernung von Anti-Zymosan-Immunglobulinen aus dem Serum. Hierzu wurde frisch gepooltes Humanserum (Blutspendedienst, Frankfurt/Main) durch Natrium-Ethylendinitrilo-Tetraessigsäure 10 mmol ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , Applichem, Darmstadt) decalcifiziert. Es folgte eine 30 minütige Inkubation des decalcifizierten Serums mit gewaschenem Zymosan (siehe oben) bei Raumtemperatur zu 30 mg Zymosan/ml Serum. Nach Zentrifugation bei 1400 x g (Raumtemperatur) wurde Zymosan verworfen und das gewonnene Serum mit 0,1 molarer Calciumchloridlösung ( $\text{CaCl}_2$ , Applichem) zu 0,1 ml/ml Serum recalcifiziert. Anschließend wurde dies frisch gewaschenem Zymosan (2,5 mg/ml Serum) zugefügt und für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 1440 x g (Raumtemperatur, 5 Minuten), nach der das Serum abpipettiert sowie Zymosan zweimalig mit NaCl 0,9% gewaschen wurde (1400 x g, Raumtemperatur, 5 Minuten). C3-Zymosan wurde zu  $1,2 \times 10^8$  Partikel/ml (10 mg/ml) bei -20°C aufbewahrt.

## **2.3 Reagenzien zur Hemmung der Sauerstoffradikalproduktion**

### **2.3.1 Buflomedilhydrochlorid**

Buflomedilhydrochlorid (BFM) wird zur Behandlung chronischer arterieller Durchblutungsstörungen eingesetzt. Es verringert die spontane Sauerstoffradikalproduktion polymorphkerniger Leukozyten (67). BFM (MG=343,8 g, Sigma) wurde zu  $10^{-1}$  Mol/l in Aqua ad injectabilia gelöst und bei 4 °C aufbewahrt.

### **2.3.2 Chloraminlösung**

Die Reaktion hypochloriger Säure mit endogenen primären sowie sekundären Aminen (z.B. Taurin, Lysin und Ammoniak) führt zur Bildung von Chloramin. Chloramin wird darüber hinaus durch stimulierte PMNL sezerniert (68) und hemmt die Produktion proinflammatorischer Mediatoren sowie die Aktivierung der Leukozyten (69, 70). Aufgrund des desinfizierenden Effektes wird Chloramin

therapeutisch zur abdominalen Lavage bei Infektionen der Peritonealhöhle eingesetzt. Chloraminlösung 0,5% (Apotheke des Universitätsklinikums Frankfurt/Main) wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt.

### **2.3.3 2-Chloro-Adenosin**

Adenosin hemmt die stimulierte Superoxidproduktion der zirkulierenden polymorphkernigen Leukozyten (71). Zudem wird die Liberation proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  inhibiert (72, 73). Anstatt Adenosin wurde das in seinen Eigenschaften vergleichbare 2-Chloro-Adenosin verwendet. 2-Chloro-Adenosin (MG= 301,7 g, Sigma) wurde in Dimethylsulfoxid aufgelöst und mit HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> auf 10<sup>-3</sup> Mol/l aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei - 20°C.

### **2.3.4 Pentoxiphyllin**

Das Methylxanthin Pentoxiphyllin (PTF) wurde 1978 für die Therapie peripherer arterieller Durchblutungsstörungen eingeführt. Pentoxiphyllin inhibiert neben der Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- $\alpha$  die Freisetzung von Sauerstoffradikalen sowie die Adhärenz und Degranulierung von Granulozyten (74). Erklärt wird die hemmende Wirkung von PTF durch eine Zunahme des intrazellulären cAMP. Pentoxiphyllin (MG= 278,3 g, Sigma) wurde mit Aqua ad injectabilia zu 10<sup>-1</sup> Mol/l solubilisiert und bei 4 °C aufbewahrt.

## **2.4 Materialien des Phagozytoseassays**

### **2.4.1 D3,3`Dioctadecyloxacarboyanine Perchlorat-Färbelösung**

Zur Präparation der Färbelösung wurde DIO (D3,3`Dioctadecyloxacarboyanine Perchlorat, Sigma) in Dimethylsulfoxid zu 10mg/ml solubilisiert und mit reinem Ethanol versetzt (3 mg/ml). Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

### **2.4.2 Fixierlösung**

Phosphat buffered saline PBS<sup>-Ca-Mg</sup> (GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe) wurde zur Herstellung der Fixierlösung zu 2% mit Formaldehyd (Riedel-de Haën, Seelze) versetzt und unter Lichtabschluß bei 4°C aufbewahrt.

### **2.4.3 Lysing Solution**

Für die Präparation der Lysing Solution wurden 8,29 g Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl, Applichem, Darmstadt), 1,0 g Kaliumhydrogencarbonat (KHCO<sub>3</sub>, Merck, Darmstadt) sowie 0,04 g Ethylendinitrilo-Tetraessigsäure (EDTA, Sigma) in 1000 ml Aqua ad injectabilia (Braun) gelöst und bei 4°C gelagert.

### **2.4.4 Propidiumjodid**

Propidiumjodid (Sigma) wurde zu 10 µg/ml in PBS<sup>-Ca-Mg</sup> (GIBCO BRL, Life Technologies, Karlsruhe) aufgelöst und bei 4°C aufbewahrt.

## **2.5 Patienten- und Kontrollgruppe**

Im Rahmen dieser Studie wurden 15 Patienten mit einer diffusen sekundären Peritonitis nach Magen- oder Darmperforation sowie postoperativer Anastomoseninsuffizienz untersucht.

Eine Übersicht über Alter, Geschlecht, Ätiologie der Peritonitis sowie über den präoperativen Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score (APACHE II) Score und den intraoperativ erhobenen Mannheimer Peritonitis Index (MPI) gibt Tabelle 2.1. Das durchschnittliche Alter der an Peritonitis erkrankten Patienten lag bei 60,2 ± 4,7 Jahre. Der präoperativ erhobene APACHE II Score betrug 11,5 ± 1,5 Punkte, der intraoperativ erhobene Mannheimer Peritonitis Index 24,3 ± 1,5 Punkte.

Die Untersuchung wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Dabei bezeichnet der Zeitpunkt 0 Stunden (0 h) die Untersuchung intraoperativ entnommenen Materials. In 24 stündigem Abstand wurde die Untersuchung bis zum Zeitpunkt 96 Stunden fortgeführt. Ein Patient wurde aus der Studie ausgeschlossen, da er sich einer notwendig erachteten Relaparotomie nicht unterzog. In 3 Fällen konnte der Meßvorgang aufgrund lediglich geringer Mengen Peritonealsekrets nur 48



Stunden bzw. 72 Stunden durchgeführt werden, die längste Untersuchung erfolgte über einen Zeitraum von 51 Tagen. Bei Patient HL wurde am 3. postoperativen Tag eine Relaparotomie vorgenommen; Patient ID wurde am 8. bzw. 10. postoperativen Tag relaparotomiert. Am 17. postoperativen Tag erfolgte bei diesem Patienten die Anlage eines offenen Abdomens, daß bis zum Ende des Untersuchungszeitraums täglich mit Natriumchlorid lavagiert wurde. Bei Patient MK wurde bei der primären chirurgischen Versorgung das Abdomen offen belassen und bis zum Untersuchungsende täglich mit NaCl gespült. In allen anderen Fällen wurde eine einmalige chirurgische Herdsanierung vorgenommen.

Zwei der Patienten mit Peritonitis verstarben mit einem multiplen Organversagen nach der Meßperiode. Vier Patienten entwickelten einen septischen Schock und wurden mit kreislaufunterstützenden Medikamenten (Katecholaminen) behandelt.

Diese 6 Patienten mit kompliziertem Verlauf einer Peritonitis wurden den Patienten mit einer sekundären Peritonitis ohne Komplikationen gegenübergestellt, um die Leukozytenfunktion von Patienten mit kompliziertem Verlauf einer Peritonitis mit denen der Patienten mit Peritonitis ohne Komplikationen vergleichen zu können.

Tab. 2.1: Patientencharakteristik

Patient	Alter [Jahre]	Geschlecht	Ätiologie der Peritonitis	MPI [Punkte]	APACHE II [Punkte]
ZL	18	m	Magenperforation	16	3
NR	42	w	Magenperforation	21	2
UK	72	w	Magenperforation	21	11
WK	74	m	Magenperforation	28	16
ES	79	w	Duodenalperforation	26	18
MS	32	m	Jejunumperforation	20	8
ND	71	m	Appendizitis	21	10
ID	48	w	Kolonperforation	27	16
AA	85	w	Kolonperforation	21	21
AK	60	m	Anastomoseninsuffizienz nach Gastrektomie	25	5
PR	55	w	Anastomoseninsuffizienz nach Hemikolektomie	14	11
ES	66	w	Anastomoseninsuffizienz nach Hemikolektomie	30	16
MK	71	w	Anastomoseninsuffizienz nach Sigmaresektion	36	10
HL	58	w	Anastomoseninsuffizienz nach Rektumresektion	22	7
GD	73	m	Anastomoseninsuffizienz nach Rektumresektion	32	19

Eine Kontrollgruppe bestand aus 10 Patienten, die sich einem abdominalchirurgischen Eingriff unterzogen. In diesen Fällen lag keine intraabdominale Infektion vor. Eine Übersicht gibt Tabelle 2.2.

*Tab. 2.2. Charakteristik der Kontrollgruppe*

<b>Patient</b>	<b>Alter [Jahre]</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Chirurgische Operation</b>
DR	41	w	Magenteilresektion
BE	39	m	Gastrektomie
US	73	w	Gastrektomie
ES	74	m	Gastrektomie
BG	49	m	Magen- und Kolonteilresektion
LS	35	w	Reanastomosierung nach Sigmaresektion
RS	61	m	Hemikolektomie
EJ	62	w	Hemikolektomie
KB	50	m	Sigmaresektion
BM	64	w	Rektumresektion

Die Untersuchung wurde an 5 aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Der Zeitpunkt 0 Stunden bezeichnet den Beginn der abdominalchirurgischen Operation nach Laparotomie ohne weitere Manipulation.

In die statistische Analyse der Kontrollen wurden acht Patienten nach abdominalchirurgischem Eingriff einbezogen, da bei zwei Patienten postoperativ eine Anastomoseninsuffizienz bzw. ein intraabdominaler Abszeß diagnostiziert wurden. Das durchschnittliche Alter der Kontrollen betrug  $54,5 \pm 5,3$  Jahre.

Ausschlusskriterien: Colitis ulcerosa, Morbus Crohn sowie eine bestehende HIV- oder Hepatitis-Infektion stellten Ausschlusskriterien für das Peritonitis- sowie das Kontrollkollektiv dar. Patienten mit bestehender Leberzirrhose bzw. Aszites wurden ebenfalls nicht eingeschlossen. Eine hochdosierte Kortikosteroidgabe (z.B. Prednison >1,5 mg/kg/d, Hydrocortison > 6 mg/kg/d), immunsuppressive Therapie mit Azathioprin, Cyclosporin A, Chemotherapie oder Strahlentherapie innerhalb der letzten 3 Wochen waren ebenfalls Ausschlusskriterien.

## **2.6 Erfassung des klinischen Gesundheitszustands**

Die an Peritonitis erkrankten Patienten wurden täglich mittels des APACHE II sowie am Tag der primären Operation mittels des MPI erfaßt (75, 76, 77). Bosscha et al empfehlen die Kombination der oben genannten Scoringsysteme als Standardklassifikation, um den Schweregrad einer Peritonitis und der intraabdominalen Infektion einschätzen zu können (78).

Täglich wurden das Körpergewicht, die Körpertemperatur, Herz- und Atemfrequenz sowie der systolische und diastolische Blutdruck der Patienten erfaßt. Laborchemisch ermittelte Daten des Blutbildes, der Blutgasanalysen, der Nierenfunktionsparameter und Elektrolytbestimmungen wurden dokumentiert, Leberwerte und Gerinnungsparameter erhoben, sowie C-reaktives Protein, Laktat, Procalcitonin und der kolloidosmotische Druck bestimmt. Zudem wurde der zentralvenöse Druck erfaßt und gegebenenfalls durch einen Pulmonalarterienkatheter ermittelte hämodynamische Funktionsgrößen erhoben. Ebenso wurde bei respiratorisch insuffizienten Patienten die Beatmungsform des Patienten dokumentiert. Das Volumen des über die Drainagen des Patienten ausgeschiedenen Peritonealsekrets wurde erhoben und die täglich verordnete Medikation sowie Befunde der Radiologie, Patho- bzw. Pathohistologie und bakteriologischer Untersuchungen, wie z.B. dem intraoperativ gefertigten Abdominalabstrich, dokumentiert.

## **2.7 Probenentnahme**

Intraoperativ erfolgte nach Laparotomie und Diagnose einer diffusen Peritonitis sofort die Entnahme des Peritonealsekrets vor jeglicher weiterer Manipulation. Die Menge des abgesaugten Sekrets wurde gemessen. Die Blutentnahme erfolgte parallel dazu über den zentralen Venenkatheter bzw. den arteriellen Katheter. An den folgenden Tagen des stationären Aufenthaltes wurde Peritonealsekret über Drainagen gewonnen. Im Falle einer Relaparotomie erfolgte die Probenentnahme intraoperativ nach Eröffnung der Bauchhöhle. Auch hierzu erfolgte parallel die Blutentnahme.

In der Kontrollgruppe erfolgte am Tag der Operation nach Eröffnung der Bauchhöhle lediglich die Entnahme der Blutprobe, da aufgrund geringer Sekretmengen und kleiner Zellzahlen keine Funktionsuntersuchung der Leukozyten im Peritonealsekret möglich war. An den anschließenden Tagen wurde entsprechend der Patienten mit Peritonitis Peritonealsekret über Drainagen gewonnen.

Für die Untersuchung der Sauerstoffradikalproduktion wurden 10 ml Peritonealsekret bzw. Blut zu 10 IE/ml mit Vetren (Heparin-Natrium 200 IE, Byk Gulden, Konstanz) versetzt und bei Raumtemperatur verarbeitet. Zur Bestimmung von Endotoxin, Interleukin 8, Interleukin 10, und TNF- $\alpha$  wurden 4 ml Peritonealsekret und Blut mit Hilfe des Vacutainersystems Endotube ET und zugehörigem Adapter (Chromogenix, Mölndal, Schweden) entnommen.

## **2.8 Verarbeitung des gewonnenen Materials**

### **2.8.1 Bestimmung der Endotoxin-, IL-8-, IL-10-, und TNF- $\alpha$ -Konzentrationen**

Die Endotubes ET wurden sofort nach Abnahme 15 Minuten mit 2200 x g bei 4°C zentrifugiert. Es erfolgte ein steriles Abpipettieren des Plasmas bzw. Sekrets in Nunc Tubes (Nunc, Roskilde, Dänemark) auf Eis und die Aufbewahrung bei -80°C.

### **2.8.2 Vorbereitung, Differenzierung und Isolierung der Vollblutproben**

Die Zahl der Leukozyten des Blutes wurde mit Hilfe des Coulter-Counter (Coulter, Krefeld) ermittelt. Anschließend wurde eine Isolierung polymorphkerniger Leukozyten mittels des Dichtegradienten Polymorphprep® (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norwegen) vorgenommen. Dazu wurden 3 ml Blut auf 3 ml Polymorphprep geschichtet und dies bei 400 x g für 35 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der durch die Zentrifugation entstandene Granulozytenlayer wurde abgesaugt und in 1 ml HBSS<sup>+Ca2+</sup> resuspendiert. Die gewonnene Zellsuspension wurde nachfolgend mit HBSS<sup>+Ca2+</sup> gewaschen (2500 x g, Raumtemperatur, 5 min). Mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Schreck, Hofheim) erfolgte die Bestimmung der Zellzahl/µl Suspension. Die Vitalitätsbestimmung der Leukozyten wurde durch Ausschluß von Trypanblau 0,4% (Sigma) festgestellt.

Zu jedem der angegebenen Meßzeitpunkte wurde aus der gewonnenen Vollblutprobe ein Ausstrich erstellt (Objektträger mit Mattrand, Knittel-Gläser, Braunschweig), der durch eine Färbung nach May-Grünwald differenziert wurde: Der getrocknete bzw. fixierte Ausstrich wurde 4 Minuten in Eosin-Methylenblaulösung nach May-Grünwald (Riedel-de Haën, Seelze) gefärbt, dann mit aqua dest. abgespült und weitere 15 Minuten in Giemsa-Lösung (Riedel-de Haën) koloriert. Im Anschluß folgte eine Spülung mit aqua dest. und die Trocknung des Präparats. Es wurden 100 Leukozyten gezählt und differenziert.

Die überbleibende Vollblutprobe wurde zur Gewinnung von humanem Plasma 10 Minuten mit 1500 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert.

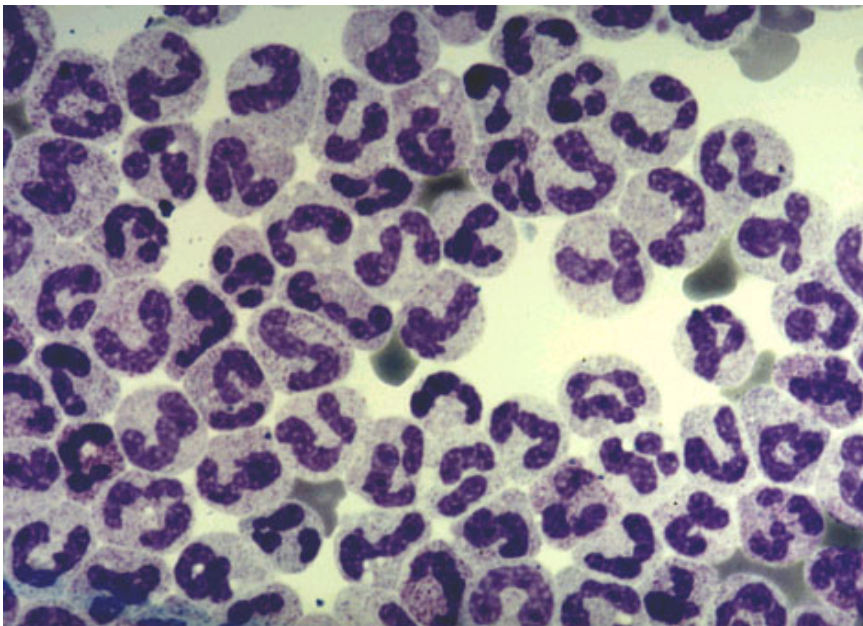
### **2.8.3 Vorbereitung der Peritonealsekretproben**

Die Bestimmung der Zellzahl/µl Peritonealsekret erfolgte nach Abnahme mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Die Vitalität emigrierter Granulozyten wurde durch Ausschluß von Trypanblau 0,4% festgestellt.

Das Peritonealsekret wurde 5 Minuten mit 2500 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert, wonach der Überstand abpipettiert und aufbewahrt wurde. Das Zellpellet wurde mit 1 ml HBSS<sup>+Ca2+</sup> und analog der Behandlung der Blutprobe isovoläm mit Polymorphprep® versetzt, um die gleiche Behandlung der Proben zu gewährleisten. Es folgte eine Zentrifugation mit 400 x g bei Raumtemperatur für 35 min, woran sich ein fünfminütiger Waschvorgang mit HBSS<sup>+Ca2+</sup> bei 2500 x g,

Raumtemperatur anschloß. Das Zellpellet wurde mit 1 ml HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> aufgefüllt. Erneut erfolgte eine Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer, wobei die Vitalität der Zellen nach Präparation durch Ausschluß von Trypanblau 0,4%, festgestellt wurde.

Zu jedem Meßzeitpunkt wurde ein Zytozentrifugenpräparat der Zellsuspension des Peritonealsekretes erstellt. Dazu wurden pro in der Zytozentrifuge befindlichem Objektträger jeweils zwei Einfüllbehälter mit 200 µl der entsprechend verdünnten Zellsuspension bestückt, sodaß die Zellzahl des entstandenen Präparates zwischen 250.000 und 1.000.000 Zellen betrug. Das getrocknete bzw. fixierte Zytozentrifugenpräparat wurde entsprechend dem Blutausstrich nach May-Grünwald gefärbt. Eine Auszählung von jeweils 200 Leukozyten ergab eine Differenzierung in polymorphkernige, stabkernige, eosinophile und basophile Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen sowie Mesothelzellen.



*Abb 2.1:  
Zytozentrifugenpräparat  
aus dem Peritoneal-  
sekret eines Patienten  
mit Peritonitis*

## 2.9 Messung der Sauerstoffradikalproduktion

Die Messung der Sauerstoffradikalproduktion erfolgte am Biolumaten LB9505, (Berthold, Wildbad) nach Kato et al (79).

Die aus dem Peritonealsekret präparierten sowie aus dem Vollblut isolierten polymorphkernigen Leukozyten wurden zur Messung der Sauerstoffradikalproduktion am Biolumaten auf 50 000 Zellen in einem Volumen von 10 µl HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> eingestellt. Die spontane Sauerstoffradikalproduktion wurde mit Hilfe der luzigenin- bzw. luminolverstärkten Chemilumineszenz ermittelt.

Bei der luzigeninverstärkten Chemilumineszenz wurde Luzigenin zu 10<sup>-4</sup> Mol/l eingesetzt und zur Zellsuspension 5 µg/ml Cytochalasin B zugefügt. Bei der luminolverstärkten Chemilumineszenz wurde neben der Zellsuspension Luminol mit der Endkonzentration von 10<sup>-4</sup> Mol/l ohne Cytochalasin B eingesetzt. Die Meßküvetten (Lumac-Küvetten, Berthold, Wildbad) wurden dann bis zum Endvolumen von 250 µl mit HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> aufgefüllt.

Nach einer 15minütigen Vorinkubation der Zellsuspension bei 37°C wurde die spontane Sauerstoffradikalproduktion über weitere 15 Minuten erfaßt. Die stimulierte Sauerstoffradikalproduktion der emigrierten und zirkulierenden PMNL wurde nach Vorinkubation der Zellen (37°C, 15 min) durch den Zusatz von verschiedenen rezeptorabhängigen und rezeptorunabhängigen Stimuli mittels der luzigenin- und luminolverstärkten Chemilumineszenz 15 min bei 37°C bestimmt. Als Stimuli fanden bei der luzigeninverstärkten Chemilumineszenz Calcium-Ionophore A23187 zu 10<sup>-5</sup> Mol/l, FMLP sowie PMA in der Konzentration von 10<sup>-6</sup> Mol/l Anwendung. Komplement 5a wurde zu 2 µg/ml sowie TNF-α zu 400 Unit/ml zugefügt. Desweiteren fand eine Aktivierung polymorphkerniger Leukozyten durch LPS zu 1 µg/ml unter Zugabe von Plasma (20 %) statt.

Bei der luminolverstärkten Chemilumineszenz wurden 4x10<sup>6</sup> Partikel Zymosan bzw. C3b-opsoniertes Zymosan/ml eingesetzt.

Die Auswertung erfolgte durch die Version 4.08 der zugehörigen Software LB 9505C. Durch Integralwerte (Mean under the curve) wurde der Zeitverlauf der kontinuierlich aufgezeichneten Chemilumineszenzintensität analysiert. Die Ergebnisse wurden durch einen COMPAQ Desk Pro 386s evaluiert und in counts per minutes (cpm) pro Zelle berechnet und angegeben.



### **2.9.1 Verhältnis von eingesetzter Zellzahl zu Chemilumineszenz**

Die lineare Beziehung zwischen der Zahl eingesetzter polymorphkerniger Leukozyten und erfaßter Chemilumineszenz wurde untersucht. Hierfür wurden  $10^3$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $5 \times 10^3$  bzw.  $10^4$ ,  $2 \times 10^4$  und  $5 \times 10^4$  PMNL eingesetzt und die luzigeninverstärkte Chemilumineszenz nach Stimulation durch FMLP ( $10^{-6}$  Mol/l) analysiert.

### **2.9.2 Vergleichende Untersuchung isolierter und nichtisolierter PMNL**

Die Sauerstoffradikalproduktion polymorphkerniger Leukozyten einer mit HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> gewaschenen Vollblutprobe wurde mit der aus dem Vollblut isolierter Granulozyten verglichen. Heparinisiertes Vollblut wurde zweimal je 5 Minuten mit HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> bei 2500 x g und Raumtemperatur gewaschen und mit HBSS<sup>+Ca<sup>2+</sup></sup> isovoläm aufgefüllt. Die Anzahl der Leukozyten wurde mit Hilfe des Coulter-Counter (Coulter, Krefeld) ermittelt. Ein gefertigter Blutausschlag wurde mikroskopisch differenziert und somit die Zahl eingesetzter polymorphkerniger Leukozyten errechnet. Die Zahl isolierter Granulozyten ergab sich aus der Zählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Nach Stimulation mit FMLP zu  $10^{-6}$  Mol/l wurde die Sauerstoffradikalproduktion bestimmt.

### **2.9.3 Etablierung der Untersuchungskonditionen**

Der Einfluß der Lagerungszeit des gewonnenen Materials wurde evaluiert. Hierzu wurde eine Vollblutprobe zweimalig gewaschen und die FMLP-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion ( $10^{-6}$  Mol/l) zum Zeitpunkt 0 h, 1h, 2h, und 3h nach dem Waschvorgang untersucht.

### **2.9.4 Dosis-Wirkungsbeziehung der eingesetzten Stimuli**

Bezüglich der Dosis-Wirkungsbeziehung verschiedener Stimuli an emigrierten PMNL gibt es in der Literatur noch wenig Ergebnisse. Deshalb wurden Voruntersuchungen zur Dosis-Wirkungsbeziehung durchgeführt. Hierfür wurden bei der luzigeninverstärkten Chemilumineszenz das Calcium-Ionophore A23187, FMLP und PMA in den Konzentrationen  $10^{-9}$  Mol/l –  $10^{-5}$  Mol/l eingesetzt, Komplement 5a zu 40 – 4000 ng/ml bzw. TNF- $\alpha$  zu 4 – 4000 Unit/ml. Lipopolysaccharid wurde unter Zugabe von Plasma (20%) zu 0,001 – 10  $\mu$ g/ml zugefügt. Bei der luminolverstärkten Chemilumineszenz wurden zwischen  $2 \times 10^5$  und  $5 \times 10^6$  Zymosan- bzw. C3-Zymosanpartikel eingesetzt.

### **2.9.5 Hemmung der Sauerstoffradikalproduktion**

Der Einfluß verschiedener antiinflammatorischer Komponenten auf die Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL wurde charakterisiert. Die luzigeninverstärkte Chemilumineszenz wurde nach Stimulation mit FMLP ( $10^{-6}$  Mol/l) unter Zugabe von Chloramin in den Konzentrationen 0,005%, 0,0125%, 0,025% und 0,05% sowie 2-Chloro-Adenosin  $10^{-8}$  Mol/l –  $10^{-4}$  Mol/l bestimmt. Äquivalent wurden Buflomedilhydrochlorid sowie Pentoxiphyllin zu  $10^{-2}$  Mol/l -  $10^{-6}$  Mol/l eingesetzt.

Entsprechend wurde der Einfluß auf die luminolverstärkte Chemilumineszenz nach 15minütiger Stimulation durch C3-Zymosan untersucht.

### **2.10 Phagozytoseassay**

Das Phagozytoseassay dient der quantitativen Bestimmung der Phagozytoseaktivität von polymorphkernigen Leukozyten im Peritonealsekret. Mit der Durchflußzytometrie kann der prozentuale Anteil der phagozytierenden Zellen sowie deren Phagozytoseaktivität pro PMNL bestimmt werden.

Das Phagozytoseassay wurde durch Herrn Dr. D. Henrich entwickelt und standardisiert. Für das Phagozytoseassay wurden 50 mg lyophilisierte Escherichia coli (Strain K12, Sigma) bei 37°C für 24 Stunden in 50 ml Dulbecco`s modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO BRL) inkubiert. Die Bakterien wurden danach 6 Minuten mit 4000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend mit gepooltem Humanserum (4 mg/ml Serum) für weitere 40 Minuten bei 37°C opsoniert. Es folgte ein Waschvorgang mit PBS<sup>-Ca-Mg</sup> (GIBCO BRL) für 6 Minuten mit 4000 x g und Raumtemperatur. Dann wurde der Membranfarbstoff DIO zu 90 µg/ml E.coli gegeben. Nach einer 15minütigen Inkubation bei 37°C wurde das Pellet erneut mit PBS<sup>-Ca-Mg</sup> für 6 Minuten bei 4000 x g und Raumtemperatur gewaschen.

Die Lagerung der E.coli erfolgte in aus 90% Humanserum bzw. 10% DMSO bestehendem Medium bei -80°C.

Vor Durchführung des Phagozytoseassays wurde die E. coli-Suspension aufgetaut und nochmals in PBS<sup>-Ca-Mg</sup> für 6 Minuten mit 5000 x g, Raumtemperatur, gewaschen.

Zu einem Probenvolumen von 100 µl heparinisiertem Peritonealsekret ( $5 \times 10^5$  PMNL) wurden jeweils 20 µl Bakteriensuspension (ca. 40 E.coli/PMNL) hinzugefügt. Es erfolgte eine 12minütige Inkubation bei 37°C (Positivkontrolle). Die Negativkontrolle verblieb für die Zeit der Inkubation auf Eis. Zum Quenchen der adhärennten nicht phagozytierten E. coli wurde jeder Ansatz unter Zugabe von 100 µl gekühlter Trypanblaulösung 0,4 % gemischt. Es folgte ein dreimaliges Waschen mit PBS<sup>-Ca-Mg</sup> bei 300 x g, 8 Minuten, 4°C. Die Lysierung der in der Probe enthaltenen Erythrozyten wurde mit 2 ml Lysing Solution pro Ansatz 15 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde der Waschvorgang zweimal wiederholt (300 x g, 8 Minuten, 4°C). Die Fixierung der Granulozyten erfolgte durch Zugabe von 2 ml Fixierlösung pro Ansatz und anschließender 10minütiger Inkubation. Das nach einer weiteren Zentrifugation (300 x g, 8 Minuten, 4°C) entstandene Pellet wurde in 200 µl PBS<sup>-Ca-Mg</sup> resuspendiert sowie die DNA der Leukozyten mit 25 µl Propidiumjodid pro Ansatz gefärbt.

Um den Einfluß antiinflammatorischer Substanzen auf die Phagozytosekapazität polymorphkerniger Leukozyten erfassen zu können, wurde Buflomedilhydrochlorid sowie Pentoxiphyllin in absteigenden Konzentrationen ( $10^{-3}$  -  $10^{-5}$  Mol/l) eingesetzt. 2-Chloro-Adenosin fand  $10^{-4}$  molar bis  $10^{-6}$  molar sowie Chloramin in den Konzentrationen 2,5%, 1% bzw. 0,5 % Einsatz. Für jeden der zu untersuchenden Ansätze wurde im Einfachansatz ein Positiv- sowie ein Negativsample vorbereitet, denen eine Positiv- und Negativkontrolle ohne den Zusatz einer antiinflammatorischen Substanz gegenübergestellt wurde.

Die polymorphkernigen Leukozyten wurden im Durchflußzytometer (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg) bei blaugrüner Lichtanregung (488 nm Argonlaser) analysiert. Die Messung wurde mit Polypropylen-Rundbodenröhrchen (Becton Dickinson) durchgeführt. Pro Probe wurden 10000 Leukozyten erfaßt. Die Messung bzw. Auswertung der erhobenen Daten erfolgte durch das Programm Cellquest<sup>TM</sup>.

### 2.10.1 Messung

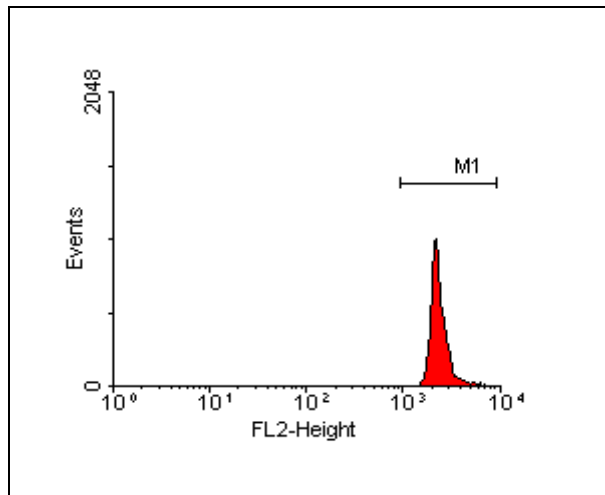


Abb. 2.2: Live-Gate über DNA-Peak

Während der Datenaufnahme wird im FL-2 Histogramm ein Live-Gate über die den DNA-Gehalt eines Leukozyts enthaltenen Ereignisse gesetzt. Dies verhindert das Einstreuen von Bakteriencluster in die Granulozytenwolke.

### 2.10.2 Auswertung

Um die Phagozytoseleistung der polymorphkernigen Granulozyten bestimmen zu können, wird der prozentuale Anteil der phagozytierenden Zellen sowie deren mittlere Fluoreszenzintensität entsprechend der Phagozytoseaktivität ermittelt.

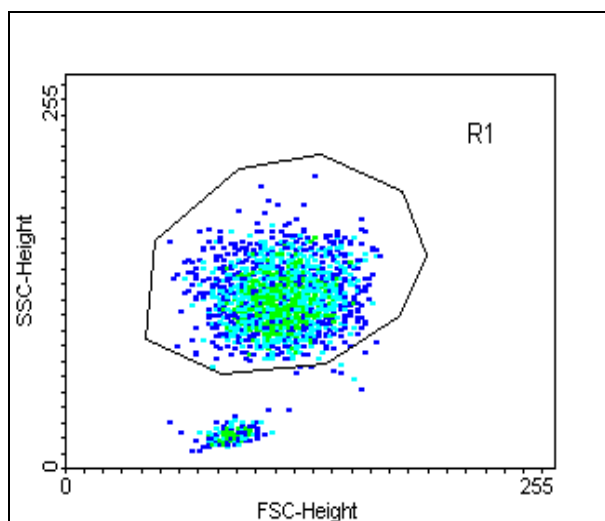


Abb. 2.3: Granulozyten-Gate

Im Streulichtdiagramm (FSC-SSC) wird ein Gate über die Granulozytenpopulation gesetzt.

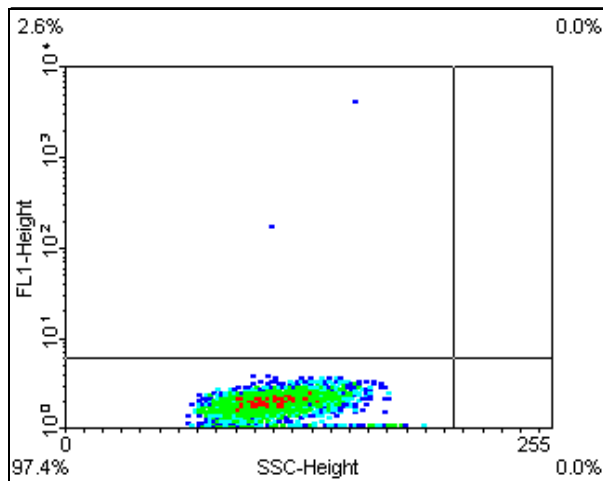


Abb. 2.4: Granulozytengate R1 in SSC-FL1-Darstellung: 0°C-Kontrollansatz

Nicht phagozytierende Zellen weisen eine Grünfluoreszenz (FL-1) unter  $10^1$  auf.

Im SSC-FL-1-Dot-plot wird ein Quadrant so gesetzt, daß sich weniger als 1% der Ereignisse im linken oberen Quadranten befinden.

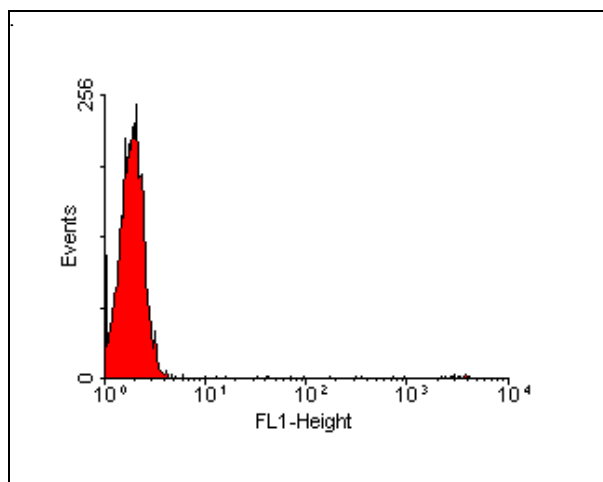


Abb. 2.5: Granulozytengate R1 im FL-1-Histogramm: 0°C-Kontrollansatz

Die durchschnittliche Fluoreszenz nicht phagozytierender Zellen wird als FL-1  $< 10^1$  dargestellt.

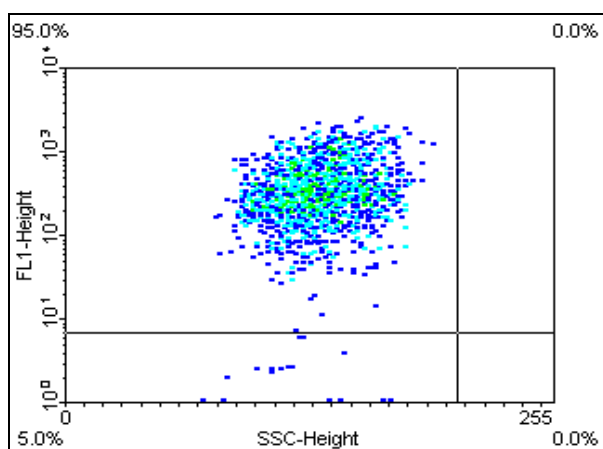
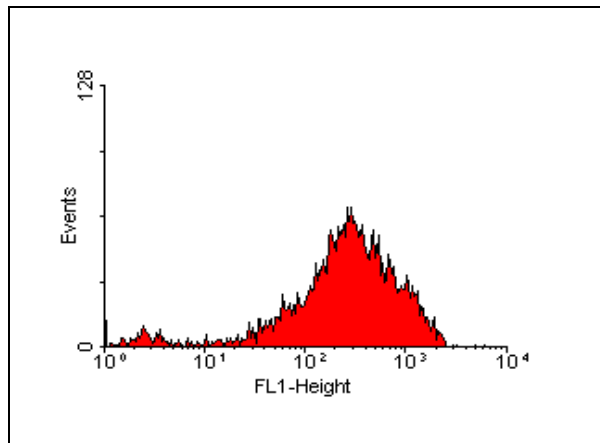


Abb. 2.6: Granulozytengate R1 in SSC-FL1-Darstellung: 37°C-Testansatz

Phagozytierende Granulozyten weisen durch die Aufnahme DIO-gefärbter Bakterien eine höhere Fluoreszenz auf. Durch den linken oberen Quadranten kann statistisch der Prozentsatz phagozytierender Zellen bestimmt werden.



Die durchschnittliche Fluoreszenz der phagozytierenden Granulozyten stellt ein Maß für die Anzahl aufgenommener Bakterien dar.

*Abb. 2.7: Granulozytengate R1 im FL-1-Histogramm: 37°C-Testansatz*

## **2.11 Bestimmung pro- und antiinflammatorischer Mediatoren**

### **2.11.1 Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS)**

Die quantitative, photometrische Bestimmung von Endotoxin im Plasma und Peritonealsekret erfolgte durch einen kinetischen Limulus Amöbozyten Lysat Test (Coatest Endotoxin, Chromogenix, Mölndal, Schweden). Das durch Endotoxin aktivierte Enzymsystem setzt ein farbbildendes Substrat um. Durch die kinetische Messung wird die Zeit bis zum Erreichen einer angegebenen Absorption erhoben. Die Standardkurve wurde mit gepooltem humanem Plasma gesunder Probanden erstellt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Herstellerprotokoll.

### **2.11.2 Interleukin-8**

Zur Bestimmung von Interleukin-8 wurde ein Enzymimmunoassay des Sandwichtyps eingesetzt (IL-8 Enzyme Immunoassay Kit, Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich). Standards und Proben werden auf eine mit einem Anti-IL-8-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatte plaziert. Ein sekundärer Anti-IL-8-Antikörper bindet an den entstandenen Antigen-Antikörper-Komplex und bildet mittels eines Peroxidasekonjugats ein farbbildendes Substrat um. Die Farbintensität ist der in Standard bzw. Probe befindlichen Konzentration an IL-8 proportional. Zur Bestimmung von IL-8 im Peritonealsekret wurde eine Verdünnung der Proben von 1:100 vorgenommen.

### **2.11.3 Interleukin-10**

Interleukin-10 im Plasma und Peritonealsekret wurde ebenfalls mit einem Sandwich-ELISA bestimmt (IL-10 Enzyme Immunoassay Kit, Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich).

### **2.11.4 Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$**

Zur quantitativen Bestimmung von TNF- $\alpha$  im Plasma und Peritonealsekret wurde ein Enzymimmunoassay des Sandwichtyps eingesetzt (TNF-a Enzyme Immunoassay Kit, Coulter Immunotech, Marseille, Frankreich).

## **2.12 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit Hilfe des Softwareprogramms SPSS 5.0 (Jandel Scientific, Chicago, IL). Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Der Vergleich zweier verbundener Stichproben erfolgte mit dem Wilcoxon-Test. Der Mann-Whitney-U-Test diente dem Vergleich unabhängiger Stichproben. Bei der Interpretation der Ergebnisse wurde von einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ausgegangen.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Pro- und antiinflammatorische Mediatoren im Peritonealsekret und Plasma

Bei Patienten mit Peritonitis sowie bei Kontrollen wurden pro- und antiinflammatorische Entzündungsmediatoren untersucht. Die höchsten Konzentrationen an Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ , Endotoxin sowie Interleukin 8 und Interleukin 10 waren intraoperativ im Peritonealsekret bei Peritonitis meßbar (z.B. TNF- $\alpha$  1010  $\pm$  414 pg/ml) und fielen postoperativ kontinuierlich ab (z.B. TNF- $\alpha$  189  $\pm$  44 pg/ml, 96 h, Abb. 3.1).

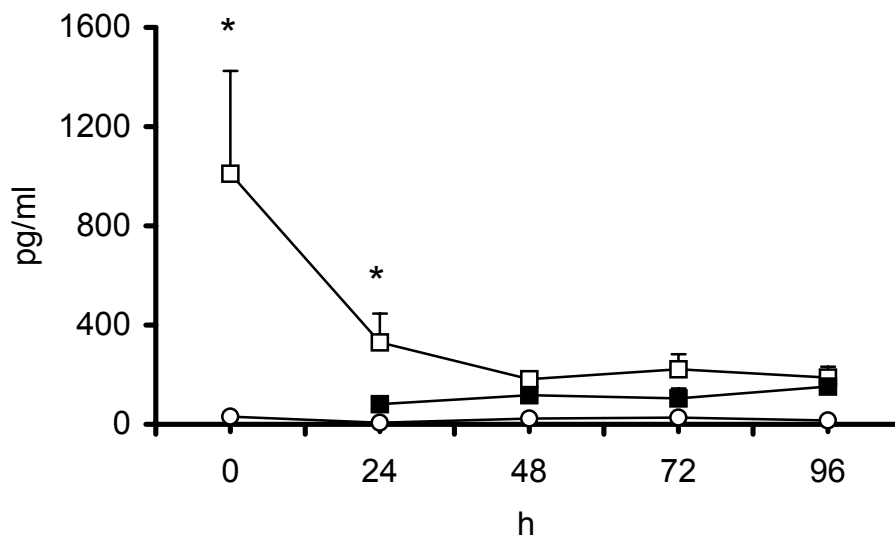


Abb. 3.1: Konzentration von TNF- $\alpha$  im Peritonealsekret ( $\square$ ) und Plasma ( $\bullet$ ) bei Patienten mit Peritonitis (n=14). TNF- $\alpha$  im Peritonealsekret bei Kontrollpatienten ( $\bullet$ , n=8). \*p<.05 TNF- $\alpha$  im Peritonealsekret vs Plasma bei Patienten mit Peritonitis

Bei Patienten mit Peritonitis wurden zu jedem Zeitpunkt im Peritonealexsudat signifikant höhere Konzentrationen an TNF- $\alpha$ , Endotoxin sowie IL-8 und IL-10 als im Plasma erfaßt. In der Peritonealhöhle der Patienten mit Peritonitis wurden zudem höhere Konzentrationen an pro- und antiinflammatorischen Entzündungsmediatoren als in der Abdominalhöhle der Kontrollen nach abdominalchirurgischer Operation gemessen. Eine Übersicht gibt Tabelle 3.1 sowie Tabelle 3.2.



Tab. 3.1: Konzentrationen von Endotoxin, IL-8 und IL-10 in Peritonealsekret und Plasma bei Patienten mit Peritonitis

h	Peritonealsekret			Plasma		
	Endotoxin [EU/ml]	IL-8 [ng/ml]	IL-10 [pg/ml]	Endotoxin [EU/ml]	IL-8 [pg/ml]	IL-10 [pg/ml]
0	471 ± 233	163 ± 52	3429 ± 906	0,12 ± 0,07	1032 ± 448	476 ± 124
24	111 ± 81**	144 ± 63	2494 ± 498 <sup>#</sup>	0,08 ± 0,04	481 ± 145	169 ± 41
48	20 ± 6**	98 ± 31	1419 ± 240	0,05 ± 0,02	270 ± 143	87 ± 24
72	4 ± 1*	92 ± 25	1199 ± 373	0,11 ± 0,05	102 ± 42	78 ± 20
96	7 ± 5*	130 ± 33	906 ± 258	0,04 ± 0,02	251 ± 142	78 ± 19

\* $p < .05$  Endotoxin im Peritonealsekret bei Patienten mit Peritonitis vs Endotoxin im Peritonealsekret bei Kontrollen. \*\* $p < .01$  Endotoxin im Peritonealsekret bei Patienten mit Peritonitis vs Endotoxin im Peritonealsekret bei Kontrollen. <sup>#</sup> $p < .05$  IL-10 im Peritonealsekret bei Patienten mit Peritonitis vs IL-10 im Peritonealsekret bei Kontrollen

Tab. 3.2: Konzentrationen von LPS, IL-8 und IL-10 im Peritonealsekret bei Kontrollen

h	Peritonealsekret		
	LPS [EU/ml]	IL-8 [ng/ml]	IL-10 [pg/ml]
0	-	-	-
24	0,7 ± 0,15	12 ± 4	978 ± 65
48	0,99 ± 0,24	30 ± 11	842 ± 189
72	0,6 ± 0,09	53 ± 22	1042 ± 471
96	0,46 ± 0,05	141 ± 62	753 ± 225

### 3.2 Reinheit und Vitalität der PMNL

Im intraoperativ gewonnenen Peritonealsekret fanden sich bei Patienten mit Peritonitis durchschnittlich  $20050 \pm 7162$  Leukozyten pro Mikroliter, von denen  $80 \pm 6\%$  PMNL,  $17 \pm 5\%$  Lymphozyten und  $2 \pm 1\%$  Makrophagen waren. Der Anteil an PMNL stieg postoperativ auf  $90 \pm 2\%$  (24h) und fiel dann auf  $71 \pm 5\%$  bei insgesamt  $1395 \pm 607$  Leukozyten pro Mikroliter ab (96h). Die Vitalität nach Verarbeitung der PMNL betrug mindestens 82% (0h) und maximal 96% (96h).

Bei Kontrollen stieg die Zahl der Leukozyten von  $4744 \pm 2563/\mu\text{l}$  (24h) auf  $9013 \pm 3301/\mu\text{l}$  nach 48 Stunden an und fiel dann auf  $2077 \pm 866/\mu\text{l}$  (96h) ab. Neben PMNL ( $89 \pm 3\%$ , 24h) fanden sich vor allem Lymphozyten ( $10 \pm 3\%$ , 24h). Der Anteil der Lymphozyten stieg bis auf  $37 \pm 6\%$  (96h) an. Die Vitalität nach Verarbeitung der PMNL betrug in der Kontrollgruppe mindestens 86% (96h) und maximal 98% (0h).

Die angegebenen Unterschiede zwischen Peritonealsekret von Peritonitispatienten und Kontrollen waren jedoch nicht signifikant. Die Isolierung der PMNL aus Vollblut von Patienten mit Peritonitis und Kontrollen durch Polymorphprep® führte zu einer Zellpopulation mit mehr als 98% PMNL und weniger als 1% toter Zellen.

### 3.3 Sauerstoffradikalproduktion polymorphkerniger Leukozyten

Grundlage der statistischen Auswertung der Sauerstoffradikalproduktion durch PMNL war ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Zellzahl und luzigenin- bzw. luminolverstärkter Chemilumineszenz (cpm, Abb. 3.2).

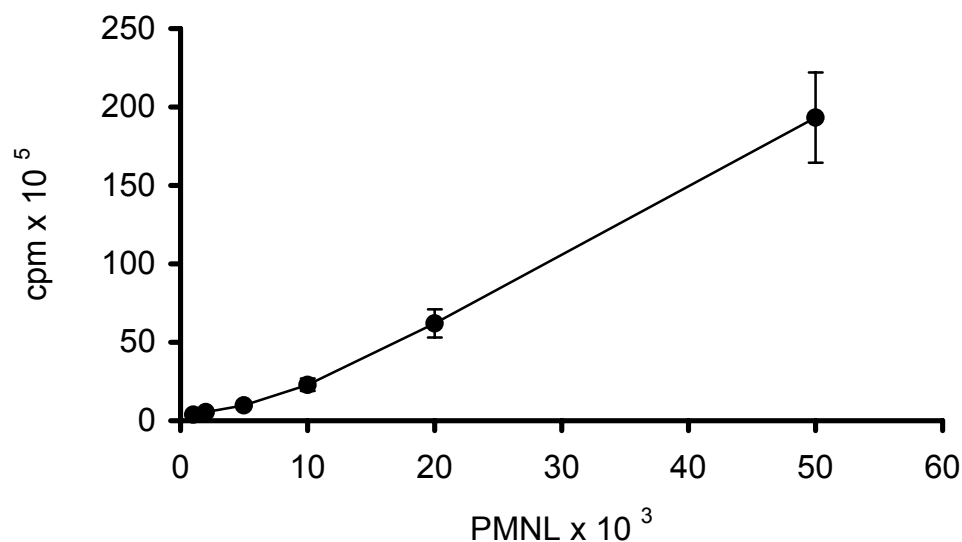


Abb. 3.2: Die FMLP-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL ergibt eine hohe Korrelation ( $r=0,995$ ) zwischen eingesetzter Zellzahl und Chemilumineszenz (cpm: counts per minute,  $n=7$ )

#### 3.3.1 Einfluß der Isolation von PMNL auf die Sauerstoffradikalproduktion

Neutrophile Granulozyten aus heparinisiertem, gewaschenem Vollblut ohne Isolation wiesen eine wesentlich geringere Chemilumineszenz als isolierte PMNL auf. Grund hierfür ist die abgeschwächte Lichtausbeute durch umgebende Erythrozyten (Tabelle 3.3). Aus diesem Grund wurde die Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL mit der durch Polymorphprep® isolierter zirkulierender PMNL verglichen. Emigrierte PMNL wurden ebenfalls mit Polymorphprep® behandelt.

Tab. 3.3: PMA-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion isolierter PMNL (iPMNL) und nichtisolierter PMNL (niPMNL)

PMA	spontan	10 <sup>-9</sup> Mol/l	10 <sup>-8</sup> Mol/l	10 <sup>-7</sup> Mol/l	10 <sup>-6</sup> Mol/l	10 <sup>-5</sup> Mol/l
iPMNL	12 ± 2	11 ± 7	303 ± 163	536 ± 225	836 ± 208	1122 ± 178
niPMNL	5 ± 1	4 ± 1	5 ± 1	43 ± 23	167 ± 20	223 ± 14

### 3.3.2 Einfluß der Lagerungszeit auf die Sauerstoffradikalbildung

Im Rahmen der Etablierung idealer Studienbedingungen wurde die Chemilumineszenz der Leukozyten im Zeitverlauf untersucht. Die Sauerstoffradikalproduktion der PMNL nahm bei Lagerung bei Raumtemperatur innerhalb von drei Stunden signifikant zu (Abb. 3.3). Konsequenterweise erfolgte die Charakterisierung der Sauerstoffradikalproduktion sofort nach Abnahme der Proben.

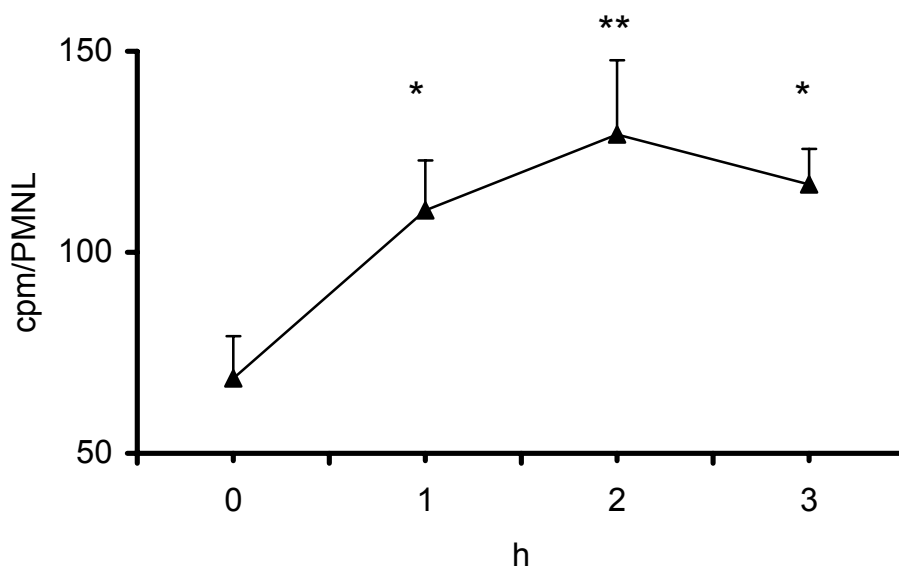


Abb. 3.3: Die FMLP-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion nichtisolierter Granulozyten weist im Zeitverlauf eine deutliche Zunahme auf. \*\* $p < .01$  1h, 2h und 3h vs 0h

### 3.3.3 Dosis-Wirkungs-Beziehung

Die spontane extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter und zirkulierender PMNL ließ sich dosisabhängig am stärksten durch PMA gefolgt von FMLP, Calcium-Ionophore A23187 und C5a sowie TNF- $\alpha$  stimulieren (Abb. 3.4, Abb. 3.5).

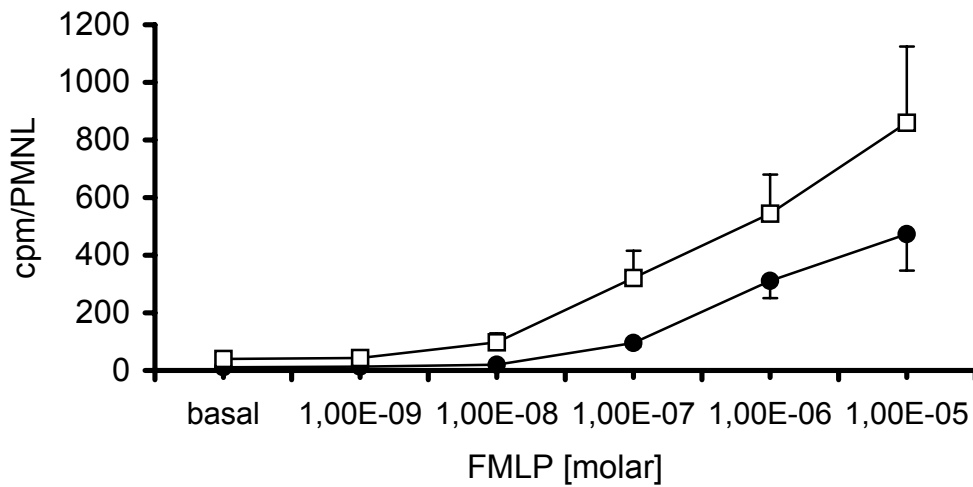


Abb. 3.4: FMLP-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter (□) und zirkulierender (●) PMNL (n=7)

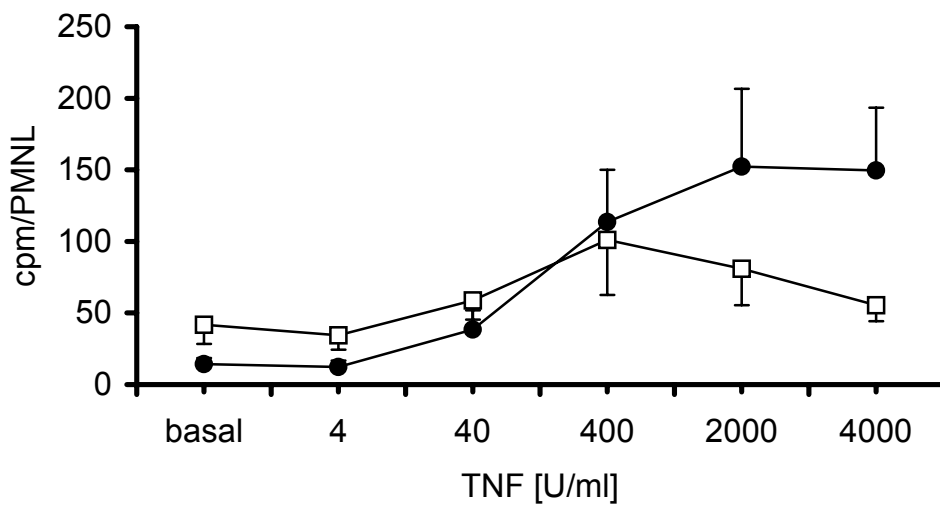


Abb. 3.5: TNF- $\alpha$ -stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter (□) und zirkulierender (●) PMNL (n=7)

Eine Aktivierung der Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender polymorphkerniger Leukozyten war durch Lipopolysaccharid nur unter Zugabe von Plasma möglich; adäquat hierzu wurde bei emigrierten PMNL zellfreies Peritonealsekret zugefügt.

Aufgrund der ermittelten Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden FMLP und PMA zu  $10^{-6}$  Mol/l, A23187 zu  $10^{-5}$  Mol/l sowie 2 µg/ml Komplement 5a eingesetzt. Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  wurde zu 400 Unit/ml zur Aktivierung der Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL zugefügt. Desweiteren fand eine Stimulation der Sauerstoffradikalproduktion durch Lipopolysaccharid (1 µg/ml) unter Zugabe von Plasma (20 %) statt.

Die luminolverstärkte intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion war durch C3-opsonierte Zymosanpartikel zu verstärken. Hier wurden  $4 \times 10^6$  Partikel Zymosan bzw. C3-Zymosan/ml eingesetzt.

### 3.3.4 Spontane Sauerstoffradikalproduktion emigrierter und zirkulierender PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis und Kontrollen

Mit der luzigenin- und luminolverstärkten Chemilumineszenz wurde die Sauerstoffradikalproduktion emigrierter und zirkulierender PMNL gemessen. Bei Patienten mit sekundärer Peritonitis war die höchste spontane extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion der ePMNL intraoperativ zu verzeichnen. Sie war signifikant höher als die der zPMNL. Während die spontane Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL anstieg, fiel die der ePMNL postoperativ ab. Keine signifikanten Unterschiede zwischen ePMNL und zPMNL ergaben sich ab 48 h postoperativ (Abb. 3.6).

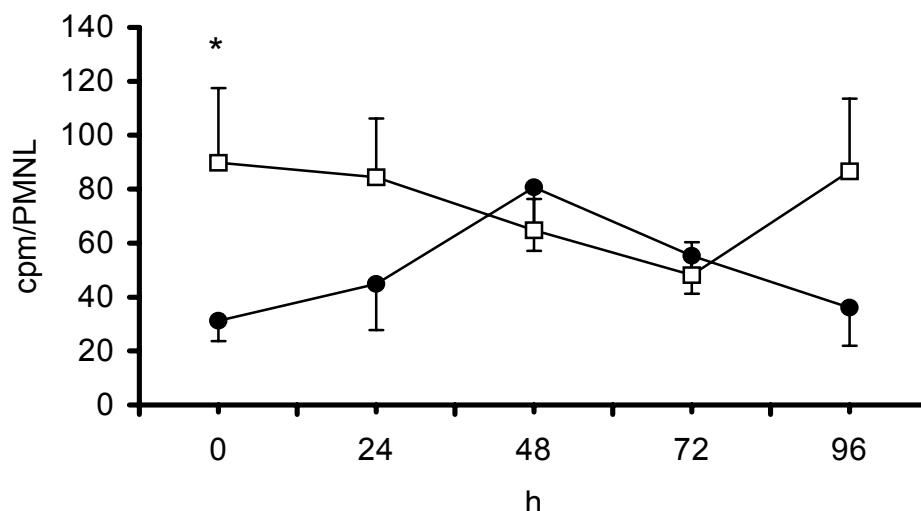


Abb. 3.6: Spontane extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter (□) und zirkulierender (●) PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis (n=14). Luzigeninverstärkte Chemilumineszenz. \* $p < .05$  ePMNL vs zPMNL

Dagegen war die spontane extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion der ePMNL bei Kontrollen 24 h postoperativ gering und hatte ihr Maximum erst nach 72 h. Die spontane Sauerstoffradikalproduktion von zPMNL erreichte nie die Höhe der durch ePMNL produzierten Sauerstoffradikale (Abb. 3.7).

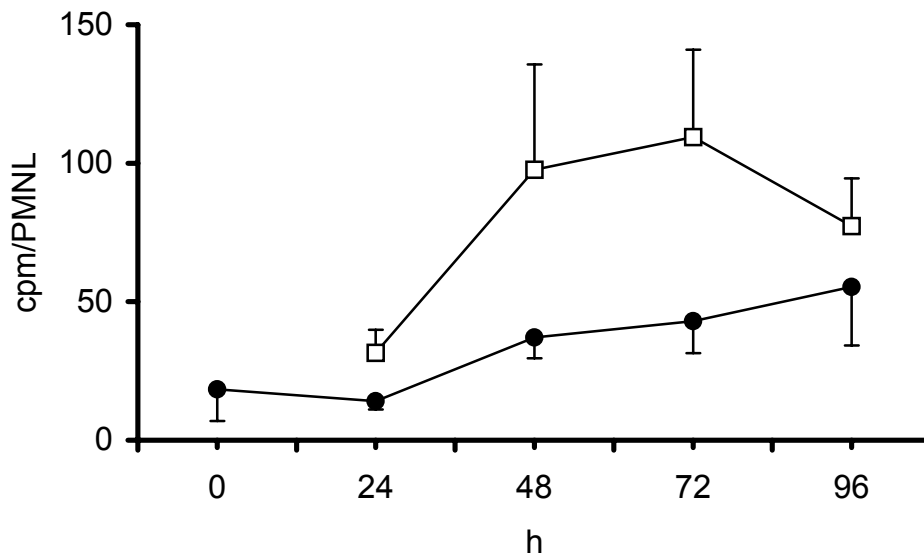


Abb. 3.7: Spontane extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter (□) und zirkulierender (●) PMNL bei Kontrollen (n=8). Luzigeninverstärkte Chemilumineszenz

Die luminolverstärkte spontane intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL bei Peritonitispatienten unterschied sich nicht (Abb. 3.8).

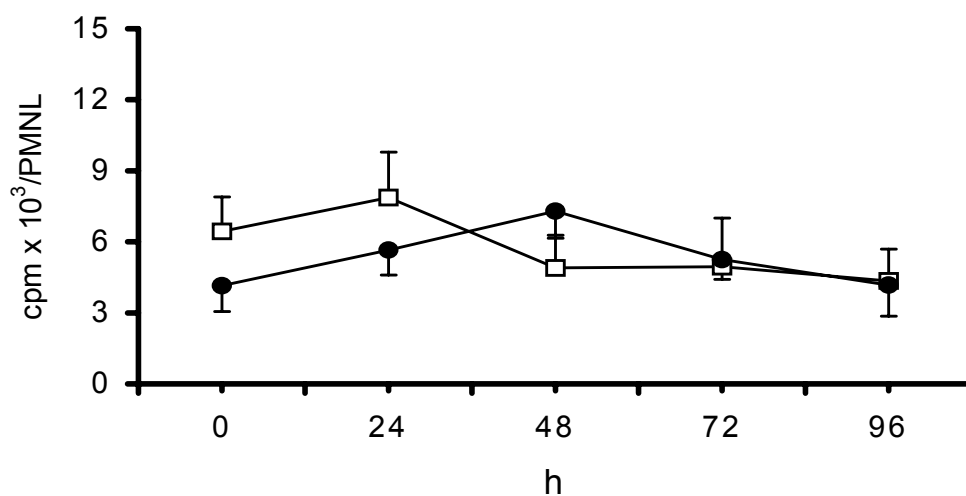


Abb. 3.8: Spontane intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL (□) und zPMNL (●) bei Peritonitispatienten (n=14). Luminolverstärkte Chemilumineszenz

Zirkulierende polymorphkernige Leukozyten der Kontrollen zeigten intraoperativ und bis 72 h postoperativ eine signifikant höhere intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion als zPMNL der Patienten mit Peritonitis.

Während die extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter polymorphkerniger Leukozyten von Kontrollen die der zPMNL übertraf, so lag die intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL zu jedem Zeitpunkt unter der der zPMNL. (Abb. 3.9).

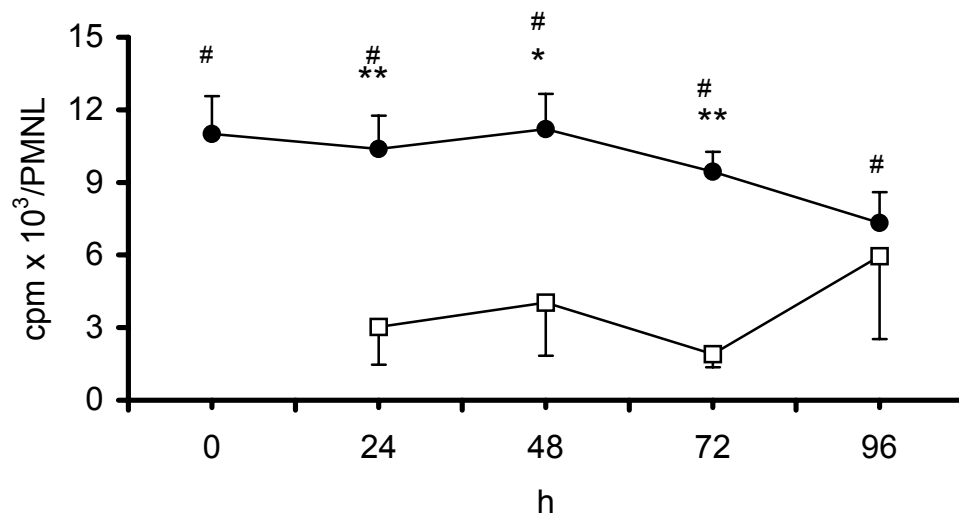


Abb. 3.9: Spontane intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter (□) und zirkulierender (●) PMNL bei Kontrollen (n=8). Luminolverstärkte Chemilumineszenz. \*p<.05 zPMNL vs ePMNL. \*\*p<.01 zPMNL vs ePMNL. #p<.05 zPMNL bei Kontrollen vs zPMNL bei Patienten mit Peritonitis

### 3.3.5 Stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter und zirkulierender PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis und Kontrollen

Die Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender und emigrierter Granulozyten war bei Patienten mit Peritonitis und Kontrollen durch rezeptorabhängige und rezeptor-unabhängige Stimuli zu verstärken.

### 3.3.5.1 Stimulierte (luzigeninvertierte) extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL bei Patienten mit Peritonitis

Die Aktivierung durch C5a führte zu einer Verdopplung der Sauerstoffradikalbildung von ePMNL und zPMNL ( $p < .05$  ePMNL vs zPMNL 24 h postoperativ). Intra- und 48 h postoperativ waren ePMNL stärker durch C5a zu aktivieren als zPMNL. Ab 48 h postoperativ war kein signifikanter Unterschied zwischen ePMNL und zPMNL festzustellen (Abb. 3.10).

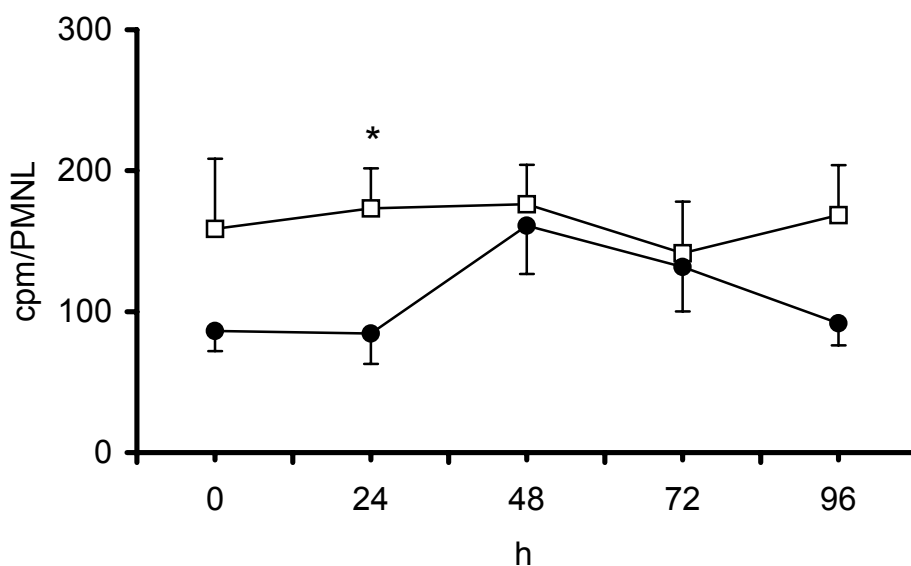


Abb. 3.10: C5a-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter (□) und zirkulierender (●) PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis (n=14). \* $p < .05$  ePMNL vs zPMNL

Zu einer wesentlich stärkeren Aktivierung der spontanen extrazellulären Sauerstoffradikalproduktion der ePMNL und zPMNL führte PMA. PMA stimulierte die extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter polymorphkerniger Leukozyten von Peritonitispatienten intra- und postoperativ stärker als die der zPMNL. Dies war 24 h postoperativ signifikant. Die Aktivierung der Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL durch das Ionophore A 23187 ergab bei Patienten mit Peritonitis keine signifikanten Unterschiede (Tab. 3.4).



Tab. 3.4: PMA- und A23187-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL bei Patienten mit Peritonitis

h	ePMNL		zPMNL	
	PMA	A 23187	PMA	A 23187
0	1558 ± 327	288 ± 110	893 ± 126	284 ± 89
24	1466 ± 173*	288 ± 57	809 ± 115	302 ± 82
48	1928 ± 374	344 ± 102	1532 ± 207	632 ± 198
72	1484 ± 415	306 ± 110	1441 ± 360	447 ± 119
96	1879 ± 456	333 ± 86	1170 ± 176	523 ± 206

\* $p < .05$  ePMNL vs zPMNL bei Patienten mit Peritonitis

### 3.3.5.2 Stimulierte (luzigeninverstärkte) extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter und zirkulierender PMNL bei Kontrollen

Die durch C5a stimulierte extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL von Kontrollen lag zu jedem Zeitpunkt der Meßperiode höher als die stimulierte Sauerstoffradikalproduktion der zPMNL ( $p < .05$  ePMNL vs zPMNL 24 h sowie 72 h postoperativ, Abb. 3.11)

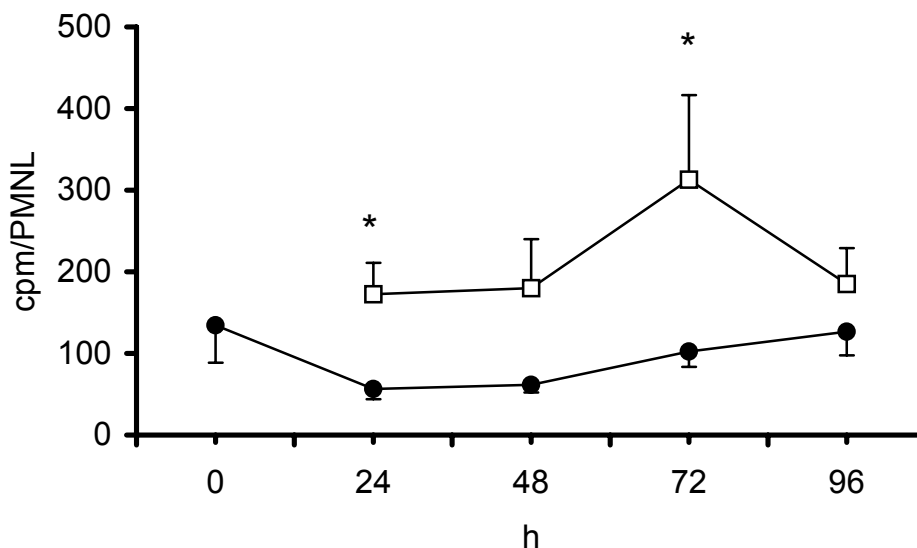


Abb. 3.11: C5a- stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter (□) und zirkulierender (●) PMNL bei Kontrollen (n=8). \* $p < .05$  ePMNL vs zPMNL

Die PMA- und A 23187-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL von Kontrollen unterschied sich nicht von der der zPMNL (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: PMA- und A23187-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL bei Kontrollen

h	ePMNL		zPMNL	
	PMA	A 23187	PMA	A 23187
0	-	-	1035 ± 223	283 ± 165
24	1338 ± 238	153 ± 47	1017 ± 174	101 ± 39
48	806 ± 208	186 ± 71	1356 ± 212	215 ± 40
72	1897 ± 582	220 ± 65	1192 ± 217	189 ± 45
96	1299 ± 213	160 ± 38	1224 ± 88	90 ± 76

### 3.3.5.3 Durch LPS und Plasma stimulierte extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL (Kontrollen, Peritonitis)

Eine Stimulation der luzigeninverstärkten extrazellulären Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender und emigrierter PMNL durch Lipopolysaccharid war nur unter Zugabe von Plasma bzw. Peritonealsekret möglich. Bei Patienten mit Peritonitis sowie bei Kontrollen ließ sich die Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL weitaus höher durch LPS und Plasma stimulieren als die Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL. Verglichen mit der Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL von Patienten mit Peritonitis lag die Sauerstoffradikalproduktion der zPMNL von Kontrollen teilweise signifikant höher. Auch emigrierte PMNL von Kontrollen waren durch LPS und Plasma stärker zu aktivieren als ePMNL von Patienten mit Peritonitis (ns) (Abb. 3.12).

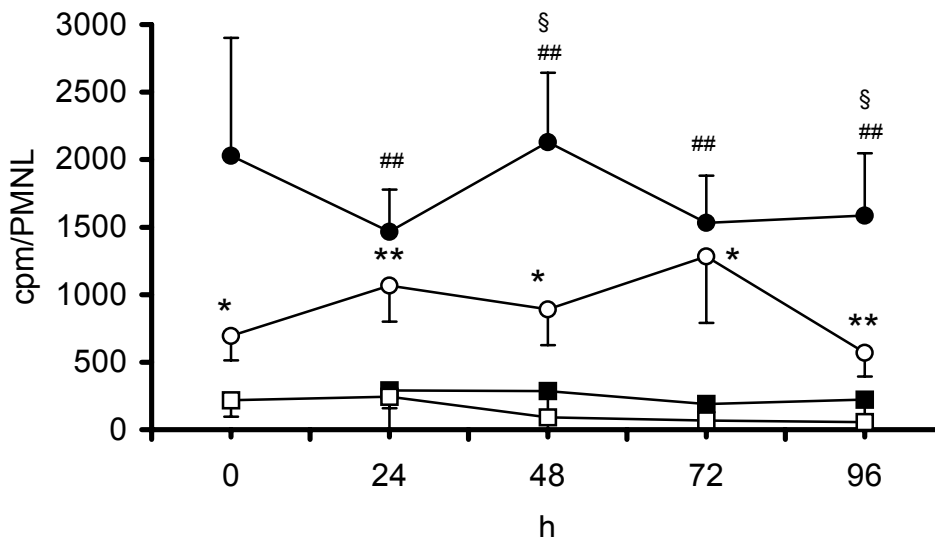


Abb. 3.12: LPS-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter und zirkulierender PMNL bei Peritonitispatienten (□ePMNL, ●zPMNL) und Kontrollen (○ePMNL; ●zPMNL). \* $p < .05$  ePMNL vs zPMNL bei Peritonitispatienten. \*\* $p < .01$  ePMNL vs zPMNL bei Peritonitispatienten. ## $p < .01$  ePMNL vs zPMNL bei Kontrollen. § $p < .05$  zPMNL bei Kontrollen vs zPMNL bei Patienten mit Peritonitis

### 3.3.5.4 Stimulierte (luminolverstärkte) Phagozytose-assoziierte intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL

Die intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion ließ sich durch opsonierte Zymosanpartikel verstärken. Die Phagozytose-assoziierte C3-Zymosan-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL unterschied sich bei Peritonitispatienten nicht signifikant von der C3-Zymosan-stimulierten Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL (Abb. 3.13).

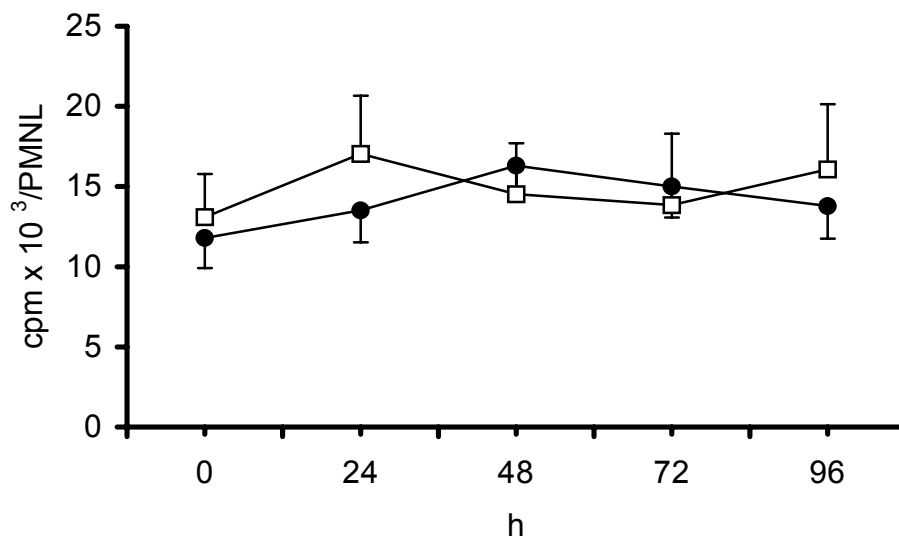


Abb. 3.13: C3-Zymosan-stimulierte intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter (□) und zirkulierender (●) PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis (n=14)

Bei Kontrollen war eine weitaus höhere Stimulation der Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL durch C3-Zymosan als der von ePMNL möglich ( $p < .05$  ePMNL vs zPMNL, 48 h, Abb. 3.14). Vergleicht man die intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion der ePMNL von Peritonitispatienten und Kontrollen, so ergab sich kein Unterschied.

Durch nichtopsoniertes Zymosan war die Sauerstoffradikalproduktion der Leukozyten nicht signifikant zu erhöhen (Tab. 3.6).

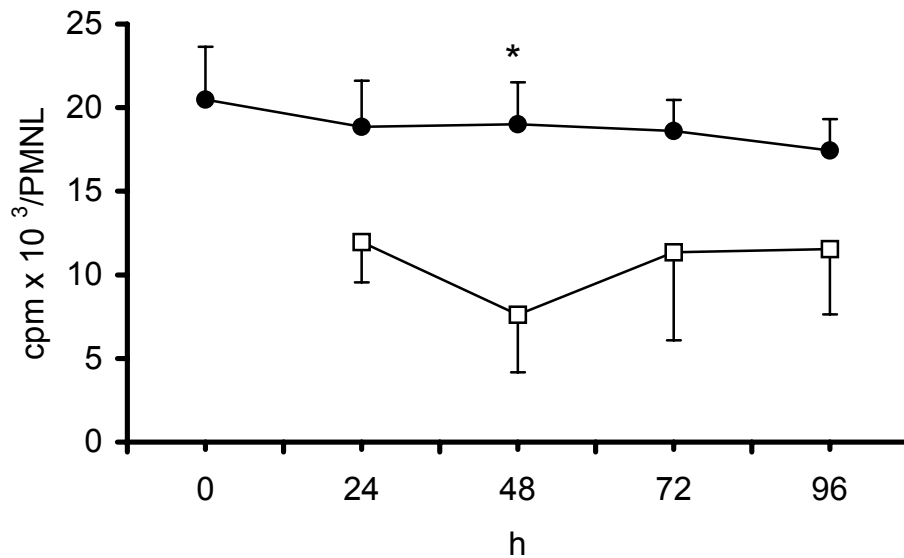


Abb. 3.14: C3-Zymosan-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter (□) und zirkulierender (●) PMNL bei Kontrollen. \*p<.05 ePMNL vs zPMNL

Tab. 3.6: Spontane und Zymosan-stimulierte intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL bei Patienten mit Peritonitis

h	ePMNL		zPMNL	
	spontan	Zymosan	spontan	Zymosan
0	6440 ± 1458	5905 ± 1306	4056 ± 1014	4726 ± 884
24	7872 ± 1914	8344 ± 2123	5296 ± 1039	6335 ± 1118
48	4900 ± 1373	7085 ± 2228	7087 ± 1081	7942 ± 1093
72	4954 ± 2049	4930 ± 2249	4979 ± 823	5791 ± 728
96	4350 ± 1336	5442 ± 2761	4176 ± 1323	5082 ± 1096

### 3.3.6 Untersuchungen der Sauerstoffradikalproduktion von Patienten mit unkompliziertem und kompliziertem Verlauf einer Peritonitis

Um einen Zusammenhang zwischen der Leukozytenfunktion und dem klinischen Verlauf einer Peritonitis näher zu charakterisieren, wurden Peritonitispatienten mit kompliziertem Verlauf (septischer Schock, Organversagen) Patienten mit Peritonitis ohne Komplikationen gegenübergestellt.

### 3.3.6.1 Reinheit und Vitalität der emigrierten PMNL

Bei Patienten mit Peritonitis ohne Komplikationen fanden sich im intraoperativ gewonnenen Peritonealsekret  $25800 \pm 16988$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$ , von denen  $84 \pm 9\%$  PMNL waren. Der Anteil der PMNL fiel postoperativ auf  $65 \pm 10\%$  bei  $810 \pm 56$  Leukozyten (96h) ab. Die Vitalität nach Verarbeitung der PMNL betrug mindestens 82% (0h) und maximal 96% (72h).

Hiervon unterschied sich das Peritonealsekret von Peritonitispatienten mit Komplikationen nicht signifikant. Die Zahl der Leukozyten im intraoperativ gewonnenen Peritonealsekret von Peritonitispatienten mit Komplikationen betrug  $22185 \pm 6789$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$ , von denen lediglich  $65 \pm 12\%$  PMNL waren. Der Anteil der PMNL stieg 24 h postoperativ auf  $90 \pm 1\%$  und fiel dann auf  $74 \pm 7\%$  bei  $780 \pm 196$  Leukozyten nach 96 h ab. Die Vitalität nach Verarbeitung der PMNL betrug bei intraoperativer Entnahme 75% und maximal 96% (96 h).

### 3.3.6.2 Stimulierte Sauerstoffradikalproduktion bei Patienten mit unkompliziertem Verlauf einer Peritonitis

Bei Patienten mit unkompliziertem Verlauf einer Peritonitis war die stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL vor allem intraoperativ und bis zu 48 h postoperativ höher als die stimulierte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL (Abb. 3.15, Abb. 3.16).

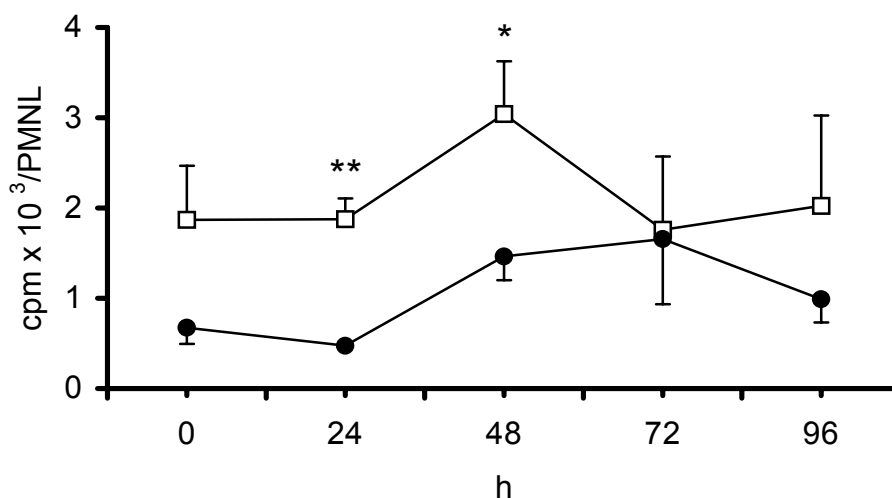


Abb. 3.15: PMA-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter (□) und zirkulierender (●) PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis ohne Komplikationen. \* $p < .05$  ePMNL vs zPMNL. \*\* $p < .01$  ePMNL vs zPMNL

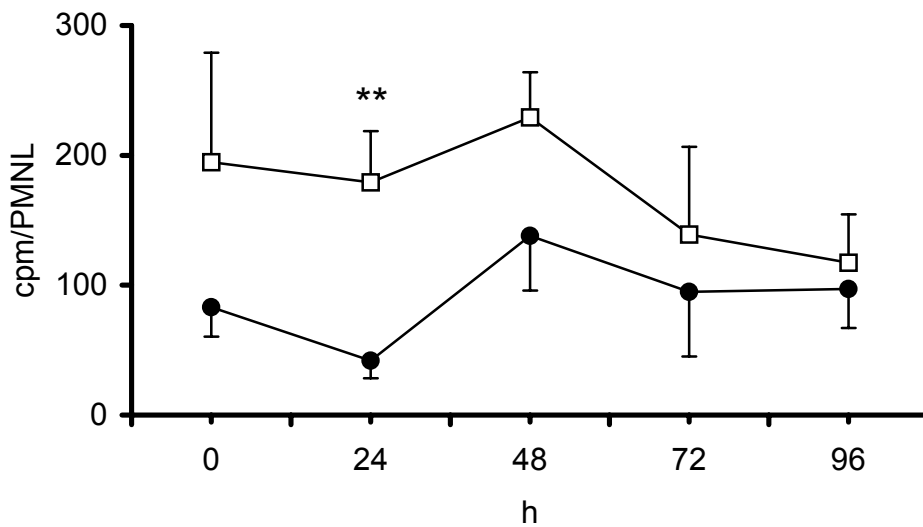


Abb. 3.16: C5a-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter (□) und zirkulierender (●) PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis ohne Komplikationen. \*\* $p < .01$  ePMNL vs zPMNL

Auch nach Aktivierung durch FMLP oder  $TNF-\alpha$  überstieg die Sauerstoffradikalproduktion der zPMNL zu keinem Zeitpunkt die der ePMNL (Tab. 3.7).

Tab. 3.7: FMLP- und  $TNF-\alpha$ -stimulierte Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL bei Patienten mit Peritonitis ohne Komplikationen

h	ePMNL		zPMNL	
	FMLP	$TNF-\alpha$	FMLP	$TNF-\alpha$
0	496 ± 198	224 ± 140	350 ± 155	123 ± 58
24	497 ± 85	157 ± 41	206 ± 50	57 ± 18
48	644 ± 96	304 ± 131	367 ± 40	145 ± 54
72	444 ± 158	298 ± 269	366 ± 93	75 ± 34
96	791 ± 489	176 ± 116	257 ± 95	55 ± 23

### 3.3.6.3 Stimulierte Sauerstoffradikalproduktion bei Patienten mit kompliziertem Verlauf einer Peritonitis

Im Gegensatz zu Patienten mit Peritonitis ohne Komplikationen war bei Patienten mit einer sekundären Peritonitis mit Komplikationen kein signifikanter Unterschied zwischen der stimulierten Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL und zirkulierender PMNL festzustellen (Abb. 3.17, Abb. 3.18).

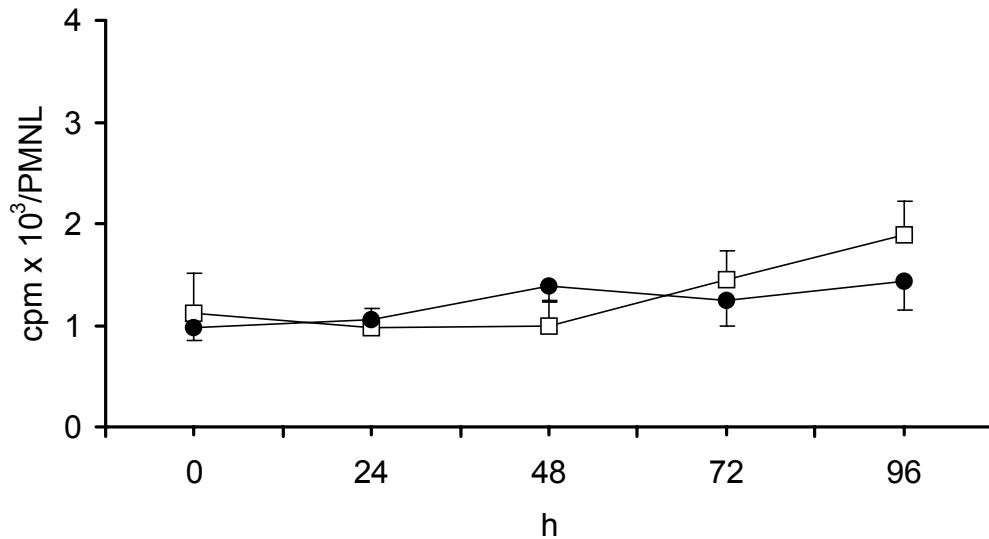


Abb. 3.17: PMA-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter (□) und zirkulierender (●) PMNL bei Patienten mit kompliziertem Verlauf einer sekundärer Peritonitis (n=6)

Die Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL ließ sich nur gering durch rezeptorabhängige und rezeptorunabhängige Mechanismen verstärken (siehe auch Tab. 3.8).

Tab. 3.8: FMLP- und TNF- $\alpha$ -stimulierte Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL und zPMNL bei Patienten mit kompliziertem Verlauf einer Peritonitis

h	ePMNL		zPMNL	
	FMLP	TNF- $\alpha$	FMLP	TNF- $\alpha$
0	321 $\pm$ 112	35 $\pm$ 7	316 $\pm$ 52	56 $\pm$ 7
24	611 $\pm$ 122	177 $\pm$ 73	533 $\pm$ 122	259 $\pm$ 110
48	532 $\pm$ 127	82 $\pm$ 19	520 $\pm$ 122	175 $\pm$ 65
72	738 $\pm$ 219	98 $\pm$ 50	530 $\pm$ 160	151 $\pm$ 62
96	484 $\pm$ 174	122 $\pm$ 58	583 $\pm$ 270	45 $\pm$ 17

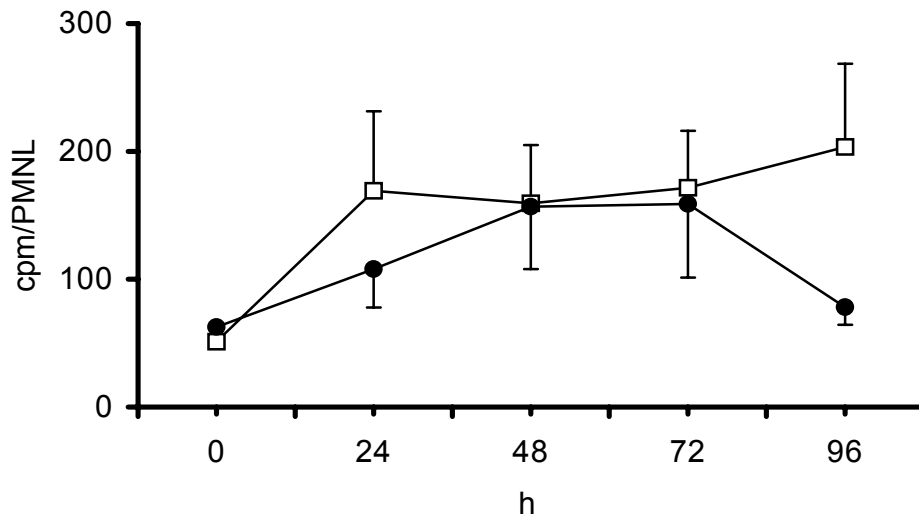


Abb. 3.18: C5a- stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter (□) und zirkulierender (●) PMNL bei Patienten mit kompliziertem Verlauf einer sekundären Peritonitis (n=6)

Dagegen war die Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender polymorphkerniger Leukozyten bei Patienten mit komplikationsreichem Verlauf einer Peritonitis signifikant höher zu aktivieren als die der zPMNL von Patienten mit unkompliziertem Verlauf einer Peritonitis. Die A23187-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL bei Peritonitispatienten mit Komplikationen war 24 und 72 Stunden postoperativ signifikant höher als die stimulierte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL bei Peritonitispatienten ohne Komplikationen. Die Sauerstoffradikalproduktion der zPMNL von Peritonitispatienten ohne Komplikationen unterschied sich nicht signifikant von der Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL der Kontrollen (Abb. 3.19).



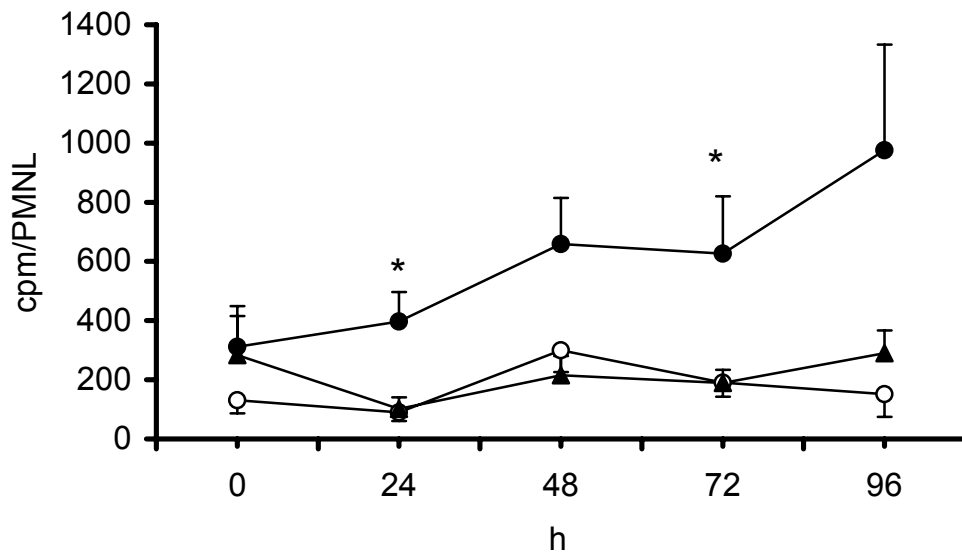


Abb. 3.19: A23187- stimulierte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis mit Komplikationen (●) und ohne Komplikationen (◐). ▲ zPMNL der Kontrollgruppe. \* $p < .05$  zPMNL der Patienten mit Komplikationen vs zPMNL der Patienten ohne Komplikationen

#### 3.3.6.4 Phagozytose-assoziierte (luminolverstärkte) intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL

Die Phagozytose-assoziierte intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL von Patienten mit Peritonitis ohne Komplikationen war 24 und 48 h postoperativ signifikant höher als die Phagozytose-assoziierte intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL von Peritonitispatienten mit Komplikationen. Ab 72 h postoperativ ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Sauerstoffradikalproduktion der ePMNL von Peritonitispatienten mit Komplikationen unterschied sich nicht von der Sauerstoffradikalproduktion der ePMNL der Kontrollen (Abb. 3.20).

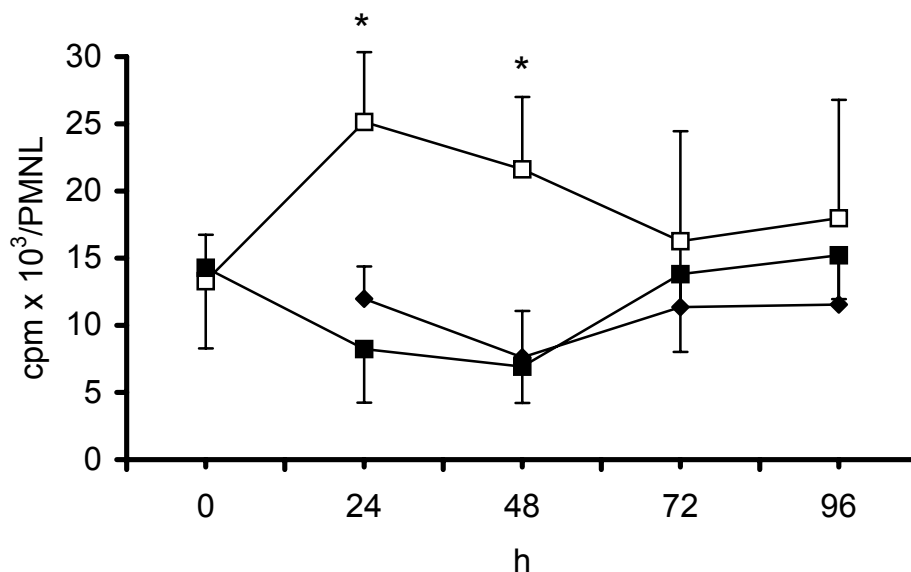


Abb. 3.20: C3-Zymosan-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis mit Komplikationen (●) und ohne Komplikationen (□). ● ePMNL der Kontrollgruppe. \* $p < .05$  ePMNL ohne Komplikationen vs ePMNL mit Komplikationen

### 3.3.7 Ätiologie der Peritonitis

Um bei Patienten mit Peritonitis einen möglichen Einfluß der Lokalisation der Perforation auf die Konzentration von Mediatoren und die Sauerstoffradikalproduktion zu evaluieren, wurden Patienten mit Peritonitis nach Perforation des Magens oder Dünndarms Patienten mit Peritonitis nach Perforation des Dickdarms gegenübergestellt.

#### 3.3.7.1 Reinheit und Vitalität der PMNL

Bei Patienten mit Peritonitis nach Perforation des Magens oder Dünndarms fanden sich im intraoperativ gewonnenen Peritonealsekret  $17267 \pm 5890$  Leukozyten/ $\mu\text{l}$ . Der Anteil an PMNL betrug  $87 \pm 6\%$ , stieg 24 h postoperativ auf  $93 \pm 2\%$  und fiel auf  $50 \pm 8\%$  bei insgesamt  $788 \pm 104$  Leukozyten nach 96 h. Die Vitalität nach Verarbeitung der PMNL betrug mindestens 95% (0h) und maximal 97% (72h).

Die Zahl der Leukozyten/ $\mu\text{l}$  intraoperativ gewonnenem Peritonealsekret bei Patienten mit Peritonitis nach Perforation des Dickdarms betrug  $13540 \pm 6393$ . Dies waren zu

61 ± 13% PMNL. 24 h postoperativ stieg der Anteil an PMNL auf 87 ± 5% und fiel dann auf 80 ± 4% (p<.05 versus Peritonitis nach Perforation des Magens oder Dünndarms) bei 820 ± 185 Leukozyten/μl nach 96 h. Die übrigen Unterschiede waren nicht signifikant. Die Vitalität nach Verarbeitung der PMNL betrug lediglich 65% intraoperativ und maximal 95% (72h).

Im intraoperativ entnommenen Peritonealsekret der Peritonitispatienten nach Dickdarmperforation fanden sich höhere Konzentrationen an Endotoxin (LPS) als bei Patienten mit Peritonitis nach Magen- oder Dünndarmperforation. Die Konzentration an TNF-α war bei Patienten mit Peritonitis nach Dickdarmperforation zu jedem Zeitpunkt höher als bei Magen- und Dünndarmperforation, jedoch nicht signifikant (Tab. 3.9).

*Tab. 3.9: Konzentrationen von LPS und TNF-α im Peritonealsekret bei Peritonitis nach Perforation des Magens/Dünndarms oder Dickdarms*

h	Magen/Dünndarm		Dickdarm	
	LPS [EU/ml]	TNF-α [pg/ml]	LPS [EU/ml]	TNF-α [pg/ml]
0	249 ± 197	955 ± 632	653 ± 546	1345 ± 815
24	180 ± 179	101 ± 36	43 ± 22	594 ± 257
48	1,2 ± 0,4	120 ± 41	35 ± 9	224 ± 34
72	2,0 ± 1,1	179 ± 64	4 ± 2	284 ± 135
96	0,8 ± 0,2	154 ± 33	15 ± 12	242 ± 90

### **3.3.7.2 Stimulierte Sauerstoffradikalproduktion der ePMNL bei Patienten mit Peritonitis unterschiedlicher Ätiologie**

Die TNF-α-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL bei Patienten mit Peritonitis nach Perforation des Dickdarms war intraoperativ zunächst höher als die Sauerstoffradikalproduktion der ePMNL bei Patienten mit Peritonitis nach Perforation des Magens und Dünndarms (ns). Ab 24 h postoperativ nahm die Aktivierbarkeit emigrierter PMNL durch TNF-α bei Patienten mit Peritonitis nach Perforation des Dickdarms kontinuierlich ab. Die Sauerstoffradikalproduktion der ePMNL bei Patienten mit Peritonitis nach Perforation des Magens oder Dünndarms war dagegen zunehmend durch TNF-α stimulierbar und übertraf die der ePMNL bei Patienten mit Peritonitis nach Perforation des Dickdarms (Abb. 3.21).

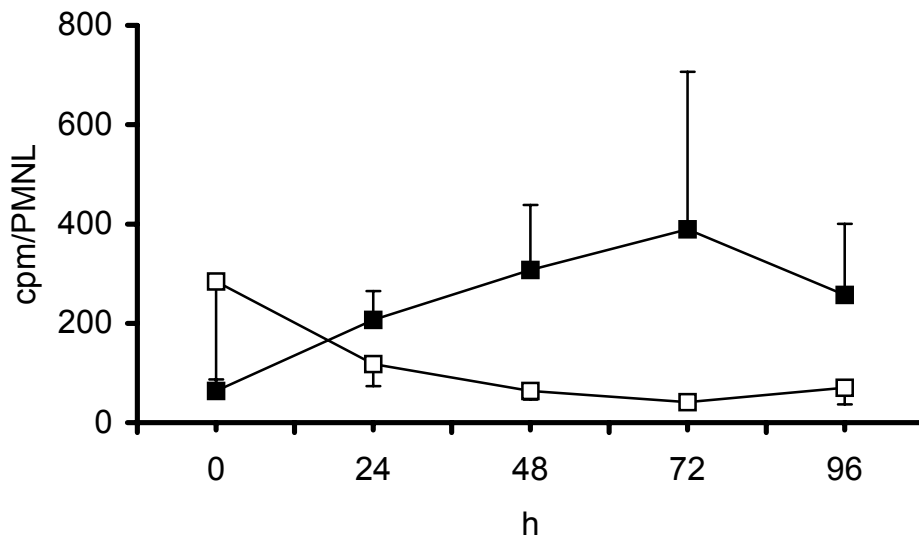


Abb. 3.21: TNF- $\alpha$ -stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL bei Perforationslokalisation im Magen/Dünndarm (●) und Dickdarm (□)

Die LPS-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion der ePMNL bei Patienten mit Peritonitis nach Dickdarmperforation lag zu jedem Zeitpunkt unter der LPS-stimulierten Sauerstoffradikalproduktion der ePMNL bei Patienten mit Peritonitis nach Magen- oder Dünndarmperforation (Abb. 3.22).

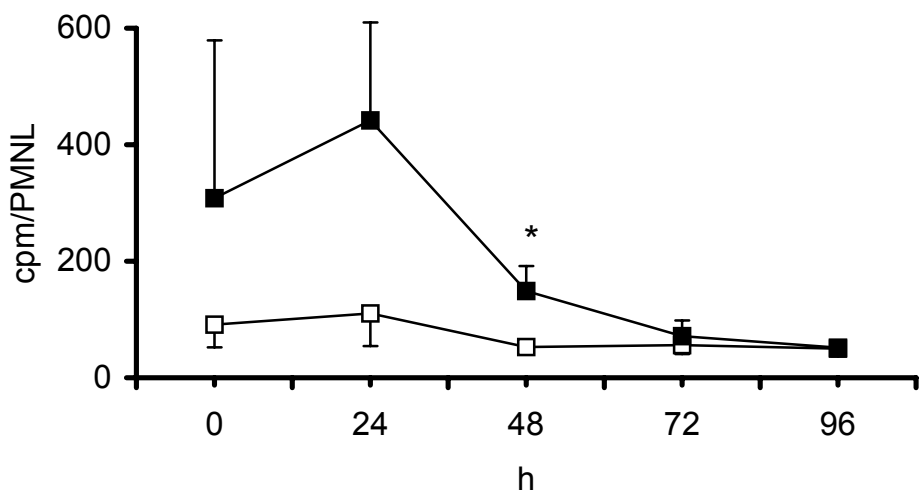


Abb. 3.22: LPS-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL bei Perforation des Magens/ Dünndarms (●) und Dickdarm (□). \* $p < .05$  ePMNL bei Perforation des Magens/ Dünndarms vs ePMNL bei Perforation des Dickdarms

Die Phagozytose-assoziierte intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL von Patienten mit Peritonitis nach Magen- oder Dünndarmperforation lag zu jedem Zeitpunkt höher als die intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL von Patienten mit Peritonitis nach Dickdarmperforation (Abb. 3.23).

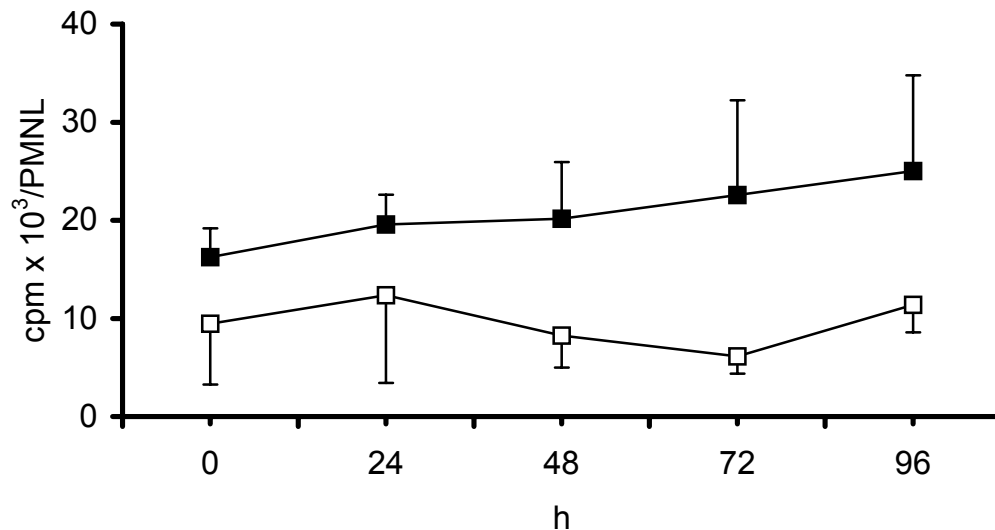


Abb. 3.23: C3-Zymosan-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL bei Perforationslokalisation im Magen/Dünndarm (●) und Dickdarm (□)

Auch die Phagozytose-assoziierte intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL von Patienten mit Peritonitis nach Dickdarmperforation erreichte nie die Höhe der intrazellulären Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL von Patienten mit Peritonitis nach Magen- oder Dünndarmperforation (Abb. 3.24).

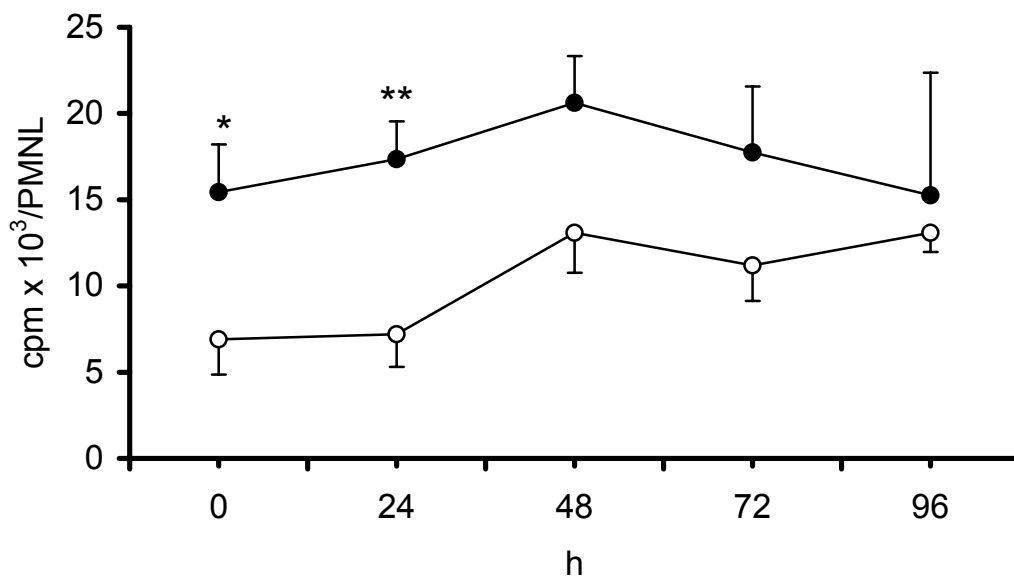


Abb 3.24: C3-Zymosan-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL bei Perforationslokalisierung im Magen/Dünndarm (●) und Dickdarm (○). \* $p < .05$  zPMNL bei Perforation des Magens/Dünndarms vs zPMNL bei Perforation des Dickdarms. \*\* $p < .01$  zPMNL bei Perforation des Magens/Dünndarms vs zPMNL bei Perforation des Dickdarms

### 3.4 Relaparotomie

Der Effekt eines wiederholten chirurgischen Eingriffs auf die Aktivierbarkeit der PMNL wurde evaluiert. 24 Stunden nach Relaparotomie zeigte sich eine hohe spontane sowie stimulierte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender polymorphkerniger Leukozyten (z.B. PMA-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion  $2427 \pm 1010$  cpm/PMNL 24 h nach Relaparotomie versus  $1130 \pm 160$  cpm/PMNL vor Relaparotomie; A23187-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion  $938 \pm 436$  cpm/PMNL 24 h nach Relaparotomie versus  $535 \pm 107$  cpm/PMNL vor Relaparotomie, nicht signifikant). Nach Relaparotomie ließen sich keine Veränderungen der luzigenin- bzw. luminolverstärkten Chemilumineszenz emigrierter PMNL erkennen.

### 3.5 Hemmung der Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL

Bisher liegen noch keinerlei Ergebnisse vor, ob sich die Sauerstoffradikalproduktion emigrierter polymorphkerniger Leukozyten auch hemmend modulieren lässt. Dies war Frage der folgenden in vitro Experimente.

#### 3.5.1 Hemmung der extrazellulären Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL

Eine Reduktion der FMLP-stimulierten Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL von Peritonitispatienten und Kontrollen war mit allen eingesetzten Substanzen möglich (Chloramin, Buflomedilhydrochlorid, Pentoxifyllin, 2-Chloro-Adenosin, Abb. 3.25, Abb. 3.26).

Dabei nahm die FMLP-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion bei 0,005% eingesetztem Chloramin, Buflomedil zu  $10^{-4}$  Mol/l und Pentoxifyllin zu  $10^{-3}$  Mol/l signifikant ab. Durch 2-Chloro-Adenosin in den Konzentrationen  $10^{-8}$  Mol/l bis  $10^{-4}$  Mol/l war keine signifikante Hemmung der FMLP-stimulierten Sauerstoffradikalproduktion der emigrierten PMNL möglich (Tab. 3.10).

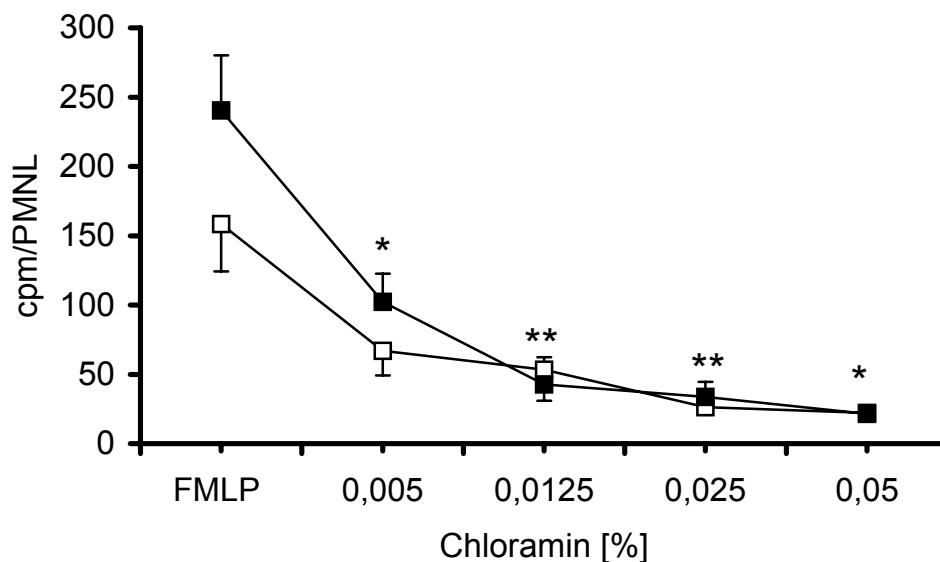


Abb. 3.25: Hemmung der FMLP [ $10^{-6}$  Mol/l] - stimulierten Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL mit Chloramin bei Patienten mit sekundärer Peritonitis (□) und Kontrollen (●). \* $p < .05$  ePMNL mit FMLP und Chloramin vs ePMNL mit FMLP. \*\* $p < .01$  ePMNL bei FMLP und Chloramin vs ePMNL bei FMLP.

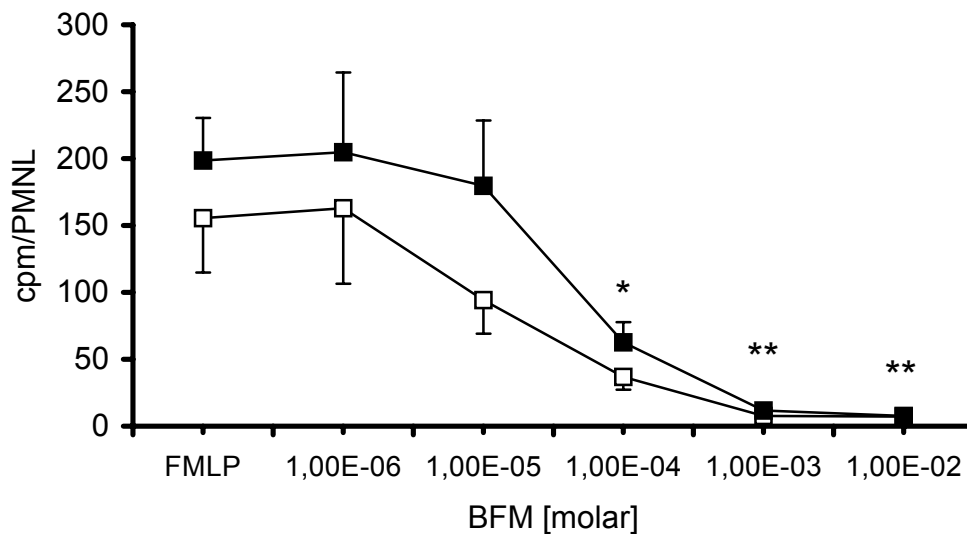


Abb. 3.26: Hemmung der FMLP-stimulierten Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL mit Buflomedilhydrochlorid bei Patienten mit sekundärer Peritonitis (□) und Kontrollen (●). \* $p < .05$  FMLP und BFM  $10^{-4}$  Mol/l vs FMLP bei Kontrollen und Peritonitispatienten. \*\* $p < .01$  FMLP und BFM  $10^{-3}$  Mol/l bzw.  $10^{-2}$  Mol/l vs FMLP bei Peritonitispatienten und Kontrollen

Tab. 3.10: Hemmung der FMLP-stimulierten Sauerstoffradikalproduktion durch Pentoxifyllin und 2-Chloro-Adenosin

Pentoxifyllin [Mol/l]	Peritonitis	Kontrolle	2-Cl-Adenosin [Mol/l]	Peritonitis	Kontrolle
0	169 ± 42	201 ± 27	0	169 ± 42	201 ± 27
$10^{-6}$	145 ± 34	211 ± 29	$10^{-8}$	139 ± 34	134 ± 2
$10^{-5}$	142 ± 36	187 ± 43	$10^{-7}$	197 ± 54	188 ± 45
$10^{-4}$	102 ± 32	136 ± 53	$10^{-6}$	173 ± 55	197 ± 52
$10^{-3}$	50 ± 15*	40 ± 15 <sup>#</sup>	$10^{-5}$	177 ± 49	180 ± 28
$10^{-2}$	13 ± 2**	14 ± 3**	$10^{-4}$	118 ± 36	141 ± 26

\* $p < .05$  FMLP und PTF  $10^{-3}$  Mol/l vs FMLP bei Kontrollen. <sup>#</sup>  $p < .01$  FMLP und PTF  $10^{-3}$  Mol/l vs FMLP bei Peritonitispatienten. \*\* $p < .01$  FMLP und PTF  $10^{-2}$  Mol/l vs FMLP bei Peritonitispatienten und Kontrollen

### 3.5.2 Hemmung der Phagozytose-assoziierten intrazellulären Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL

Auch die Phagozytose-assoziierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL konnte bei Peritonitispatienten durch Buflomedilhydrochlorid, Pentoxifyllin und Chloramin gehemmt werden. Sie wurde bei Buflomedilhydrochlorid zu  $10^{-4}$  Mol/l, Pentoxifyllin zu  $10^{-3}$  Mol/l und Chloramin zu 0,0125% (Peritonitispatienten) bzw. 5% (Kontrollen) signifikant (Abb. 3.27).



Durch 2-Chloro-Adenosin in den Konzentrationen  $10^{-8}$  Mol/l bis  $10^{-4}$  Mol/l konnte auch die C3-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion nicht signifikant gehemmt werden (Tab. 3.11).

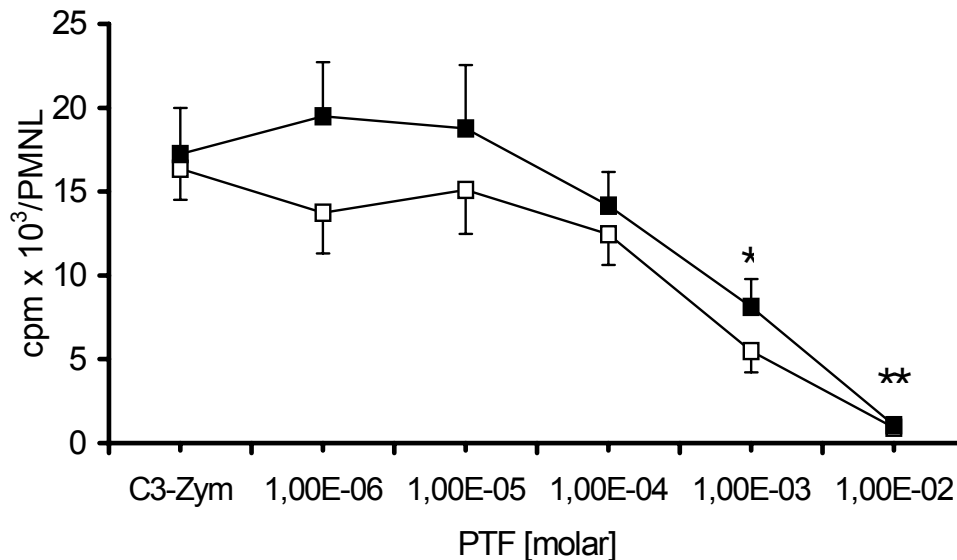


Abb. 3.27: Hemmung der C3-stimulierten Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL mit Pentoxifyllin bei Patienten mit sekundärer Peritonitis (□) und Kontrollen (●). \* $p < .05$  C3-Zymosan und PTF vs C3-Zymosan bei Peritonitispatienten und Kontrollen. \*\* $p < .01$  C3-Zymosan und PTF vs C3-Zymosan bei Peritonitispatienten und Kontrollen

Tab. 3.11: Hemmung der C3-stimulierten Sauerstoffradikalproduktion durch Buflomedilhydrochlorid und Chloramin

BFM [Mol/l]	Peritonitis	Kontrolle	Chloramin [%]	Peritonitis	Kontrolle
0	16184 ± 1591	18937 ± 3393	0	16184 ± 1591	18937 ± 3393
$10^{-6}$	14278 ± 1275	20157 ± 4366	0,005	16593 ± 1862	15421 ± 2229
$10^{-5}$	14171 ± 1122	19743 ± 4267	0,0125	11376 ± 1232 <sup>#</sup>	13367 ± 2884
$10^{-4}$	6782 ± 632**	9919 ± 1735*	0,025	9218 ± 1219 <sup>##</sup>	9433 ± 2100 <sup>§</sup>
$10^{-3}$	867 ± 164**	1408 ± 323 <sup>##</sup>	0,05	6878 ± 923 <sup>##</sup>	6894 ± 1434 <sup>§§</sup>

\* $p < .05$  BFM und C3-Zymosan vs C3-Zymosan bei Kontrollen. \*\* $p < .01$  BFM und C3-Zymosan vs C3-Zymosan bei Peritonitispatienten. <sup>##</sup> $p < .01$  BFM und C3-Zymosan vs C3-Zymosan bei Kontrollen. <sup>#</sup> $p < .05$  Chloramin und C3-Zymosan vs C3-Zymosan bei Peritonitispatienten. <sup>##</sup> $p < .01$  Chloramin und C3-Zymosan vs C3-Zymosan bei Peritonitispatienten. <sup>§</sup> $p < .05$  Chloramin und C3-Zymosan vs C3-Zymosan bei Kontrollen. <sup>§§</sup> $p < .01$  Chloramin und C3-Zymosan vs C3-Zymosan bei Kontrollen

### 3.6 Einfluß der Reduktion der Sauerstoffradikalproduktion auf die Phagozytoseaktivität emigrierter PMNL

Durch die antiinflammatorischen Substanzen Chloramin, Buflomedilhydrochlorid und Pentoxifyllin konnte die Sauerstoffradikalproduktion polymorphkerniger Leukozyten hemmend moduliert werden. In in vitro Experimenten wurde der Einfluß der genannten Substanzen auf die Phagozytosekapazität der PMNL evaluiert. Keine zur Hemmung der Sauerstoffradikalproduktion von ePMNL eingesetzten Substanzen beeinträchtigten die Phagozytose opsonierter E. coli durch PMNL (Abb. 3.28, Tab. 3.12).

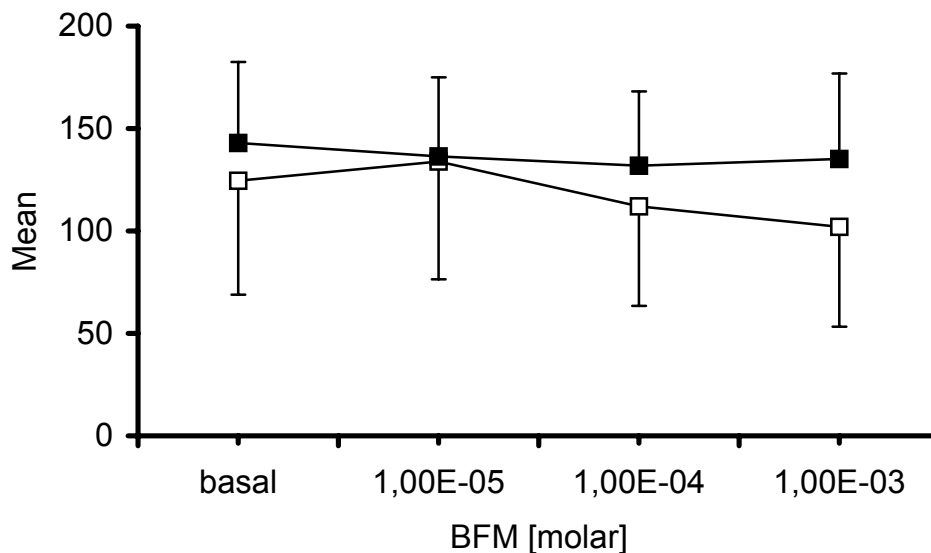


Abb. 3.28: Phagozytose emigrierter PMNL unter Buflomedilhydrochlorid bei Patienten mit sekundärer Peritonitis (□) und Kontrollen (●)

Tab. 3.12: Phagozytosekapazität emigrierter PMNL basal und nach Zusatz von Pentoxifyllin- und Chloramin

Pentoxifyllin [Mol/l]	Peritonitis	Kontrolle	Chloramin [%]	Peritonitis	Kontrolle
0	124 ± 56	143 ± 40	0	124 ± 56	143 ± 40
10 <sup>-5</sup>	125 ± 55	152 ± 47	0,0025	121 ± 55	157 ± 55
10 <sup>-4</sup>	101 ± 42	151 ± 45	0,005	119 ± 54	155 ± 56
10 <sup>-3</sup>	129 ± 61	121 ± 42	0,0125	116 ± 48	155 ± 56

## 4 DISKUSSION

Die erfolgreiche chirurgische Herdsanierung ist für die Prognose von Patienten mit sekundärer Peritonitis von entscheidender Bedeutung. Kann diese nicht erreicht werden und entwickeln sich aus der lokalen Infektion und Entzündung systemische Komplikationen wie Schock und multiples Organversagen, liegt die Letalität der Peritonitis trotz antibiotischer Therapie und intensivmedizinischer Fortschritte bei 20 bis 50 Prozent (2, 3, 80).

Eine entscheidende Rolle bei der sekundären Peritonitis tragen polymorphkernige Leukozyten. Nach intestinaler Perforation oder Anastomoseninsuffizienz wandern PMNL durch chemotaktile Botenstoffe an den Ort der Entzündung. Der Adhäsion an Endothel schließt sich die Migration in entzündliches extravasales Gewebe an. Emigrierte polymorphkernige Leukozyten eliminieren pathogene Mikroorganismen durch Phagozytose und damit assoziierte proteolytische Zersetzung sowie der Produktion von Sauerstoffradikalen.

Neben Mikroorganismen und deren Toxinen ist aber auch die überschießende Aktivierung polymorphkerniger Leukozyten im Zusammenspiel mit Monozyten und Makrophagen für die Entwicklung eines septischen Schocks und des multiplen Organversagens verantwortlich. Erwiesen ist die Beteiligung der PMNL bei der Entstehung eines Leberversagens und des Adult Respiratory Distress Syndrome (27, 34). Nach Aktivierung durch bakterielle Bestandteile setzen Leukozyten Zytokine frei. Zytokine wirken als Mediatoren der Entzündungsreaktion und können die Entwicklung eines septischen Schocks begünstigen.

Die sekundäre Peritonitis ist mit einer hohen intraabdominalen Zytokinkonzentration assoziiert. Dabei liegt die Konzentration an proinflammatorischen Zytokinen (z.B.  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-8, IL-6) in der Peritonealhöhle um ein vielfaches höher als im Plasma (39, 81). Die Ausschüttung dieser Mediatoren ist für die lokale Kontrolle eines Infektionsherdes von entscheidender Bedeutung. Dagegen korrelieren hohe systemische Konzentrationen von IL-6 und  $\text{TNF-}\alpha$  mit einer schlechten Prognose bei sekundärer Peritonitis (81, 82). Die überschießende Produktion an Zytokinen und damit verbundene Aktivierung von Leukozyten kann zu Mikrozirkulationsstörungen und Gewebeschäden führen (26, 38).

Überaus wichtig für die Prognose der Patienten mit Peritonitis ist die frühzeitige erfolgreiche chirurgische Sanierung der Infektionsquelle. Ist die Erstversorgung der Peritonitis und das ausreichende Débridement der Bauchhöhle unsicher, muß die Relaparotomie geplant werden. Ungeklärt bleibt bis heute, zu welchem Zeitpunkt welcher Modus der Relaparotomie in der Therapie der komplizierten sekundären Peritonitis erfolgversprechend ist. Hierbei kommen vor allem die geplante Relaparotomie sowie die Relaparotomie „on demand“ in Betracht. Der Entscheidung zur Relaparotomie steht das operative Trauma gegenüber, das wiederum zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und zur Einschwemmung von z.B. IL-6 und TNF- $\alpha$  führt, welche die hämodynamische Situation des Patienten weiterhin verschlechtern können (83, 84).

Das Zusammenspiel proinflammatorischer Zytokine und Leukozyten sowie Mechanismen daraus resultierender Gewebeerstörung und Komplikationen der humanen Peritonitis sind bis heute jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Untersuchungen zur Pathophysiologie der Leukozytenaktivierung nach Emigration wurden vor allem an polymorphkernigen Leukozyten aus der Vakuum-Hautkammer, also aus nicht entzündetem humanem Gewebe (41, 42) durchgeführt. Nach Emigration zeigte sich eine erhöhte Sauerstoffradikalproduktion der PMNL (41, 42). Dagegen war eine verminderte Phagozytosekapazität zu verzeichnen (44). Auch bei tierexperimentell induzierter Sepsis war eine Deaktivierung der Phagozytose festzustellen (85). Bis heute existieren jedoch nur wenige Untersuchungen zur Sauerstoffradikalproduktion und Phagozytoseaktivität emigrierter Leukozyten von Patienten mit sekundärer Peritonitis (26).

Die vorliegende Studie charakterisiert die spontane und stimulierte Sauerstoffradikalproduktion und Phagozytoseaktivität zirkulierender sowie emigrierter, intraabdominaler polymorphkerniger Leukozyten bei Patienten mit sekundärer Peritonitis. Es wurden 15 Patienten mit sekundärer Peritonitis nach intestinaler Perforation oder Anastomoseninsuffizienz untersucht. Sechs Patienten mit komplikationslosem Verlauf einer sekundären Peritonitis wurden sechs Patienten mit sekundärer Peritonitis mit systemischen Komplikationen (multiples Organversagen, catecholaminpflichtiger septischer Schock) gegenübergestellt. Acht Patienten nach abdominalchirurgischer Operation ohne Infektion dienten als Kontrollen. Mit der luzigenin- bzw. luminolverstärkten Chemilumineszenz wurde die

extra- und intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion polymorphkerniger Leukozyten erfaßt. Darüber hinaus wurde intra- sowie postoperativ die Konzentration pro- und antiinflammatorischer Zytokine in der Peritonealhöhle sowie im Plasma charakterisiert.

#### **4.1 Methodenkritik**

Die Isolierung polymorphkerniger Leukozyten aus dem Vollblut führt auch mit schonenden Verfahren zu einer Aktivierung der PMNL. Zum Vergleich zirkulierender und emigrierter PMNL ist eine Isolation der zirkulierenden Granulozyten aus dem Vollblut jedoch notwendig, um die Interferenz des Hämoglobins (Quenching) mit der durch PMNL produzierten Chemilumineszenz zu verhindern. Um eine analoge Behandlung beider Granulozytenpopulationen zu gewährleisten, wurden auch emigrierte PMNL in der vorliegenden Studie mit Polymorphprep® behandelt.

Die luzigenin- bzw. luminolverstärkte Chemilumineszenz ist eine etablierte Methode zur Erfassung der Sauerstoffradikalproduktion. Luzigenin kann aufgrund seiner Molekülgröße sowie der hydrophilen Eigenschaften die Zellmembran nicht passieren und kann somit zur Detektion freigesetzter extrazellulärer Sauerstoffradikale eingesetzt werden. Luminol dagegen diffundiert als kleines, lipophiles Molekül über biologische Membranen und erfaßt somit die intra- und extrazelluläre Produktion von Sauerstoffradikalen (45, 86). Luminol reagiert bevorzugt mit der bei der Phagozytose von opsonierten Partikeln produzierten hypochlorigen Säure, die im Phagosom durch das Myeloperoxidase-System der PMNL gebildet wird (46). Konsekutiv kann durch die luminolverstärkte Chemilumineszenz vor allem die intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion erfaßt werden.

#### **4.2 Zytokine**

In der vorliegenden Studie konnten sehr hohe Konzentrationen pro- sowie antiinflammatorischer Zytokine in der Peritonealhöhle von Patienten mit Peritonitis festgestellt werden. Die im Peritonealsekret erfaßte Konzentration an TNF- $\alpha$  war intraoperativ ca. 30 mal höher als im Plasma. Darüber hinaus wurden in der

Peritonealhöhle wesentlich höhere Konzentrationen an IL-8 und IL-10 als in der systemischen Zirkulation detektiert. Dies bestätigt Untersuchungen von Fröhlich et al, die perioperativ die lokale Konzentration an TNF- $\alpha$  sowie IL-8 erfaßten (40). Ebenfalls unterstützen diese Ergebnisse die Vorstellung einer intraperitoneal kompartimentierten Zytokinausschüttung bei Infektionen der Bauchhöhle, bei der sich die intraabdominalen und systemischen Konzentrationen an Zytokinen nicht äquilibrieren (81). Ein hoher Anteil intraperitonealer Zytokine resultiert aus der Aktivierung ortsständiger Makrophagen, polymorphkerniger Leukozyten und Mesothelzellen durch bakterielle Mikroorganismen und deren Toxine. Aber auch das operative Trauma alleine löst eine lokale Zytokinfreisetzung aus. Dies konnte auch bei der vorliegenden Studie bei Patienten nach abdominalchirurgischer Operation beobachtet werden, bei denen eine intraabdominale Zytokinausschüttung erfaßt wurde. Die intraabdominalen Konzentrationen der pro- und antiinflammatorischen Mediatoren waren bei Kontrollen aber signifikant niedriger.

Vergleicht man die Konzentration an pro- und antiinflammatorischen Zytokinen zwischen Patienten mit sekundärer Peritonitis ohne Komplikationen und Patienten mit kompliziertem Verlauf einer sekundären Peritonitis, so ergeben sich bei kompliziertem Verlauf einer Peritonitis höhere intraabdominale sowie systemische Konzentrationen an IL-8 sowie TNF- $\alpha$  (jedoch nicht signifikant). Nach bisherigen Untersuchungen korreliert eine hohe systemische Zytokinkonzentration mit einer schlechten Prognose (81, 82). Bei der vorliegenden Untersuchung sind von 15 in die Studie eingeschlossenen Patienten zwei Patienten im multiplen Organversagen verstorben. Aufgrund dieser kleinen Fallzahl kann ein statistischer Zusammenhang einer großen systemischen Zytokinfreisetzung mit einer hohen Letalität nicht gesichert werden.

### **4.3 Endotoxin**

Bei Patienten mit Peritonitis konnten in der Abdominalhöhle sehr hohe Konzentrationen an Endotoxin als Bestandteil gramnegativer Bakterien detektiert werden. Auch im Plasma der Peritonitispatienten waren geringe Mengen Endotoxin nachweisbar. Bei Kontrollen nach abdominalchirurgischer Operation ohne Infektion waren die Konzentrationen des Lipopolysaccharids im Peritonealsekret signifikant

niedriger. Dies korreliert mit Beobachtungen von Junger et al und Schoeffel et al (87, 88). Zudem erfaßten Lau et al und Junger et al nach Perforation des Dickdarms bzw. Anastomoseninsuffizienz nach Kolon-, Sigma- oder Rektumresektion wesentlich höhere Konzentrationen an Endotoxin als nach Perforation des Magens oder des Dünndarms (88, 89). Auch bei der vorliegenden Untersuchung waren nach Perforation des Dickdarms größere Mengen des Lipopolysaccharids als nach Perforation des Magens bzw. Dünndarms nachweisbar.

## **4.4 Sauerstoffradikalproduktion**

### **4.4.1 Extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion**

Die Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender sowie emigrierter polymorphkerniger Leukozyten nimmt eine bedeutende Rolle in der lokalen und systemischen Abwehr einer Peritonitis ein. Die luzigeninverstärkte Chemilumineszenz spiegelt die extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion der PMNL wieder. Bei Patienten nach abdominalchirurgischer Operation war postoperativ die spontane extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter polymorphkerniger Leukozyten signifikant höher als die spontane Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL. Eine Stimulation der extrazellulären Sauerstoffradikalproduktion emigrierter und zirkulierender PMNL war rezeptorunabhängig durch PMA am stärksten möglich. FMLP erzielte als rezeptorabhängiger Stimulus eine hohe Sauerstoffradikalproduktion. Auch die stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter Granulozyten war bei Kontrollen postoperativ höher als die Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender polymorphkerniger Leukozyten (90). Diese Ergebnisse bestätigen bisherige Untersuchungen von Billing et al, Yee et al und Zimmerli et al (26, 41, 42), bei denen humane polymorphkernige Leukozyten und Leukozyten tierischen Ursprungs nach Emigration eine gesteigerte antimikrobielle Aktivität und Sauerstoffradikalproduktion aufwiesen. Yee et al untersuchten humane PMNL nach Emigration in eine unter Vakuum auf die Haut angebrachte Kammer (nicht entzündetes Gewebe) und führten die erhöhte Fähigkeit der ePMNL zur Sauerstoffradikalproduktion auf eine vermehrte Expression der Oberflächenrezeptoren CD11b sowie CD16 und des FMLP-Rezeptors zurück (41).

Die Beobachtung einer gesteigerten Aktivität polymorphkerniger Leukozyten nach Emigration konnte in der vorliegenden Untersuchung bei Patienten mit sekundärer Peritonitis nicht uneingeschränkt bestätigt werden. Die spontane Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis war intraoperativ zwar höher als die der zPMNL, unterschied sich jedoch ab 48 Stunden nach chirurgischer Herdsanierung nicht von der zirkulierenden PMNL. Auch nach Aktivierung durch rezeptorabhängige und rezeptorunabhängige Stimuli ließ sich keine signifikante Differenz zwischen der Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL und der Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL beobachten.

Unterteilt man die Patienten mit Peritonitis in eine Gruppe ohne Komplikationen und eine Gruppe mit kompliziertem Verlauf einer Peritonitis, so verhält sich die Sauerstoffradikalproduktion bei Patienten mit sekundärer Peritonitis ohne Komplikationen ähnlich wie die Sauerstoffradikalproduktion der Kontrollen nach abdominalchirurgischem Eingriff. Die stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter intraabdominaler Granulozyten war zum Teil signifikant höher als die der zPMNL. Zu keinem Zeitpunkt überstieg die extrazelluläre stimulierte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL die der emigrierten PMNL.

Hiervon unterschied sich jedoch die Produktion von Sauerstoffradikalen der ePMNL bei Patienten mit schwerer Peritonitis. Bei Patienten, die im Rahmen einer sekundären Peritonitis einen septischen Schock oder ein multiples Organversagen entwickelten, war eine Stimulation der spontanen Sauerstoffradikalproduktion emigrierter polymorphkerniger Leukozyten durch rezeptorabhängige sowie rezeptorunabhängige Mechanismen möglich. Die Fähigkeit emigrierter PMNL, Sauerstoffradikale nach Stimulation durch FMLP, PMA, A 23187 oder Komplement 5a zu bilden, war bei Patienten mit Peritonitis mit systemischen Komplikationen allerdings signifikant niedriger als bei Patienten mit Peritonitis ohne Komplikationen.

Im Gegensatz dazu war die Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL bei kompliziertem Verlauf einer Peritonitis gesteigert. Die Sauerstoffradikalproduktion der zPMNL überstieg die Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL. Die A 23187-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender polymorphkerniger Leukozyten von Patienten mit komplikationsloser Peritonitis war auf niedrigem Niveau vergleichbar mit der der Kontrollen, während die stimulierte Sauerstoffradikalproduktion der zPMNL von Peritonitispatienten mit systemischen Komplikationen signifikant höher lag.



Diese Ergebnisse sprechen für eine überaus starke systemische Aktivierung polymorphkerniger Leukozyten bei Patienten mit komplizierter Peritonitis. Eine erhöhte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL war auch bei tierexperimentell induzierter Peritonitis beobachtet worden (91). Nicht bestätigt werden konnte allerdings die Vermutung, daß die schwere Peritonitis mit einer erhöhten Aktivität emigrierter PMNL assoziiert ist. Bei in die Abdominalhöhle eingewanderten PMNL war die Sauerstoffradikalproduktion supprimiert. Voraussetzung einer lokalen Kontrolle des Infektionsherdes jedoch ist die antimikrobielle Aktivität emigrierter PMNL, die durch Sauerstoffradikalproduktion, Freisetzung proteolytischer Enzyme und Phagozytose wichtige immunologische Funktionen übernehmen.

Bei der vorliegenden Studie konnten bei Patienten mit sekundärer Peritonitis in der Abdominalhöhle signifikant höhere Konzentrationen an pro- sowie antiinflammatorischen Zytokinen als in der systemischen Zirkulation erfaßt werden. Die Kompartimentierung dieser Entzündungsmediatoren könnte die Zellfunktion der Leukozyten modulieren. Es wäre denkbar, daß das Vorhandensein hoher Konzentrationen an Zytokinen eine Deaktivierung emigrierter PMNL verursacht. Verantwortlich hierfür könnte zum Beispiel das entzündungshemmende Interleukin 10 (IL-10) sein. IL-10 inhibiert die Synthese der proinflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin 6 (IL-6). Darüber hinaus hemmt IL-10 rezeptorvermittelt die Phagozytose sowie Produktion von Sauerstoffradikalen durch PMNL (38, 92, 93). Die verifizierten hohen Konzentrationen an IL-10 könnten somit wichtige immunologische Funktionen der Leukozyten supprimieren.

Die durch polymorphkernige Leukozyten vermittelte Entzündungsreaktion wird durch Apoptose limitiert. Nach bisherigen Untersuchungen ist die massive Produktion von Sauerstoffradikalen in der Auslösung des programmierten Zelltods involviert. Nach Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase entstandenes intrazelluläres  $H_2O_2$  induziert die Apoptose der PMNL (94, 95). Intraperitoneales TNF- $\alpha$  ist für die Vermittlung der Neutrophilenrekrutierung und die Initiierung der Entzündungsreaktion notwendig, induziert jedoch ebenfalls den Zelltod der Leukozyten (96). Auch antiinflammatorisches IL-10 vermittelt verbunden mit morphologischer Veränderung der Leukozyten und DNA-Fragmentierung die Apoptose der PMNL (97). Apoptotische Zellen verringern ihre antimikrobielle Aktivität. Dies drückt sich in einer

Minderung der Phagozytose und Produktion von Sauerstoffradikalen aus. Während der Apoptose war in bisher vorliegenden Untersuchungen die spontane wie auch die FMLP- und PMA-stimulierte Sauerstoffradikalproduktion verringert (96). Es wäre möglich, daß in der vorliegenden Studie untersuchte emigrierte polymorphkernige Leukozyten von Patienten mit schwerer Peritonitis den Prozeß der Apoptose bereits durchliefen und aus diesem Grund eine nur geringe Sauerstoffradikalproduktion aufwiesen. Darüber hinaus wäre denkbar, daß die der Emigration vorausgehende massive Aktivierung der PMNL in der systemischen Zirkulation den vorzeitigen programmierten Zelltod induziert. Eine überschießende Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender Granulozyten könnte damit in direktem Zusammenhang mit einer Suppression immunologischer Funktionen emigrierter PMNL stehen.

Die Adhäsion polymorphkerniger Leukozyten an Endothel sowie die Emigration in entzündliches Gewebe stellen energieverbrauchende Prozesse in der Abwehr der Peritonitis dar (98). Eine Erklärung für die Deaktivierung emigrierter polymorphkerniger Leukozyten könnte die Erschöpfung zellulärer Energiereserven bei nur begrenzt zur Verfügung stehendem ATP darstellen. Auch eine mit der Produktion von Sauerstoffradikalen assoziierte mitochondriale Dysfunktion könnte die Inaktivierung immunologischer Funktionen erklären (97). Falls der Zelle keinerlei Energiereserven zur Verfügung stehen, könnte der passive Zelluntergang (Nekrose) neben der ATP-verbrauchenden Apoptose zum Zelltod führen. In der Abdominalhöhle befindliche hohe Konzentrationen an *E. coli*-Bakterien fördern zudem den nekrotischen Untergang polymorphkerniger Leukozyten (99). Die in der Peritonealhöhle im Vergleich zur systemischen Zirkulation (allerdings nicht signifikant) verminderte Vitalität der PMNL könnte Resultat einer gesteigerten Apoptose bzw. Nekrose sein.

Die Beobachtungen einer verminderten immunologischen Aktivität polymorphkerniger Leukozyten nach Emigration bei Patienten mit schwerer Peritonitis konnte bisherige Untersuchungen zur Funktion emigrierter Leukozyten nicht bestätigen. Hierfür kommen verschiedene Gründe ursächlich in Betracht. In der vorliegenden Studie wurde *ex vivo in vitro* die Funktion emigrierter polymorphkerniger Leukozyten bei Patienten mit sekundärer Peritonitis evaluiert. Dies stellt im Gegensatz zu bisher vorliegenden Studien von in die Vakuum-Hautkammer emigrierten polymorphkernigen Leukozyten eine Einwanderung in stark entzündetes Gewebe dar.

Nachweislich liegt in der Abdominalhöhle bei Peritonitis eine hohe Konzentration an Zytokinen vor, die die Zellfunktion polymorphkerniger Leukozyten modulieren könnte. Billing et al beobachteten eine Aktivitätssteigerung der PMNL nach Emigration in die infizierte Abdominalhöhle. Jedoch wurde der Schweregrad der Peritonitis in dieser Untersuchung nicht berücksichtigt. In der vorliegenden Studie konnte die Deaktivierung polymorphkerniger Leukozyten nach Emigration ausschließlich bei Patienten mit kompliziertem Verlauf einer sekundären Peritonitis beobachtet werden. Mori et al beobachteten bereits bei tierexperimentell durch Casein induzierter Peritonitis eine verminderte spontane sowie stimulierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL (91). Nach Meinung der Autoren könnte die geringe Detektion der Sauerstoffradikalproduktion der PMNL nach Emigration bei diesen Versuchsbedingungen durch Interferenz des Caseins mit der Chemilumineszenzmethode bedingt sein. Möglich wäre allerdings auch, daß durch Casein tierexperimentell eine schwerwiegende aseptische Peritonitis der Peritonealhöhle ausgelöst wurde und polymorphkernige Leukozyten nach Emigration eine geringe Sauerstoffradikalproduktion aufwiesen. Zudem war die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion zirkulierender PMNL nach tierexperimenteller Induktion der Peritonitis erhöht. Diese Daten bestätigen unsere Beobachtung der systemischen Hyperinflammation und Deaktivierung emigrierter PMNL bei sekundärer Peritonitis mit Komplikationen.

#### **4.4.2 LPS- und TNF- $\alpha$ -stimulierte extrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion**

Bakterielle Endotoxine vermitteln eine inflammatorische Aktivierung und verstärken die antimikrobielle Aktivität polymorphkerniger Leukozyten (57, 58, 100). Bei Patienten mit Peritonitis waren in der Peritonealhöhle sehr hohe Konzentrationen von Endotoxin nachweisbar. Auch bei Kontrollen nach abdominalchirurgischem Eingriff ohne Infektion war Endotoxin in der Abdominalhöhle detektierbar. Die spontane Sauerstoffradikalproduktion emigrierter polymorphkerniger Leukozyten war durch LPS nur wenig zu verstärken. Dagegen war Endotoxin bei Patienten mit Peritonitis systemisch nur in geringen Mengen nachweisbar. Die Sauerstoffradikalproduktion der zPMNL von Patienten mit Peritonitis ließ sich durch LPS stark stimulieren. Eine noch höhere Aktivierung der Sauerstoffradikalproduktion durch LPS war bei zirkulierenden polymorphkernigen Leukozyten von Kontrollen auszulösen. In Gegenwart hoher Konzentrationen an bakteriellen Endotoxinen in der infizierten

Abdominalhöhle bei Patienten mit Peritonitis scheint eine weitere Stimulation der Sauerstoffradikalproduktion durch LPS kaum mehr möglich. Verantwortlich hierfür könnte eine Rezeptordeaktivierung der Endotoxinrezeptoren sein. Pédrón et al und Tominaga et al beobachteten nach Exposition von Leukozyten mit Lipopolysaccharid eine Toleranzentwicklung gegenüber LPS. Es wäre denkbar, daß durch Downregulation der Lipopolysaccharidrezeptoren in Gegenwart hoher lokaler Konzentrationen an bakteriellen Endotoxinen ein Resistenzentwicklung auf die Aktivierung durch LPS zu verzeichnen ist (101, 102).

Dieses Verhalten emigrierter PMNL bei hohen Lipopolysaccharidkonzentrationen wird auch bei ätiologischer Differenzierung der Peritonitis deutlich. Bei Patienten mit Peritonitis nach Perforation des Dickdarms waren intraoperativ um ein vielfaches höhere Konzentrationen an Endotoxin als nach Perforation des Magens oder Dünndarms nachweisbar. Konsekutiv war bei Patienten mit Peritonitis nach Perforation des Dickdarms nur eine geringe Stimulation emigrierter PMNL durch Lipopolysaccharid möglich.

Darüber hinaus ist die Rolle des „Lipopolysaccharid-Binde-Proteins“ (LBP) zu beachten. Um annähernd physiologische Bedingungen in vitro zu erzielen, wurde der Zellsuspension aus dem Vollblut isolierter PMNL vor Stimulation mit Lipopolysaccharid Plasma zugefügt. Emigrierte PMNL wurden mit zellfreiem Peritonealsekret versetzt. Ohne Zugabe von Plasma bzw. Peritonealsekret war eine Stimulation der Sauerstoffradikalproduktion nicht möglich. Im Plasma befindliches „Lipopolysaccharid-Binde-Protein“ vermittelt die durch LPS ausgelöste Aktivierung polymorphkerniger Leukozyten. Hingegen schwächt das „Bactericidal/permeability-increasing protein“ die Effekte des LPS ab und konkurriert mit LBP um die Bindung an Endotoxin (103). Wäre im Peritonealsekret im Vergleich zum Plasma keine adäquate Konzentration an Lipopolysaccharid-Binde-Protein vorhanden, so könnte konsekutiv die Aktivierung emigrierter PMNL durch LPS nicht vermittelt werden. Auch ein Überwiegen an „Bactericidal/permeability-increasing protein“ könnte dafür verantwortlich sein, daß nur eine geringe Stimulation emigrierter PMNL durch LPS möglich war. Allerdings wurden im Rahmen der Untersuchungen von Opal et al im Peritonealsekret höhere Konzentrationen an Lipopolysaccharid-Binde-Protein als Bactericidal/permeability-increasing protein erfaßt (103).

Theron et al evaluierten den Einfluß von Serum auf die NADPH-Oxidase-Aktivität und damit assoziierte Sauerstoffradikalproduktion stimulierter polymorphkerniger

Leukozyten (104). Nach Zugabe von Plasma konnte eine Aktivitätssteigerung der Leukozyten durch optimale Bereitstellung energetischer Reserven verzeichnet werden. Auch in der vorliegenden Studie könnte allein durch das die Zellsuspension umgebende Plasma eine stärkere Stimulation der Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL im Vergleich zu ePMNL verursacht worden sein.

Auch Tumor-Nekrose-faktor-alpha ( $\text{TNF-}\alpha$ ) wurde in der Peritonealhöhle der Patienten mit Peritonitis in hohen Konzentrationen ermittelt. Durch  $\text{TNF-}\alpha$  war nur eine geringe Stimulation emigrierter PMNL bei Patienten mit Peritonitis möglich. Bei intraoperativ hohen Konzentrationen an  $\text{TNF-}\alpha$  bei Peritonitis nach Dickdarmperforation nahm die durch  $\text{TNF-}\alpha$  stimulierte Sauerstoffradikalproduktion intraabdomineller PMNL postoperativ kontinuierlich ab. Porteu et al und Schleiffenbaum et al beobachteten eine durch Rezeptordownregulation bedingte Deaktivierung polymorphkerniger Leukozyten in Gegenwart hoher Konzentrationen an  $\text{TNF-}\alpha$  (105, 106). Auch in der vorliegenden Untersuchung könnte eine Rezeptordeaktivierung eine verminderte Sauerstoffradikalproduktion bedingt haben.

#### **4.4.3 Intrazelluläre Phagozytose-assoziierte Sauerstoffradikalproduktion**

Die Phagozytose opsonierter Zymosanpartikel ist mit der Phagozytose bakterieller Mikroorganismen in der infizierten Peritonealhöhle zu vergleichen. Sie stellt nach Exudation der PMNL in entzündliches Gewebe einen wichtigen Teil der lokalen Infektionskontrolle dar. Die Phagozytose-assoziierte Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL war bei Patienten mit komplikationslosem Verlauf einer sekundären Peritonitis signifikant höher als bei Peritonitis mit Komplikationen (107). Die Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL von Patienten mit systemischen Komplikationen lag nur auf dem Niveau der Sauerstoffradikalproduktion der Kontrollen. Beachtet man, daß bei abdominalchirurgischem Eingriff ohne Infektion nur sehr wenig bakterielle Bestandteile zu phagozytieren sind, stellt eine ähnlich geringe phagozytotische Aktivität emigrierter PMNL bei schwerer Peritonitis keinen adäquaten Mechanismus der Erregerelimination dar. Neben einer geringen Phagozytose-assoziierten Sauerstoffradikalproduktion der ePMNL konnte in weiteren Untersuchungen nachgewiesen werden, daß auch die Phagozytose von opsonierten E. coli Bakterien bei Patienten mit komplizierter Peritonitis signifikant erniedrigt war (108). Eine ungenügende lokale Beseitigung bakterieller Mikroorganismen durch

polymorphkernige Leukozyten könnte in Verbindung mit einer geringen Sauerstoffradikalproduktion die schlechte Prognose der Patienten mit systemischen Komplikationen bei sekundärer Peritonitis bedingen.

Die Phagozytose-assoziierte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender und emigrierter PMNL war nach Perforation des Dickdarms niedriger als nach Perforation des Magens oder Dünndarms. Neben der Schwere der systemischen Entzündungsreaktion trägt die Perforationslokalisation zur Prognose der Peritonitis bei. Eine inadäquate Phagozytose und intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion durch emigrierte PMNL nach Perforation des Dickdarms könnte Ursache einer schlechten Prognose sein.

Zudem läßt der Vergleich der Sauerstoffradikalproduktion C3-opsonierter und nicht opsonierter Zymosanpartikel durch ePMNL Rückschlüsse auf die Opsonierungskapazität des Peritonealsekrets zu. Mit nicht opsoniertem Zymosan war die Phagozytose-assoziierte Sauerstoffradikalproduktion nur unwesentlich zu steigern. Es ist bekannt, daß infektiöse Abdominalexsudate die Abtötung von E. coli durch PMNL kaum fördern. Aus Peritonealsekreten bei Patienten mit Peritonitis konnten Bakterien gewonnen werden, die nur zu einem geringen Teil C3 auf ihrer Oberfläche aufwiesen (109). Es wäre denkbar, daß aufgrund des niedrigen Gehalts an Komplement in der infizierten Abdominalhöhle eine ausreichende Opsonierung der Zymosanpartikel nicht gewährleistet ist. Da die Opsonierung pathogener Mikroorganismen entscheidend zu deren Elimination durch Phagozytose beiträgt, könnte die mangelnde Opsonierungsfähigkeit des Peritonealsekrets für die geringe Sauerstoffradikalproduktion nach Zugabe nicht opsonierter Zymosanpartikel verantwortlich sein.

#### **4.4.4 Sauerstoffradikalproduktion nach Relaparotomie**

Zu welchem Zeitpunkt eine Relaparotomie den Krankheitsverlauf der Peritonitis am günstigsten beeinflusst, ist bis heute noch nicht geklärt. Nach Relaparotomie werden systemisch große Mengen proinflammatorischer Zytokine ausgeschüttet, die die Entzündungsreaktion verstärken und den klinischen Zustand des Patienten verschlechtern können (39, 82). Die spontane sowie stimulierte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender polymorphkerniger Leukozyten war 24 Stunden nach Relaparotomie der Patienten erhöht. Die gesteigerte Zytokinausschüttung könnte

eine starke Aktivierung der zPMNL verursacht haben. Es wäre möglich, daß unter anderem die gesteigerte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender Leukozyten neben der hohen Konzentration an entzündungsinitiierenden Mediatoren für eine Verschlechterung der hämodynamischen Situation des Patienten und die Entwicklung eines multiplen Organversagens verantwortlich ist.

#### **4.5 Therapeutische Ansätze**

Sepsis ist nach bisherigen Erkenntnissen mit einer systemischen Hyperinflammation assoziiert (37). In der vorliegenden Studie konnte bei Patienten mit schwerer Peritonitis noch 5 Tage nach chirurgischer Herdsanierung eine überschießende Aktivierung zirkulierender polymorphkerniger Leukozyten nachgewiesen werden. Da die massive Produktion von Sauerstoffradikalen an der Genese des multiplen Organversagens beteiligt ist, könnte eine medikamentöse Modulation der überschießenden Aktivierung polymorphkerniger Leukozyten Komplikationen vorbeugen und die Prognose der Patienten mit schwerer Peritonitis verbessern. Nach tierexperimentell intravenös appliziertem LPS konnte durch die Anwendung von Rezeptorantagonisten proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 und TNF- $\alpha$  die Letalität verringert werden (110). In klinischen Studien konnte dies jedoch nicht bestätigt werden (111). Ein weiterer therapeutischer Ansatz liegt in der Modulation der Sauerstoffradikalproduktion polymorphkerniger Leukozyten. Von einer intraabdominal gesteigerten Sauerstoffradikalproduktion ausgehend wurde in der vorliegenden Studie die Hemmung der Sauerstoffradikalproduktion emigrierter PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis und Kontrollen evaluiert. Die stimulierte extrazelluläre wie auch die intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion der emigrierten PMNL konnte durch Chloramin, Buflomedilhydrochlorid sowie Pentoxiphyllin verringert werden. Nachweislich hatte keine der Substanzen Einfluß auf die Phagozytoseaktivität polymorphkerniger Leukozyten.

Chloramin wird bereits therapeutisch zur abdominalen Lavage bei sekundärer Peritonitis eingesetzt. Die Sicherheit und Effektivität intraoperativer Lavagelösungen wurde jedoch bisher nicht in kontrollierten Studien erwiesen. Durch die Anwendung von Chloramin werden in der Bauchhöhle befindliche Bakterien abgetötet, jedoch könnte die Lavagelösung auch mit den peritonealen Abwehrmechanismen

interferieren (112). Zudem wurde in der vorliegenden Studie eine Deaktivierung emigrierter Leukozyten bei schwerer Peritonitis beobachtet. Nach Emigration war die Sauerstoffradikalproduktion sowie die Phagozytosekapazität polymorphkerniger Leukozyten supprimiert. Eine ungenügende lokale Erregerelimination verbunden mit einer geringen intraabdominalen Sauerstoffradikalproduktion könnte neben der systemischen Hyperinflammation zur schlechten Prognose der schweren Peritonitis beitragen. Aus dieser Sicht bleibt der Einsatz von Chloramin zu diskutieren, da dieser zu einem weiteren Aktivitätsverlust in der Abwehr der Peritonitis bedeutender immunologischer Mechanismen führt.

Pentoxiphyllin wird vornehmlich zur Behandlung der arteriellen Verschlusskrankheit eingesetzt. Es hemmt die Produktion von Sauerstoffradikalen durch PMNL sowie die Bildung von proinflammatorischen Zytokinen. In klinischer Erprobung konnte durch die systemische Anwendung von Pentoxiphyllin insbesondere die kardiopulmonale Dysfunktion im Rahmen des multiplen Organversagens bei Patienten mit Sepsis verbessert werden (113). In der vorliegenden Untersuchung wurde durch das Methylxanthin eine signifikante Reduktion der Sauerstoffradikalproduktion emigrierter polymorphkerniger Leukozyten erzielt. Im Rahmen weiterer Studien könnte der Einfluß einer systemischen Anwendung von Pentoxiphyllin auf die Prognose von Patienten mit Peritonitis evaluiert werden. Zudem wäre zu analysieren, ob durch die Abnahme der systemischen Hyperinflammation eine Zunahme der lokalen intraabdominalen Abwehr erreicht werden kann.



## 5 Zusammenfassung

Die Peritonitis bezeichnet eine durch Bakterien oder chemische Noxen ausgelöste Entzündung des Peritoneums. Entwickelt sich aus der lokalisierten Entzündung der Bauchhöhle durch Abstrom bakterieller Bestandteile in die systemische Zirkulation eine generalisierte Sepsis mit multiplem Organversagen, beträgt die Letalität trotz chirurgischer Herdsanierung, intensivmedizinischer Betreuung und potenter Antibiotikatherapie 20-50%.

Eine entscheidende Rolle in der Abwehr der Peritonitis tragen polymorphkernige Leukozyten. PMNL werden bei einer Infektion der Abdominalhöhle durch chemotaktile Botenstoffe zum Fokus gelockt und tragen durch Phagozytose der Bakterien und Sauerstoffradikalproduktion entscheidend zur Elimination der Mikroorganismen bei. Viele Untersuchungen weisen jedoch auch darauf hin, daß überschießend aktivierte zirkulierende PMNL für die Pathologie des septischen multiplen Organversagens mitverantwortlich sind.

Die vorliegende Studie dient der Charakterisierung der Sauerstoffradikalproduktion emigrierter und zirkulierender PMNL bei Patienten mit sekundärer Peritonitis. Hierfür wurde mit Hilfe der luzigenin- bzw. luminolverstärkten Chemilumineszenz die extra- sowie intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion polymorphkerniger Leukozyten bestimmt. Dabei wurde die Sauerstoffradikalproduktion von Patienten mit unkompliziertem Verlauf einer Peritonitis mit der der Peritonitispatienten mit systemischen Komplikationen (septischer Schock, multiples Organversagen) verglichen. Acht Patienten nach abdominalchirurgischer Operation ohne Infektion dienten als Kontrollen.

Eine Aktivierung der extrazellulären und intrazellulären Sauerstoffradikalproduktion polymorphkerniger Leukozyten war durch rezeptorabhängige und rezeptor-unabhängige Stimuli möglich. Bei Patienten nach abdominalchirurgischer Operation ohne Infektion war die Sauerstoffradikalproduktion der in die Bauchhöhle emigrierten PMNL höher als die zirkulierender PMNL. Auch bei Patienten mit einer

unkomplizierten Peritonitis war die Sauerstoffradikalproduktion der intraabdominalen Granulozyten stärker aktivierbar als die der zPMNL.

Im Gegensatz hierzu war jedoch bei Peritonitispatienten mit systemischen Komplikationen die extrazelluläre sowie auch die intrazelluläre Sauerstoffradikalproduktion emigrierter, intraabdominaler PMNL reduziert. Die stimulierte Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL war bei Patienten mit schwerer Peritonitis hochgradig aktivierbar und übertraf die der emigrierten PMNL.

Die hohe Sauerstoffradikalproduktion zirkulierender PMNL bei Patienten mit kompliziertem Verlauf einer Peritonitis verbunden mit einer erniedrigten Sauerstoffradikalproduktion emigrierter polymorphkerniger Leukozyten sprechen für eine überaus starke systemische Aktivierung der Leukozyten. Dagegen scheint die lokale Abwehr im Rahmen einer schweren Peritonitis supprimiert. Die bei der vorliegenden Untersuchung erfaßten hohen intraabdominalen Zytokinkonzentrationen könnten für eine Deaktivierung emigrierter Leukozyten verantwortlich sein. Zudem könnte die systemische Hyperinflammation polymorphkerniger Leukozyten mit einer vorzeitigen Einleitung der Apoptose und konsekutiver lokaler Immunparalyse verbunden sein.

Wenig ist bis heute über die Modulierbarkeit emigrierter, intraabdominaler polymorphkerniger Leukozyten durch antiinflammatorische Substanzen bekannt. Daher wurde in der vorliegenden Untersuchung die Suppression der Sauerstoffradikalproduktion emigrierter polymorphkerniger Leukozyten durch verschiedene antiinflammatorische Substanzen erprobt. Der Einfluß dieser Substanzen auf die Phagozytoseaktivität emigrierter PMNL wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie evaluiert.

Chloramin, Buflomedilhydrochlorid und Pentoxiphyllin konnten die Sauerstoffradikalproduktion der emigrierten polymorphkernigen Leukozyten supprimieren, ohne die Phagozytosekapazität der Leukozyten zu beeinträchtigen.

## 6 LITERATUR

1. Bosscha K, van Vroonhoven TJMV, van der Werken C. Surgical management of severe secondary peritonitis. *Brit J Surg* 1999; 86: 1371-1377
2. Reith HB. Peritonitistherapie heute. *Langenbeck`s Arch Surg* 1997; 382, Suppl 1: 14-17
3. Seiler CA, Brügger L, Forssmann U, Baer HU, Büchler MW: Conservative surgical treatment of diffuse peritonitis. *Surgery* 2000; 127: 178-84
4. Grunau G, Heemken R, Hau T. Predictors of outcome in patients with postoperative intraabdominal infection. *Eur J Surg* 1996; 162: 619-625
5. Nyström PO, Bax R, Patchen Dellinger E, Dominioni L, Knaus WA, Meakins JL, Ohmann C, Solomkin JS, Wacha H, Wittmann DH. Proposed definitions for diagnosis, severity scoring, stratification, and outcome for trials on intraabdominal infection. *World J Surg* 1990; 14: 148-158
6. Wittmann DH, Schein M, Condon RE. Management of secondary peritonitis. *Ann Surg* 1996; 224: 10-18
7. Berger D, Buttenschoen K. Management of abdominal sepsis. *Langenbeck`s Arch Surg* 1998; 383: 35-43
8. Berger D, Beger HG. Pathophysiologische Grundlagen der Peritonitistherapie. *Der Chirurg* 1992; 63: 147-152
9. Nathens AB, Rotstein OD. Therapeutic options in peritonitis. *Surg Clin North America* 1994; 74: 3: 677-692
10. Koperna T, Schulz F. Relaparotomy in peritonitis: prognosis and treatment of patients with persisting intraabdominal infection. *World J Surg.* 2000; 24: 32-37
11. Bosscha K, Hulstaert PF, Visser MR, van Vroonhoven TJMV, van der Werken C. Open management of the abdomen and planned reoperations in severe bacterial peritonitis. *Eur J Surg* 2000; 166: 44-49
12. Hanisch E, Schmandra TC, Encke A. Surgical strategies – anastomosis or stoma, second look – when and why? *Langenbeck`s Arch Surg* 1999; 384: 239-242
13. Babior BM. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N Engl J Med* 1987; 298: 659-666
14. Matsukawa A, Yoshinaga M. Sequential generation of cytokines during the initiative phase of inflammation, with reference to neutrophils. *Inflamm Res* 1998; 47: 137-144

15. Wilson ME. Effects of bacterial endotoxins on neutrophil function. *Rev Inf Disease* 1985; 7: 404-418
16. Burger JA, Schöffel U, Sach M, Jacobs E, Kownatzki E, von Specht B, Farthmann EH. Effects of peritonitis exudates on chemotaxis and phagocytosis of human neutrophils. *Eur J Surg* 1995; 161: 647-653
17. Nussler AK, Wittel UA, Nussler NC, Beger HG. Leukocytes, the janus cells in inflammatory disease. *Langenbeck`s Arch Surg* 1999; 384: 222-232
18. Lehrer RI, Ganz T, Selsted ME, Babior BM, Curmutte JT. Neutrophils and host defense. *Ann Int Med* 1988; 109: 127-142
19. Henson P. A complement to host defense. *Immunology* 1996; 383 (6595): 25-26
20. Arnaout MA. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood* 1990; 75: 1037-50
21. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989; 245: 1238-1241
22. Heel KA, Hall JC. Peritoneal defences and peritoneum-associated lymphoid tissue. *Brit J Surg* 1996; 83: 1031-1036
23. Southern PA, Powis G. Free radicals in medicine. *Chemical Nature and biologic reactions. Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-389
24. Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms: The production by leukocytes of superoxid, a potential bactericidal agent. *J Clin Invest* 1973; 52: 741-744
25. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *New England J Med* 1989; 320: 365-376
26. Billing AG, Jochum M, Fröhlich D, Cheronis JC, Fritz H. Oxidative autoaggression by phagocytes in human peritonitis. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 1030-1037
27. Jaeschke H, Smith CW. Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury. *J Leukoc Biology* 1997; 61: 647-653
28. Allen RC, Stjernholm RL, Steele RH. Evidence for the generation of an electronic excitation state in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1972; 47: 679-684

29. Cheson B, Christensen RL, Sperling R, Kohler B, Babior BM. The origin of chemiluminescence of phagocytosing granulocytes. *J Clin Invest* 1976; 58: 789-796
30. Kapp A, Zeck-Kapp G. Activation of the oxidative metabolism in human polymorphonuclear granulocytes: The role of immuno-modulating cytokines. *J Invest Dermatol* 1990; 95: 94-99
31. Ottonello L, Dapino P, Amelotti M, Barbera P, Arduino N, Bertolotto M, Dallegri F. Activation of neutrophil respiratory burst by cytokines and chemoattractants: Regulatory role of extracellular matrix glycoproteins. *Inflamm Res* 1998; 47:345-350
32. Fazeli A, Richards L. Chemiluminescence induced by phagocytosis of *Escherichia coli* by polymorphonuclear leukocytes. *J General Microbiology* 1984; 130: 2267-2275
33. Tighe D, Moss R, Boghossian S, Heath MF, Chessum B, Bennett ED. Multi-organ damage resulting from experimental faecal peritonitis. *Clinical Science* 1989; 76: 269-276
34. Powell RJ, Machiedo GW, Rush BF, Dikdan GS. Effect of oxygen-free radical scavengers on survival in sepsis. *Am Surgeon* 1991; 57: 86-88
35. Maleh HL, Gallin JI. Neutrophils in human diseases. *N Eng J Med* 1987; 317: 687-694
36. Rossignon MD, Khayat D, Royer C, Rouby JJ, Jacquillat C, Viars P. Functional and metabolic activity of polymorphonuclear leukocytes from patients with adult respiratory distress syndrome: Results of a randomized double-blind placebo-controlled study on the activity of prostaglandin E<sub>1</sub>. *Anesthesiology* 1990; 72: 276-281
37. Riché F, Cholley BP, Panis YH, Laisné MJC, Briard CG, Graulet AM, Guéris JL, Valleur PD. Inflammatory cytokine response in patients with septic shock secondary to generalized peritonitis. *Crit Care Med* 2000; 28: 433-437
38. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Cytokine signaling – regulation of the immune response in normal and critically ill states. *Crit Care Med* 2000; 28: N3-N12
39. Holzheimer RG, Schein M, Wittmann DH. Inflammatory response in peritoneal exudate and plasma of patients undergoing planned relaparotomy for severe secondary peritonitis. *Arch Surg* 1995; 130: 1314-1319
40. Fröhlich D, Eiber RM, Jochum M, Billing A. Perioperative pattern of peritoneal interleukin 8, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and granulocyte elastase release in human secondary peritonitis. *Cytokine* 1997; 9: 288-292

41. Yee J, Giannas G, Kapadia B, Chartrand L, Christou NV. Exudative neutrophils: modulation of microbicidal function in the inflammatory microenvironment. *Arch Surg* 1994; 129: 99-105
42. Zimmerli W, Seligmann B, Gallin JI. Exudation primes human and guinea pig neutrophils for subsequent responsiveness to the chemotactic peptide N-formylmethionylleucylphenylalanine and increases complement component C3bi receptor expression. *J Clin Invest* 1986; 77: 925-933
43. Zimmerli W, Lew PD, Cohen HJ, Waldvogel FA. Comparative superoxide-generating system of granulocytes from blood and peritoneal exudates. *Inf Imm* 1984; 46: 625-630
44. Billing AG, Fröhlich D, Konecny G, Schildberg FW, Machleidt W. Local serum application: restoration of sufficient host defense in human peritonitis. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 28-35
45. Bruchelt G, Schmidt KH. Comparative studies on the oxidative process during phagocytosis measured by luminol-dependent chemiluminescence. *J Clin Chem Clin Biochem* 1984; 22: 1-13
46. Briheim G, Stendahl O, Dahlgren C. Intra- and extracellular events in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Inf Imm* 1984; 45: 1-5
47. Dahlgren C, Aniansson H, Magnusson KE. Pattern of formylmethionyl-leucyl-phenylalanine-induced luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence in human neutrophils. *Inf Imm* 1985; 47: 326-328
48. Gyllenhammer H. Effects of extracellular pH on neutrophil superoxid anion production, and chemiluminescence augmented with luminol, lucigenin or DMNH. *J Clin Lab Immunol* 1989; 28: 97-102
49. Webster RO, Zanolari B, Henson PM, aus 3. Neutrophil chemotaxis in response to surface-bound C5a. *Exp Cell Res* 1981; 129: 55-62
50. Mc Phail LC, Snyderman R. Activation of the respiratory burst enzyme in human polymorphonuclear leukocytes by chemoattractants and other soluble stimuli. Evidence that the same oxidase is activated by different transductional mechanisms. *J Clin Invest* 1983; 72: 192
51. Damerau BE, Grunefeld E, Vogt W. Aggregation of leukocytes induced by the complement-derived peptides C3a and C5a and by three synthetic formyl-methionyl peptides. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1980; 63: 159-169
52. Hetland G, Pfeifer PH, Hugli TE. Processing of C5a by human polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biology* 1998; 63: 456-462

53. Servant G, Weiner OD, Neptune ER, Sedat JW, Bourne HR. Dynamics of a chemoattractant receptor in living neutrophils during chemotaxis. *Mol Biol Cell* 1999; 10: 1163-1178
54. Kopprasch S, Gatzweiler A, Graessler J, Schröder HE.  $\beta$ -adrenergic modulation of FMLP- and zymosan-induced intracellular and extracellular oxidant production by polymorphonuclear leukocytes. *Mol Cell Biochem* 1997; 168: 133-139
55. Bei L, Hu T, Qian ZM, Shen X. Extracellular  $Ca^{2+}$  regulates the respiratory burst of human neutrophils. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1404: 475-483
56. Howard T, Wang D. Calcium ionophore, phorbol ester, and chemotactic peptide-induced cytoskeleton reorganization in human neutrophils. *J Clin Invest* 1987; 79: 1359-1364
57. Luchi M, Munford RS. Binding, internalization, and deacylation of bacterial lipopolysaccharide by human neutrophils. *J Immunol* 1993; 151: 959-969
58. Weersink AJL, van Kessel KPM, van der Tol ME, Verhoef J. Modulation of lipopolysaccharide binding to human granulocytes. *Immunology* 1994; 83: 617-623
59. Lynn WA. Anti-endotoxin therapeutic options for the treatment of sepsis. *J Antimicrobial Chemotherapy* 1998; 41: 71-80
60. Kapp A, Freudenberg M, Galanos C. Induction of human granulocyte chemiluminescence by bacterial lipopolysaccharides. *Inf Imm* 1987; 55: 758-761
61. Richter J, Gullberg U, Lantz M. TNF-induced superoxide anion production in adherent human neutrophils involves both the p55 and p75 TNF receptor. *J Immunol* 1995; 154: 4142-4149
62. Zeman K, Kantorski J, Paleolog EM, Feldmann M, Tchórzewski H. The role of receptors for tumor necrosis factor- $\alpha$  in the induction of human polymorphonuclear neutrophil chemiluminescence. *Immunol Lett* 1996; 53: 45-50
63. Nielson CP.  $\beta$ -adrenergic modulation of the polymorphonuclear leukocyte respiratory burst is dependent upon the mechanism of cell activation. *J Immunol* 1987; 139: 2392-2397
64. Takenawa T, Homma Y, Nagai Y. Role of calcium in phosphatidylinositol response and arachidonic acid release in formylated tripeptide or calcium ionophore A 23187-stimulated guinea pig neutrophils. *J Immunol* 1983; 130: 2849-2855

65. Masuda M, Komiyama Y, Murakami T, Murata K, Hasui M, Hirabayashi Y, Kobayashi Y. Difference in changes in membrane fluidity of polymorphonuclear leukocytes stimulated with phorbol myristate acetate and formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine: role of excited oxygen species. *J Leukoc Biol* 1990; 47: 105-110
66. Karlsson A, Nixon JB, Mc Phail LC. Phorbol myristate acetate induces neutrophil NADPH-oxidase activity by two separate signal transduction pathways: dependent or independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 396-402
67. Holzer K, Thiel M, Kreimeier U, Moritz S, Messmer K. Buflomedil hydrochloride reduces systemic activation of polymorphonuclear leukocytes during hyperdynamic endotoxemia. *Shock* 1998; 10: 335-342
68. Ogino T, Packer L, Maguire JJ. Neutrophil antioxidant capacity during the respiratory burst: loss of glutathione induced by chloramines. *Free Radical Biol Med* 1997; 23: 445-452
69. Marcinkiewicz J, Grabowska A, Bereta J, Stelmaszynska T. Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. *J Leukoc Biol* 1995; 58: 667-674
70. Tatsumi T, Fliss H. Hypochlorous acid and chloramines increase endothelial permeability. Possible involvement of cellular zinc. *Am J Physiol* 1994; 267: 1597-1607
71. Barnes CR, Mandell GL, Carper HT, Luong S, Sullivan GW. Adenosine modulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced neutrophil activation. *Biochem Pharmacol* 1995; 50: 1851-1857
72. Thiel M, Chouker A. Acting via A2 receptors, adenosine inhibits the production of tumor necrosis factor- $\alpha$  of endotoxin-stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *J Lab Clin Med* 1995; 126: 275-282
73. Firestein GS, Boyle D, Bullough DA, Gruber HE, Sajjadi FG, Montag A, Sambol B, Mullane KM. Protective effect of adenosine kinase inhibitor in septic shock. *J Immunol* 1994; 152: 5853-5859
74. Mandell GL. Cytokines, phagocytes, and pentoxifylline. *J Cardiovascular Pharmacology* 1995; 25: 20-22
75. Linder MM, Wacha H, Feldmann U, Wesch G, Streifensand RA, Gundlach E. Der Mannheimer Peritonitis-Index: Ein Instrument zur intraoperativen Prognose der Peritonitis. *Der Chirurg* 1987; 58: 84-92
76. Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13: 818-829



77. Koperna T, Schulz F. Prognosis and treatment of peritonitis: Do we need new scoring systems? *Arch Surg* 1996; 131:180-186
78. Bosscha K, Reijnders K, Hulstaert F, Algra A, van der Werken C. Prognostic scoring systems to predict outcome in peritonitis and intraabdominal sepsis. *Brit J Surg* 1997; 84: 1532-1534
79. Kato T, Wokalek H, Schopf E, Eggert H, Ernst M, Rietschel ET, Fischer H. Measurement of chemiluminescence in freshly drawn human blood. I: Role of granulocytes, platelets and plasma factors in zymosan-induced chemiluminescence. *Klin Wochenschrift* 1981; 59: 203-221
80. Mercer-Jones MA, Hadjiminias DJ, Heinzelmann M, Peyton J, Cook M, Cheadle WG. Continuous antibiotic treatment for experimental abdominal sepsis: effects on organ inflammatory cytokine expression and neutrophil sequestration. *Br J Surg* 1998; 85: 385-389
81. Schein M, Wittmann DH, Holzheimer R, Condon RE. Hypothesis: Compartmentalization of cytokines in intraabdominal infection. *Surgery* 1996; 119: 694-700
82. Sautner T, Göttinger P, Redl-Wenzel EM, Dittrich K, Felfernig M, Sporn P, Roth E, Függer R. Does reoperation for abdominal sepsis enhance the inflammatory host response? *Arch Surg* 1997; 132: 250-255
83. Zügel N, Siebeck M, Geissler B, Lichtwark-Aschoff M, Gippner-Steppert C, Witte J, Jochum M. Circulating mediators and organ function in patients undergoing planned vs conventional surgical therapy in severe secondary peritonitis. *Arch Surg* 2002; 137: 590-599
84. Schein M. Surgical management of intra-abdominal infection: is there an evidence? *Langenbecks Arch Surg* 2002; 387: 1-7
85. Palmer MA, Bornside GH, Nance FC. Sepsis-induced depression of phagocytosis in experimental canine peritonitis. *Am Surg* 1982; 48: 520-524
86. Dahlgren C, Karlsson A. Respiratory burst in human neutrophils. *J Immun Meth* 1999; 232:3-14
87. Schoeffel U, Jacobs E, Ruf G, Mierswa F, v Specht BU, Farthmann EH. Intraperitoneal microorganisms and the severity of peritonitis. *Eur J Surg* 1995; 161: 501-508
88. Junger W, Junger WG, Miller K, Bahrami S, Redl H, Schlag G, Moritz E. Early detection of anastomotic leaks after colorectal surgery by measuring endotoxin in the drainage fluid. *Hepato-Gastroenterology* 1996; 43: 1523-1529

89. Lau JYW, Lo SY, Enders KWN, Lee DWH, Lam YH, Chung SCS. A randomized comparison of acute phase response and endotoxemia in patients with perforated peptic ulcers receiving laparoscopic or open patch repair. *Am J Surg* 1998; 175: 325-327
90. Holzer K, Richter A, Henrich D, Wilhelm K, Encke A. Oxygen radical generation by emigrated, intra-abdominal, and circulating PMNLs during human secondary peritonitis. *Shock* 2001; 15: 90-94
91. Mori T, Masuda M, Takahashi H, Hioki K. Functional properties of circulating and transmigrated neutrophils in a rat peritonitis model. *Eur Surg Res* 2000; 32: 331-336
92. Elbim C, Reglier H, Fay M, Delarche C, Andrieu V, El Benna J, Gougerot-Pocidallo MA. Intracellular Pool of IL-10 receptors in specific granules of human neutrophils: Differential mobilization by proinflammatory mediators. *J Immun* 2001; 166: 5201-5207
93. Chernoff AE, Granowitz EV, Shapiro L, Vannier E, Lonnemann G, Angel JB, Kennedy JS, Rabson AR, Wolff SM, Dinarello CA. A randomized, controlled trial of IL-10 in humans. *J Immunology* 1995; 154: 5492-5499
95. Kashara Y, Iwai K, Yachie A, Ohta K, Konno A, Seki H, Miyawaki T, Taniguchi N. Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood* 1997; 89: 1748-1754
95. Lundqvist-Gustafsson H, Bengtsson T. Activation of the granule pool of the NADPH oxidase accelerates apoptosis in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 1999; 65: 196-204
96. Yamashita K, Takahashi A, Kobayashi S, Hirata H, Mesner PW, Kaufmann SH, Yonehara S, Yamamoto K, Uchiyama T, Sasada M. Caspases mediate tumor-nekrosis factor- $\alpha$ -induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. *Blood* 1999; 93: 674-685
97. Delogu G, Moretti S, Famularo G, Antonucci A, Signore L, Marcellini S, Lo Bosco L, De Simone C. Circulating neutrophils exhibit enhanced apoptosis associated with mitochondrial dysfunctions after surgery under general anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001; 45: 87-94
98. Buttgereit F, Burmester GR, Brand MD. Bioenergetics of immune functions: fundamental and therapeutic aspects. *Immunol Today* 2000; 21: 192-198
99. Matsuda T, Saito H, Inoue T, Fukatsu K, Lin MT, Han I, Furukawa S, Ikeda S, Muto T. Ratio of bacteria to polymorphonuclear neutrophils (PMNs) determines PMN fate. *Shock* 1999; 12:365-372
100. Kapp A, Freudenberg M, Galanos C. Induction of human granulocyte chemiluminescence by bacterial lipopolysaccharides. *Inf Imm* 1987; 55: 758-761

101. Pédrón T, Girard R, Chaby R. Down-modulation of L-selectin by lipopolysaccharide is not required for lipopolysaccharide-induced expression of CD 14 in mouse bone marrow granulocytes. *Inf Imm* 2001; 69: 4287-4294
102. Tominaga K, Saito S, Matsuura M, Nakano M. Lipopolysaccharide tolerance in murine peritoneal macrophages induces downregulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway through mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-KB cascades, but not lipopolysaccharide-incorporation steps. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1450: 130-144
103. Opal S, Palardy JE, Marra MN, McKelligon BM, Scott RW. Relative concentrations of endotoxin-binding proteins in body fluids during infection. *Lancet* 1994; 344: 429-431
104. Theron AJ, Steenkamp KJ, Anderson R. NADPH-oxidase activity of stimulated neutrophils is markedly increased by serum. *Inflammation* 1994; 18: 459-467
105. Porteu F, Hieblot C. Tumor necrosis factor induces a selective shedding of its p75 receptor from human neutrophils. *J Biol Chem* 1994; 269: 2834-2840
106. Schleiffenbaum et al. The tumor necrosis factor receptor and human neutrophil function. Deactivation and cross-deactivation of tumor necrosis factor-induced neutrophil responses by receptor downregulation. *J Clin Invest* 1990; 86: 184-195
107. Holzer K, Richter A, Henrich D, Wilhelm K, Encke A. Oxygen radical production of emigrated and circulating polymorphonuclear leukocytes during secondary peritonitis. 5<sup>th</sup> World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis. Editor: Eugen Faist. Monduzzi Editore. International Proceedings Division 2000; 593-597
108. Holzer K, Konietzny P, Wilhelm K, Encke A, Henrich D. Phagocytosis by emigrated, intraabdominal neutrophils is depressed during human secondary peritonitis. *Eur Surg Res* 2002; 34: 275-284
109. Lam C, Schulz F, Laber G, Schütze E. Opsonic activity of the alternative complement pathway in infected human intra-abdominal fluid. *Infection* 1985; 1: 8-11
110. Bagby G, Plessala KJ, Wilson LA, Thompson JJ, Nelson S. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor- $\alpha$  in intravascular and peritonitis models of sepsis. *J Inf Disease* 1991; 163: 83-88
111. The Interleukin-1-Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Crit Care Med* 1997; 25: 1115-1124

112. van Westreenen M, Mul FJP, Pronk A, von Papendrecht AAGMH, Diepersloot RJA, Roos D, Leguit P. Influence of perioperative lavage solutions on peritoneal defence mechanisms in vitro. *Eur J Surg* 1999; 165: 1066-1071
113. Staubach KH, Schröder J, Stüber F, Gehrke K, Traumann E, Zabel P. Effect of pentoxifylline in severe sepsis. *Arch Surg* 1998; 133: 94-100

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. A. Encke danke ich herzlich für die Überlassung des Themas sowie für die großzügige Unterstützung in der Planung und Durchführung meines Praktischen Jahres im Fach Chirurgie in den USA.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. med. K. Holzer für ihren unermüdlichen Einsatz in der Betreuung meiner Arbeit. Während der intensiven Zusammenarbeit hat ihre große Diskussionsbereitschaft sowie ihr persönliches Engagement ganz wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen. Durch sie habe ich die Grundzüge wissenschaftlichen Arbeitens erlernt. Zudem hat sie mich in der Realisation meiner beruflichen Pläne nach Kräften unterstützt.

Frau K. Wilhelm danke ich recht herzlich für die große Hilfsbereitschaft im Anlernen der Methodik und Unterstützung in der Durchführung der Experimente. Bei Dr. D. Henrich möchte ich mich für die wertvollen Anregungsvorschläge sowie die Anleitung der Durchflußzytometrie bedanken. Die vielen Stunden der gemeinsamen Arbeit haben mir sehr viel Freude bereitet.

Für die freundliche Bereitstellung der für die Chemilumineszenzmessung benötigten Geräte danke ich den Mitarbeitern des dermatologischen Labors der Universitätsklinik Frankfurt unter der Leitung von PD Dr. med. Th. Zollner.

Zuletzt möchte ich mich besonders bei meiner Familie sowie bei Dr. D. Briem für die fortwährende Unterstützung in der Fertigstellung meiner Arbeit bedanken.

## **EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre, daß ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

**Untersuchungen zur Sauerstoffradikalproduktion  
emigrierter und zirkulierender polymorphkerniger  
Leukozyten bei Patienten mit sekundärer Peritonitis**

im Zentrum der Chirurgie, Klinik für Allgemein- und Gefäßchirurgie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. A. Encke mit Unterstützung durch Frau PD Dr. med. K. Holzer ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Shock 2001; 15: 90-94

Hamburg, 16.12.02

A. Richter

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name : Andrea Richter  
Geburtsdatum : 31.12.1974  
Geburtsort : Hanau

## Schulbildung

1981-1985 Geschwister-Scholl-Grundschule Hanau  
1985-1987 Förderstufe der Eppsteinschule Hanau  
1987-1994 Karl-Rehbein-Gymnasium Hanau  
Abitur im Juni 1994

## Hochschulausbildung

10/94 – 05/01 Studium der Humanmedizin an der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt  
08/97 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note gut)  
04/00 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note gut)  
04/00 – 03/01 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Frankfurt und  
dem Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York  
05/01 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note sehr gut)

## Beruflicher Werdegang

Seit 08/01 Ärztin im Praktikum  
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin,  
Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf

Hamburg, 16.12.02

A. Richter