

Universität Ulm  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
Ärztlicher Direktor: Herr Prof. Dr. S. Stenger,  
Sektion Klinikhygiene,  
ehemaliger Leiter: Herr Prof. Dr. M. Trautmann

---

**Einfluss von Moxifloxacin auf die Endotoxinfreisetzung  
von Escherichia coli und Bacteroides fragilis  
im Vergleich zu anderen Antibiotika**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Vorgelegt von Cordula Scheibe  
aus Essen-Werden

Ulm im Jahre 2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Trautmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Manfred Weiß

Tag der Promotion: 25.Juni 2010

„Wenn der Körper innerlich heiß  
und außen kalt ist,  
dann verläuft die Krankheit tödlich“,  
so beschrieb bereits Hippokrates  
den Verlauf einer Sepsis.

Für meinen Papa

# Inhaltsverzeichnis

<b>0.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Sepsis	1
1.2	Pathophysiologie der Sepsis	2
1.3	Struktur des Endotoxins	4
1.4	Therapie der Sepsis	5
1.5	Antibiotikatherapie und septischer Schock	6
1.5	Fragestellung der Arbeit	12
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Antibiotika	14
2.2	Bakterien	14
2.3	Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	16
2.4	Wachstumsversuch	19
2.5	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	21
2.6	Chromogener LAL-Test	24
2.7	Zellkultur und Zytokinbestimmung	27
2.8	Phasenkontrastdarstellung	30
2.9	Statistik	31
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1	Minimale Hemmkonzentration (MHK)	33
3.2	Abtötungskinetik der Antibiotika	34

---

3.3	Ergebnisse - ELISA	41
3.4	Ergebnisse - Chromogener LAL-Test	52
3.5	Ergebnisse - Zytokinbestimmungen	62
3.6	Ergebnisse - Phasenkontrastdarstellung	76
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>78</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	<b>114</b>
7.1	Material	114
7.2	Statistik	120
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>133</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>134</b>

## 0. Abkürzungsverzeichnis

a. P.	alkalische Phosphatase
AK	Antikörper
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
B. fragilis	Bacteroides fragilis
CD 14	cluster determinant 14, spezifisches Oberflächenantigen von Lymphozyten
E. coli	Escherichia coli Stamm Bortolussi
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	et alii, und Mitarbeiter
EU	Endotoxin-Units
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunden(n)
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IL-1 $\beta$	Interleukin -1 $\beta$
KBE	koloniebildende Einheiten
L	Liter
LAL	Limulus-Amöbozyten-Lysat
log	Logarithmus
log-Phase	logarithmische Phase
LPS	Lipopolysaccharid
M	molare Lösung
mAb	monoklonaler Antikörper
mg	Milligramm
MHB	Mueller-Hinton-Bouillon
MHK	minimale Hemmkonzentration
min	Minute(n)
ml	Milliliter
N	normale Lösung

---

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
p	p-Wert, Überschreitungswahrscheinlichkeit
PBP	penicillinbildendes Protein
PBS	phosphate-buffered saline = 7-Komponenten-Puffer für ELISA
pg	Pikogramm
SD	Standardabweichung
TH-1	T-Helfer-1-Zellen
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
WHO	Weltgesundheitsorganisation
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

## 1. Einleitung

### 1.1 Sepsis

Als Sepsis wird ein lebensbedrohliches Krankheitsbild verstanden, welches von einer zunächst lokalen Infektion ausgeht und zu Organdysfunktionen sowie Störung der Hämodynamik und Blutgerinnung führen kann. Da nicht nur Infektionen, sondern auch schwere Traumata, Pankreatitis und hämorrhagischer Schock ein solches Krankheitsbild auslösen, wird auch von „Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)“ gesprochen. Der Begriff SIRS bei bestätigter oder wahrscheinlicher Infektionsursache wird synonym mit dem Begriff der Sepsis verwendet.

Bei 0,5 bis 3% der Krankenhauspatienten, je nach klinischer Fachrichtung, kann die Diagnose einer Sepsis gestellt werden. Bezogen auf die US-amerikanische Bevölkerung waren es 1979 70 Fälle pro 100.000 Einwohner, 1987 bereits 180 Sepsis-Fälle pro 100.000 Einwohner. Mittlerweile liegen die in den USA erhobenen und für Deutschland geschätzten Zahlen zur Inzidenz der Sepsis bei 150 bis 300 Fälle pro 100.000 Einwohner im Jahr. Dabei fällt auf, dass die Sepsisinzidenz in der gleichen Größenordnung oder deutlich höher liegt als beispielsweise die Inzidenz von AIDS (17/100.000 Einwohner pro Jahr), von Brustkrebs (112/100.000 Einwohner pro Jahr), von Kolon- und Rektumkarzinomen (48/100.000 Einwohner pro Jahr) oder von der Herzinsuffizienz (196/100.000 Einwohner pro Jahr) [4, 7, 36, 87, 98].

Leitkeime der Sepsis sind *Staphylococcus aureus* (insbesondere nach abszedierenden Infektionen) und *E. coli* (bei Urosepsis, cholangiogener Sepsis) [87]. Diese Spezies werden jeweils in 15 bis 20% aller Blutkulturen nachgewiesen. Die Letalität der Sepsis liegt bei 20-30% [17]. Die Prognose verschlechtert sich bei Leukopenie, Hypogammaglobulinämie, Diabetes mellitus, Alkoholismus, Nierenversagen, Schocklunge oder hohem Alter. Die Sterblichkeitsrate dieser genannten Risikogruppen bei einer Sepsis beläuft sich heutzutage auf nahezu 50% [17]. Dreiviertel der Todesfälle an septischem Schock treten innerhalb von wenigen Stunden bis zu wenigen Tagen nach dem Entstehen des Schocks auf und sind meist auf einen therapierefraktären Blutdruckabfall zurückzuführen. Ein Viertel der Todesfälle sind vermutlich Folge des multiplen Organversagens.

## 1.2 Pathophysiologie der Sepsis

Auslöser des septischen Schocks sind Bestandteile von Mikroorganismen, die in die Blutbahn eingeschwemmt werden. Diese Bestandteile bewirken eine Überreaktion von Zellen des Immunsystems mit massiver Ausschüttung von Zytokinen, die ihrerseits in verschiedene Regulationskaskaden eingreifen und vielfältige Symptome des septischen Schocks hervorrufen können. Am besten verstanden sind die pathophysiologischen Vorgänge, die im Rahmen eines septischen Schocks durch gram-negative Bakterien entstehen. Diese Vorgänge sollen auch in der vorliegenden Arbeit genauer beleuchtet werden.

Ursache des Schocks sind Endotoxine, Lipopolysaccharide (LPS) der bakteriellen Zellmembran, die direkte und indirekte Effekte im menschlichen Organismus auslösen [1, 12, 14, 24, 28, 48- 53, 58, 64, 80, 85, 98, 99, 121, 129, 130, 139].

Direkt durch LPS aktiviert wird das Gerinnungs- und Komplementsystem. Außerdem ist LPS in der Lage, in humanen T-Zellen direkt die Produktion der TH-1-typischen Zytokine  $\gamma$ -Interferon und Interleukin-2 anzuregen [53].

Auf zellulärer Ebene kann an LPS-Bindungsprotein (lipopolysaccharid-binding protein) gebundenes LPS an CD 14-Oberflächenantigene monozytärer Zellen binden, mit dem Toll-like-4 Rezeptor interagieren und dadurch den CD 14-Signaltransduktionsweg in diesen Zellen aktivieren [53]. Durch diese Aktivierung wird der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B hochreguliert [136, 138]. Dies ruft eine verstärkte Produktion der proinflammatorischen Interleukine 1, 6 und 8 sowie TNF $\alpha$  hervor. Über die genannten Mediatoren erfolgt die indirekte Wirkung des Endotoxins, wobei von allen bisher identifizierten, an der Entstehung des gram-negativen Sepsis-Syndroms beteiligten Mediatoren TNF $\alpha$  der wirkungsvollste zu sein scheint [82, 89, 140].

Verursacht durch die direkten und indirekten Interaktionen des Endotoxins kommt es zu den typischen klinischen Symptomen des Schocks, verbunden mit zusätzlichen Zeichen der Allgemeininfektion, wie hohes Fieber oder Schüttelfrost. Die Frühphase des septischen Schocks ist gekennzeichnet durch eine hyperdynamische Reaktion des Körpers mit gesteigertem Herzminutenvolumen, Tachykardie, erniedrigtem peripherem Gefäßwiderstand, zunächst normalem, später erniedrigtem arteriellem Blutdruck, Hyperventilation und beginnender respiratorischer Insuffizienz. Im weiteren Verlauf kann dieser Zustand in eine hypodynamische Form übergehen, die

durch erniedrigtes Herzminutenvolumen, hohen peripheren Gefäßwiderstand, niedrigen arteriellen Blutdruck, Verbrauchskoagulopathie, akutes Nierenversagen und akute respiratorische Insuffizienz gekennzeichnet ist.

In folgender Abbildung ist das Sepsisgeschehen, hervorgerufen durch Endotoxin gram-negativer Bakterien, schematisch dargestellt.

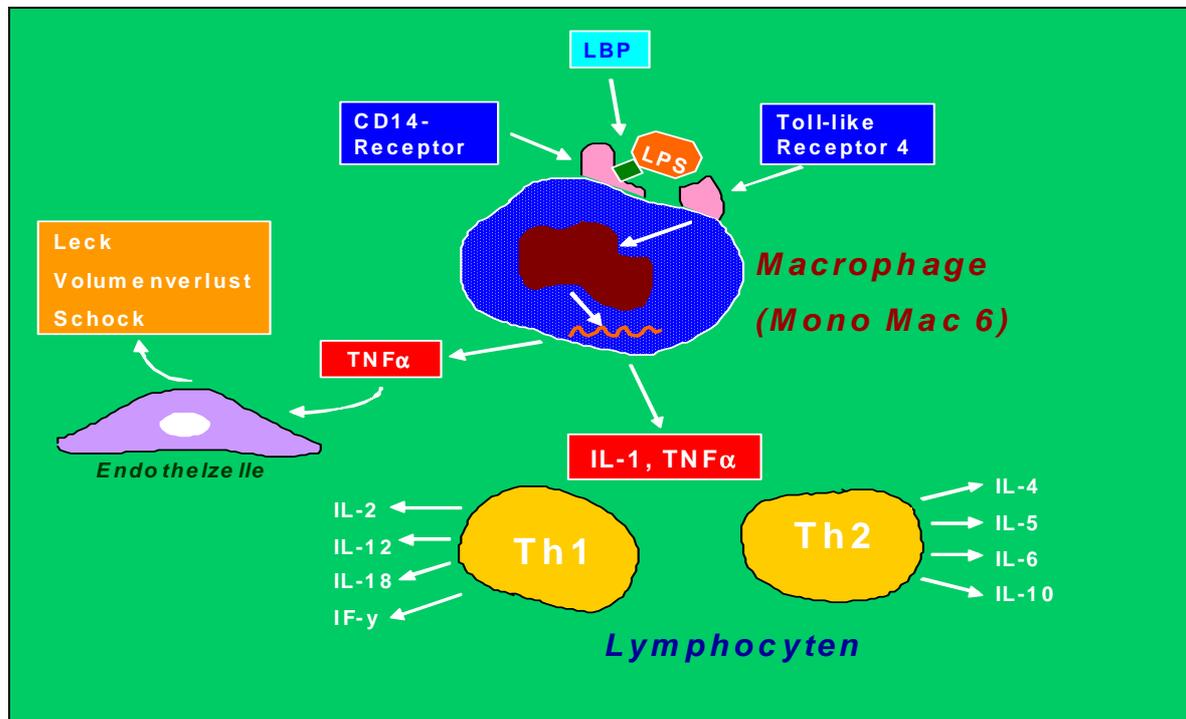


Abbildung 1: Endotoxin-Wirkungsmechanismus, Schema der Lipopolysaccharid-Interaktion mit menschlichen Monozyten. Lipopolysaccharid bindet an die Zelloberfläche mithilfe von Lipopolysaccharid-binding-protein über den cluster determinant 14-Rezeptor. Die Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktionskaskade erfolgt über den Toll-like 4-Rezeptor.

Ein klinischer Prototyp ist das **Waterhouse-Friderichsen-Syndrom**. Dieses tritt bei der fulminant verlaufenden Meningokokken-Meningitis oder -Sepsis auf, die dann mit massiven Hämorrhagien und Nekrosen der Haut, sowie der inneren Organe (bevorzugt der Nebennierenrinde) einhergeht. Sie kann innerhalb weniger Stunden nach Auftreten erster Symptome tödlich enden.

Die Pathophysiologie des Schocks wäre jedoch unvollständig dargestellt, wenn man nicht gleichzeitig die direkten mikrobiell verursachten Komplikationen bedenken würde. Eine mit der Sepsis verbundene kontinuierliche oder intermittierende, vom Sepsisherde ausgehende Bakteriämie gefährdet den Patienten durch mögliche

Ausbildung septisch-metastatischer Herde; als Beispiele zu nennen wären ein Hirnabzeß mit fokal-neurologischen Störungen wie Krampfanfällen, eine Endokarditis mit Klappenzerstörung oder eine Osteomyelitis mit Knochenzerstörung.

### 1.3 Struktur des Endotoxins

Die Zellwand gram-negativer Bakterien zeigt einen mehrschichtigen Aufbau. Grundgerüst dieser komplexen Zellwand ist eine Mureinschicht (Peptidoglykan, Glykopolymer), deren beide Bausteine N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure  $\beta$ -(1-4) glykosidisch miteinander verbunden sind. Die jeweils neben- oder übereinander liegenden Mureinketten werden durch Peptide gekoppelt. Dieser Mureinschicht ist eine äußere Lipidmembran aufgelagert, die aus zwei Schichten, der inneren Phospholipidschicht und der medizinisch wichtigen äußeren Lipopolysaccharidschicht besteht [110, 116].

Folgende Abbildung zeigt diese Feinstruktur der bakteriellen Zellwand:

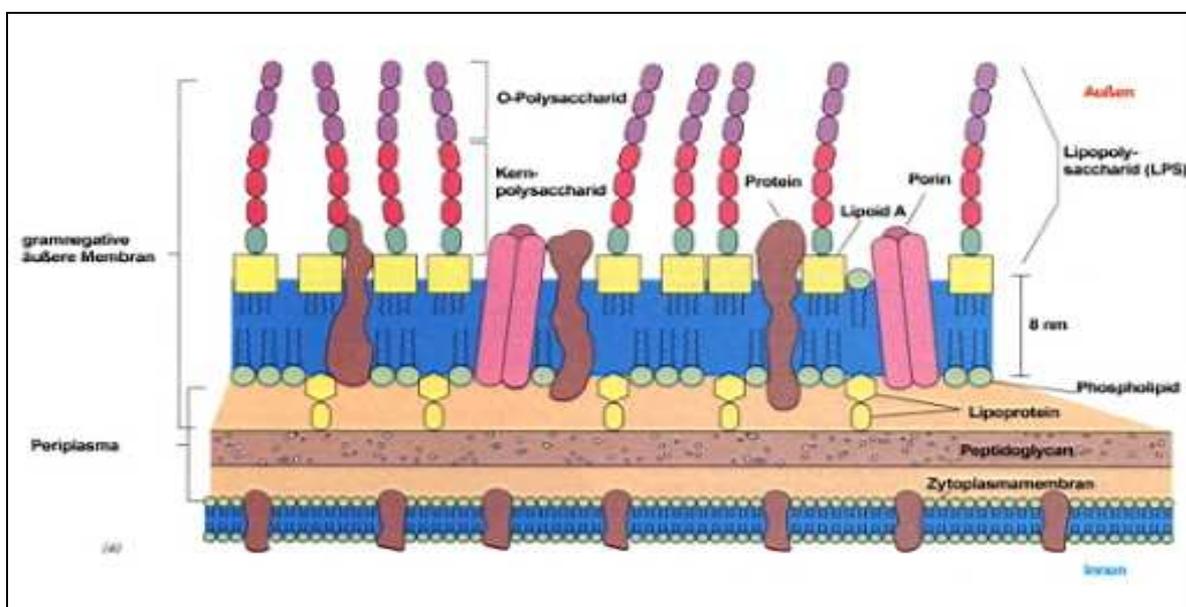


Abbildung 2: Feinstruktur der Zellwand eines gram-negativen Bakteriums [19]

Das Lipopolysaccharid (LPS) lässt sich in 3 Bereiche gliedern: die O-spezifischen Polysaccharidkette (O-Antigen), das Kernpolysaccharid (Kern) und das Lipid A (Lipid A).

Diese LPS-Struktur ist in der nachfolgenden Abbildung schematisiert:

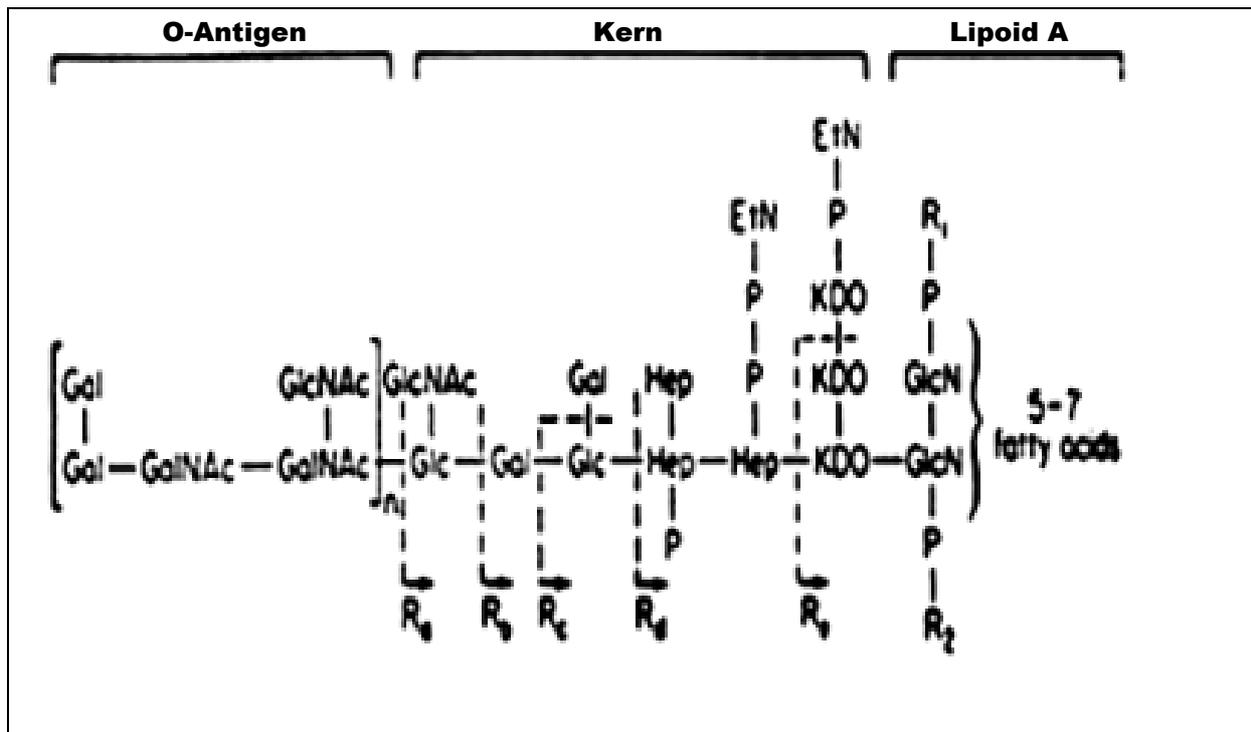


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Lipopolysaccharid-Aufbaus gram-negativer Bakterien

Über Lipoid A ist das LPS-Molekül in der bakteriellen Zellmembran verankert. Innerhalb vieler gram-negativer Bakterienspezies zeigt das Lipoid A-Molekül einen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau. Das Lipoid A ist für die toxische Wirkung des Endotoxins verantwortlich [75, 92, 107, 141].

An das Lipoid A schließt sich nach außen die Kernzone an. Dieser Teil des LPS-Moleküls ist wenig variabel und unterscheidet sich allgemein nicht innerhalb der verschiedenen Spezies einer Gattung. Nach außen hin folgt auf die Kernzone die O-spezifische Seitenkette (O-Antigen). Die O-spezifische Seitenkette ist für jeden O-Serotyp charakteristisch und einzigartig.

## 1.4 Therapie der Sepsis

In der Sepsistherapie wird zwischen den kausalen antimikrobiellen und den operativ-interventionellen Maßnahmen zur Herdsanierung, den supportiven intensivmedizinischen sowie den adjuvanten therapeutischen Ansätzen

unterschieden. Adjuvante Therapieverfahren sind Maßnahmen, die zusätzlich und parallel zur Standardtherapie einer Erkrankung angewendet werden.

Die Grundsäule der Sepsistherapie besteht in der gezielten antimikrobiellen Therapie des Erregers, kombiniert mit einer – wenn immer möglich – chirurgischen oder durch bildgebende Verfahren gesteuerten, interventionellen Herdsanierung. Die antibakterielle Chemotherapie sollte frühzeitig, effektiv und so gezielt wie möglich erfolgen. Um eine rasche Anflutung der Wirkstoffe zu erreichen und wegen der Unsicherheit einer enteralen Resorption unter dem Bild eines septischen Schocks, müssen die Antibiotika parenteral verabreicht werden. Eine hohe therapeutische Sicherheit wird mit einem Breitspektrumantibiotikum erreicht.

In folgender Abbildung ist das therapeutische Vorgehen im Falle einer Sepsis, bzw. septischen Schocks zusammenfassend graphisch skizziert [65, 106, 131].

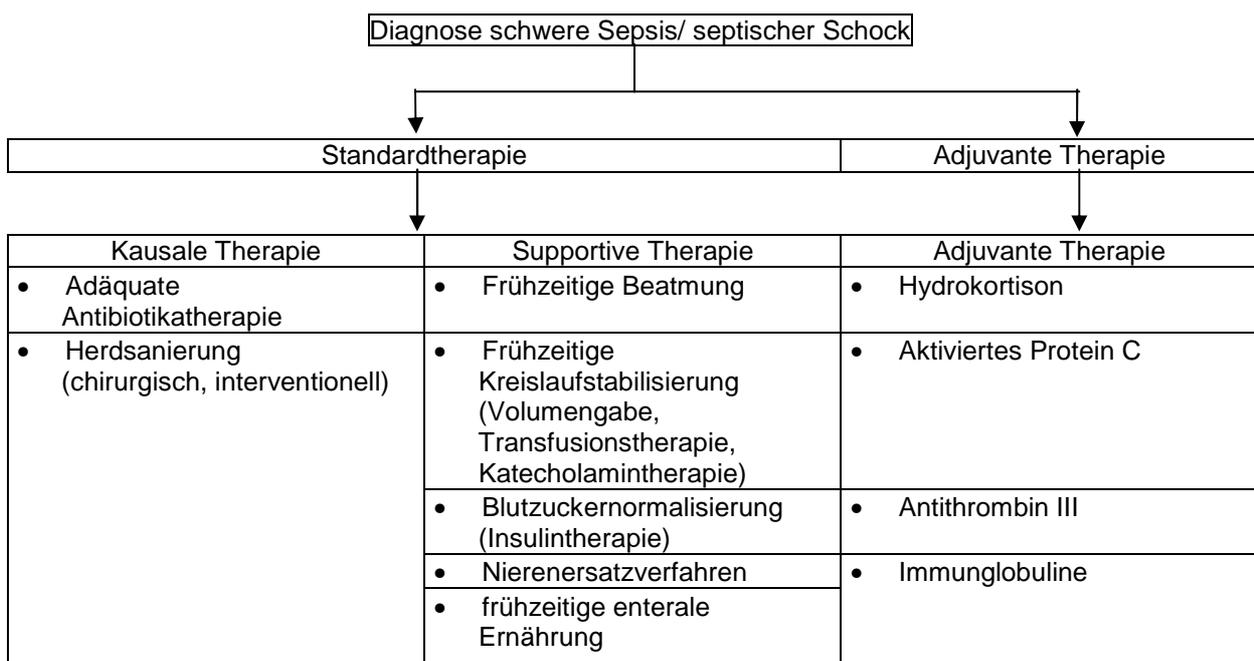


Abbildung 4: Therapieregime der Sepsis

### 1.5 Antibiotikatherapie und septischer Schock

Antibiotika dienen der Behandlung von Infektionskrankheiten. Die ersten Antibiotika entstammten natürlichen Quellen und besaßen in der Regel ein enges Wirkspektrum. Heute werden Designer-Medikamente speziell für einzelne Problembereiche in der

Infektiologie entwickelt. Zur Infektionsbekämpfung ist eine antibiotische Behandlung unabdingbar, jedoch mit Nebenwirkungen verbunden.

So besteht eine Nebenwirkung in der Reduktion der Normalflora und dem Überwuchern resistenter Keimarten der Standortflora sowie der Kolonisierung mit fakultativ-pathogenen Keimen. Auf diese Weise kann zum Beispiel die pseudomembranöse Colitis durch *Clostridium difficile* hervorgerufen werden.

Als weitere wichtige Nebenwirkung ist bei gram-negativen Erregern die antibiotika-induzierte Freisetzung von Endotoxin und die damit verbundene Beteiligung an der Entstehung des septischen Schocks zu nennen. Dies wurde in zahlreichen Studien bestätigt [1, 12, 28, 46, 50, 62, 70, 80, 85, 98, 99, 103, 114, 121, 129, 130].

Dieses Phänomen ist als Jarisch-Herxheimer-Reaktion oder Herxheimer-ähnliche Reaktionen beschrieben [42, 45, 46, 73].

Darunter versteht man das Auftreten von Fieber, Schüttelfrost, Schweißausbruch, Tachykardie und eventuell akuter Niereninsuffizienz kurz nach Beginn einer Antibiotikatherapie. In schweren Fällen kann es zum Vollbild des Schocks kommen. Pathogenetisch zugrunde liegt die, durch die Antibiotikawirkung, einsetzende Bakteriolyse mit starker Anflutung von Endotoxin gram-negativer Bakterien, was mit einer großen Mediatorfreisetzung einhergeht. Zuerst wurde diese Reaktion in der Therapie klassischer Infektionskrankheiten wie Typhus abdominalis und Lues in den 40er Jahren beschrieben [73]. Eine ähnliche Reaktion kann auch in der Therapie von schweren Pneumokokkeninfektionen, vor allem bei Säuglingen, auftreten.

Später, um 1985, konnte erstmals durch Shenep et al. gezeigt werden, dass das Ausmaß der Endotoxinliberation in Abhängigkeit von der verwendeten Antibiotikaklasse variiert [115].

So liberieren Antibiotika, die Interaktionen mit der Bakterien-Zellwand eingehen, besonders große Mengen Endotoxin, wirken also besonders stark im Sinne der oben beschriebenen Herxheimer-Reaktion. Ein typisches Beispiel ist hier das Penicillin, ein  $\beta$ -Lactam-Antibiotikum. Vergleichsweise geringer ist dagegen die Endotoxinliberation von Antibiotika, die beispielsweise in die Proteinbiosynthese, wie Aminoglykoside, oder in die Nucleinsäuresynthese, wie Ciprofloxacin aus der Gruppe der Fluorochinolone, eingreifen [113, 123].

Neueste Erkenntnisse zeigten nun auch Unterschiede in der Endotoxinfreisetzung innerhalb der Gruppe oben genannter, zellwand-aktiver Antibiotika. Die Ursache dieser Unterschiede scheint am besten erklärt durch differierende Angriffspunkte an

sensiblen Stellen der Bakterien-Zytoplasmamembran. Diese sensiblen Stellen entsprechen einem Enzymsystem, den Transpeptidasen, an denen die  $\beta$ -Lactam-Antibiotika binden, daher auch Penicillinbindende-Proteine (PBP) genannt. Es folgt eine Störung des Zellwandaufbaus mit dem resultierenden Unterschied in der Morphologie der Keime. Diese kann einerseits filamentös sein mit einer großen Biomasse, die bei der Zellyse folglich auch hohe Mengen an Endotoxin freisetzt. Andererseits können sich rundliche Formen bilden, Sphäroplasten genannt, die aufgrund ihrer geringen Zelloberfläche wenig Endotoxin liberieren [18, 21, 39, 43, 63, 70, 71, 123, 124, 125].

Jedes Bakterium hat mehrere verschiedene solcher PBP, bei *E. coli* sind z.B. 6 bekannt. Wenn z.B. PBP 2 behindert wird, runden sich die Stäbchen ab und sehen aus wie Kokken, wenn dagegen PBP 3 gehemmt wird, unterbleibt die Bildung von Septen; die Einzelzellen trennen sich nicht mehr und es entstehen filamentöse, mehrzellige Verbände.

Die beschriebenen Unterschiede bezüglich der Endotoxinfreisetzung innerhalb der zellwand-aktiven Antibiotika wurde an zwei typischen Vertretern dieser Gruppe, dem Carbapenem Imipenem und dem Cephalosporin Ceftazidim schon mehrfach untersucht. Hierbei hatte sich gezeigt, dass Imipenem zur Bildung von Sphäroplasten führt und geringe Mengen an LPS liberiert. Ceftazidim hingegen induziert eine filamentöse Zellformation mit hoher LPS-Liberation [37, 60, 96, 100].

Das in dieser Arbeit eingesetzte Imipenem ist ein Carbapenem-Antibiotikum und gehört zu der Gruppe der  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, wie das oben genannte Penicillin. Carbapeneme werden aus *Streptomyces*-Arten gewonnen. Durch Substitution des Schwefelatoms in Position 4 des  $\beta$ -Lactamrings durch eine Methylgruppe besitzen Carbapeneme schon in niedriger Konzentration eine stark bakterizide Wirkung. Die Pioniersubstanz ist das natürlich vorkommende Thienamycin. Imipenem ist ein Amidin-Derivat des Thienamycins mit folgender Strukturformel:

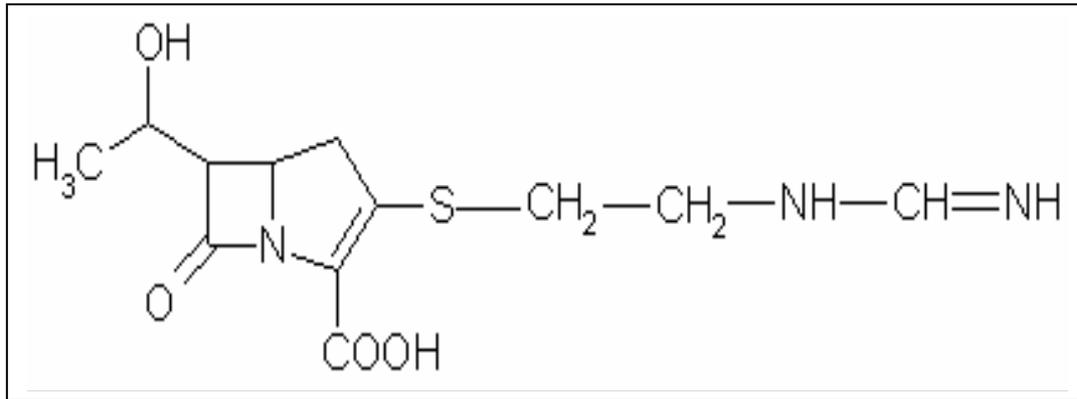


Abbildung 5: Strukturformel des Imipenems

In der Klinik zählen Carbapeneme zu den Breitspektrum-Antibiotika mit einer guten Wirksamkeit gegen gram-positive und gram-negative Bakterien einschließlich Anaerobiern. Sie finden ihren Einsatz insbesondere bei der Therapie von Mischinfektionen und der initialen Behandlung lebensbedrohlicher Krankheitsverläufe. Im Handel ist das Präparat Imipenem/Cilastatin unter dem Namen Zienam vertreten.

Das ebenfalls in der vorliegenden Arbeit verwendete Ceftazidim wird auch den  $\beta$ -Lactam-Antibiotika zugeordnet und hier wiederum der Gruppe der Cephalosporine. Diese Antiinfektiva gehen aus Stoffwechselprodukten des Schimmelpilzes *Cephalosporium acremonium* hervor. Sie sind chemische Abkömmlinge der 7-Aminocephalosporansäure, welche aus einem Dihydrothiazinring und einem  $\beta$ -Lactamring besteht. Sie bilden den Kern der Cephalosporine. Durch verschiedene Substitutionen ist es möglich, eine Vielzahl von Verbindungen mit unterschiedlicher antibakterieller Wirkung herzustellen.

Folgende Abbildung gibt die Strukturformel des Ceftazidims wieder:

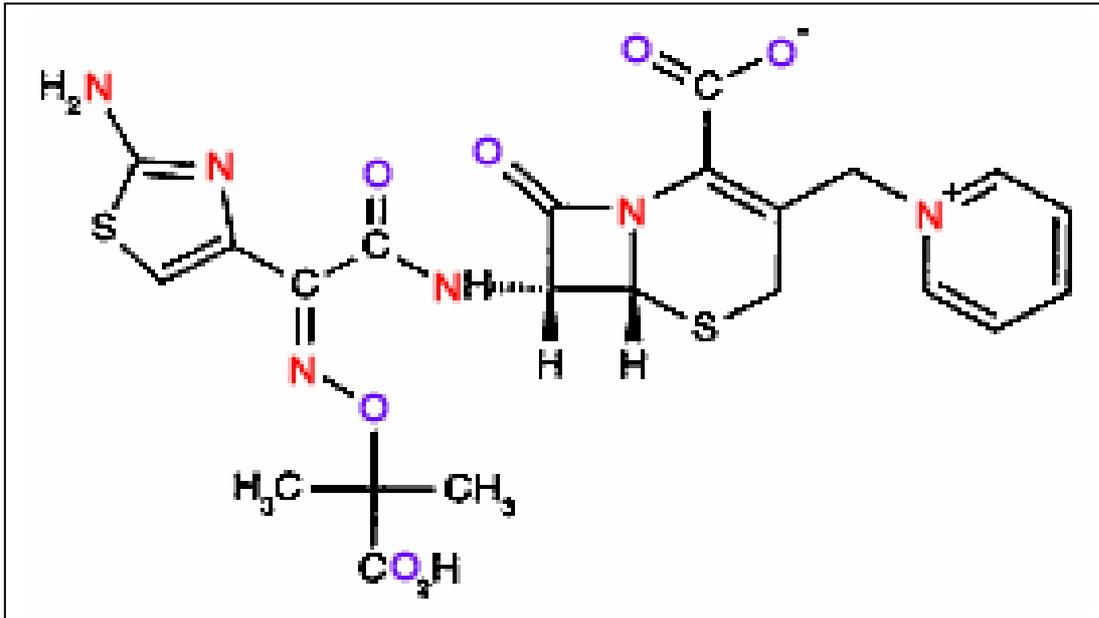


Abbildung 6 : Strukturformel des Ceftazidims

Ein weiteres in dieser Arbeit eingesetztes Cephalosporin ist das Cefoxitin, das in seiner Stoffeigenschaft der des Ceftazidims entspricht.

Die Strukturformel von Cefoxitin wird in folgender Abbildung gezeigt:

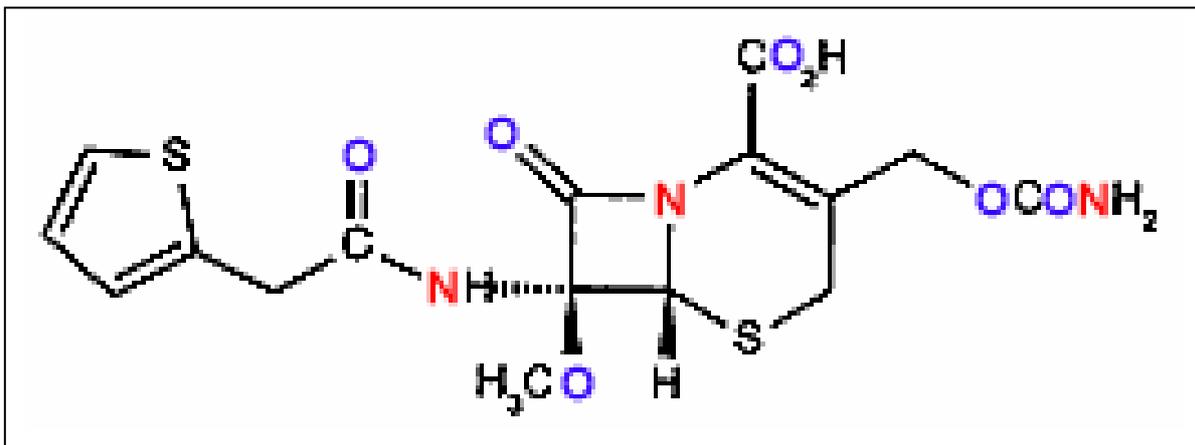


Abbildung 7: Strukturformel des Cefoxitins

Die parenteralen Cephalosporine werden nach der Empfehlung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., entsprechend ihrem Wirkspektrum, in fünf Gruppen eingeteilt. Ceftazidim gehört der Gruppe 3b an. Diese Gruppe wird durch

eine gute Aktivität im gram-negativen Bereich und eine schwache Wirkung gegen Staphylokokken charakterisiert. Zusätzlich besitzen Vertreter dieser Gruppe eine gute Pseudomonasaktivität. Cefoxitin ist in Deutschland die einzige Substanz der Gruppe 5 mit dem Merkmal einer guten Anaerobierwirksamkeit. Der Handelsname von Ceftazidim ist Fortum; Cefoxitin trägt im Handel den Namen Mefoxitin.

Weiter wurde in der Vergangenheit auch die Endotoxinfreisetzung der Fluorochinolone, besonders des Ciprofloxacin, in einer Reihe von Studien erforscht. Doch die Ergebnisse dieser Studien waren zunächst verschieden [31, 39, 40, 43, 92, 103, 123, 127].

Trautmann et al. konnten schließlich nachweisen, dass Ciprofloxacin im Hinblick auf die Endotoxinfreisetzung am ehesten dem Imipenem entsprach, wobei auffällig war, dass Ciprofloxacin auch bei bereits geringgradiger Überschreitung der MHK rasch bakterizid wirkte und deshalb bei Konzentrationen in der Nähe der MHK weniger LPS als Imipenem freisetzte [123].

Ein noch neues Antibiotikum aus der Gruppe der Fluorochinolone ist das Moxifloxacin mit derzeit fehlender Datenlage zur Endotoxinfreisetzung, die dann in der vorliegenden Arbeit geklärt werden soll. Der Wirkungsmechanismus erfolgt über Hemmung der DNA-Replikation. Hauptangriffspunkt sind die für die DNA-Replikation essentiellen Enzyme DNA-Gyrase und DNA-Topoisomerase IV. Auch wenn die Fluorochinolone je nach Spezies einen unterschiedlichen Hauptangriffspunkt haben können, geht man im Allgemeinen davon aus, dass die Substanzen bei gram-positiven Erregern hauptsächlich auf die Topoisomerase IV und bei gram-negativen Erregern auf die DNA-Gyrase abzielen [33, 34, 120].

Dalhoff berichtete, dass Moxifloxacin gleichzeitig und in vergleichbarem Ausmaß auf die DNA-Gyrase und die Topoisomerase IV von *E. coli* einwirkt.

Die chemische Bezeichnung von Moxifloxacin ist (1-Cyclopropyl-7-([S,S]-2,8-diazabicyclo-[4.3.0]non-8-yl)-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-4-oxo-3-chinolon-Carboxylsäurehydrochlorid). Das Molekül wird mit Hilfe der Methode nach Grohe (Cycloaracylation) synthetisiert, wobei zunächst die aktive Verbindung in Betain-Form isoliert und dann in das Hydrochlorid-Salz umgewandelt wird [101].

Die Strukturformel zeigt die folgende Abbildung:

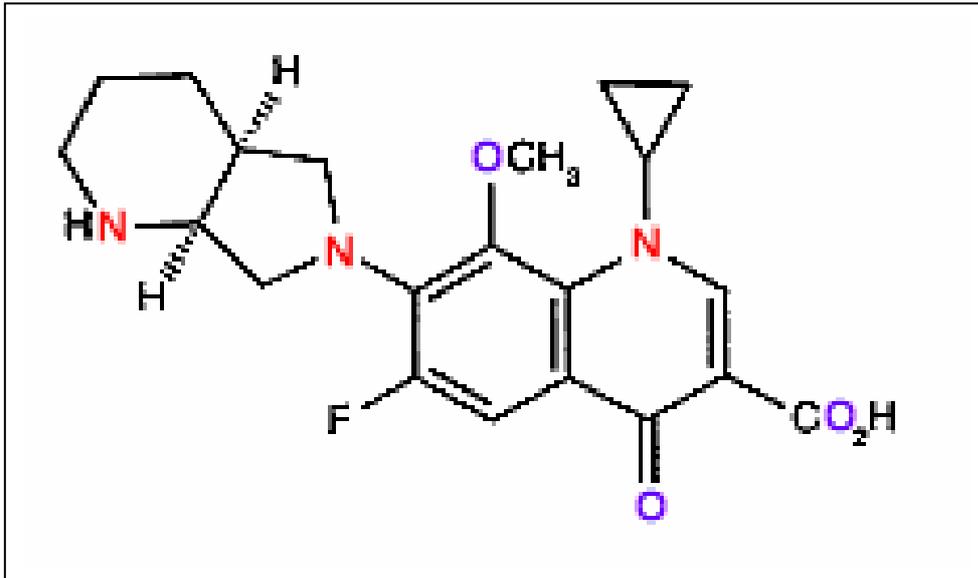


Abbildung 8: Strukturformel des Moxifloxacins

Moxifloxacin ist ein weiterentwickeltes Fluorochinolon, das sich durch eine gesteigerte Effektivität gegenüber klinisch wichtigen gram-positiven und atypischen Erregern auszeichnet und dabei auch gegen ein breites Spektrum klinisch bedeutsamer gram-negativer Pathogene wirksam ist.

## 1.6 Fragestellung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es:

1. die bakterizide Wirkung von Moxifloxacin auf die gram-negativen Keime *E. coli* und *B. fragilis* zu testen und mit den bekannten Antibiotika Imipenem und Ceftazidim bzw. Cefoxitin zu vergleichen,
2. die freigesetzten Endotoxinmengen nach Inkubation der Keime mit den verschiedenen Antibiotika mittels unterschiedlicher Nachweisverfahren – wie folgt festzustellen:
  - ELISA,
  - Chromogener LAL-Test,

- Monozytenzellkultur und Messung der Zytokinliberation,

3. Unterschiede in der morphologischen Veränderung der proliferierenden Bakterienzellen vor der Zellyse unter Einwirkung der verschiedenen Antibiotika zu zeigen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Antibiotika

Bei den in der vorliegenden Studie verwendeten Antibiotika handelt es sich um das Fluorochinolon Moxifloxacin, die beiden Cephalosporine Ceftazidim und Cefoxitin, sowie das Carbapenem Imipenem.

Die vier verwendeten Antibiotika lagen als Reinsubstanzen in fester Form vor. Sie wurden entsprechend ihrer spezifischen Aktivität eingewogen und jeweils in dem vom Hersteller angegebenen Lösungsmittel gelöst. In der folgenden Tabelle sind die Herstellerangaben zum Lösen der Antibiotika zusammengefasst.

*Tabelle 1: Antibiotikallösung nach Herstellerangaben*

Testsubstanz	Spezifische Aktivität ( x mg = 1 mg)	Anteil aktiver Substanz	Lösungsmittel	Verdünnungsflüssigkeit
Imipenem	1,067	93,7%	PBS	PBS
Ceftazidim	1,304	76,7%	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
Cefoxitin	1,050	95,2%	H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O
Moxifloxacin	1,139	87,8%	H <sub>2</sub> O + tropfenweise 0,1N NaOH bis zur Lösung	H <sub>2</sub> O

Es wurde jeweils nur eine Charge der einzelnen Antibiotika verwendet und in entsprechend großer Menge gelöst, anschließend sterilfiltriert und in Aliquots von 1ml bei -80°C eingefroren.

### 2.2 Bakterien

Die Untersuchungen wurden mit je einem Stamm von E. coli sowie einem Stamm von B. fragilis durchgeführt. Als repräsentativer Testkeim für die Spezies E. coli wurde der Stamm Bortolussi (Serotyp O18:K1:H7) verwendet. Der von Dr. Ben Kaufman, Washington D.C., USA, publizierte Stamm zeichnet sich durch eine stabile, hohe Pathogenität im Tierexperiment aus. Er wurde ursprünglich bei einer

neonatalen Meningitis aus dem Liquor isoliert. Gegen die Oberflächenantigene dieses Erregers stehen mehrere monoklonale Antikörper zur Verfügung [74, 76, 77, 78].

Als Repräsentant der Spezies *B. fragilis* wurde der Stamm DSM 1396 (ATCC 23745/ NCTC 1058) von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen, Braunschweig, bezogen.

Die fortlaufende Anzucht von *E. coli* erfolgte auf Müller-Hinton-Agarplatten bzw. in supplementierter Müller-Hinton-Bouillon bei 37°C im Brutschrank.



Abbildung 9: Typisches Wachstumsverhalten von *Escherichia coli* auf Müller-Hinton-Blut-Agar-Platten.

Für die Anzucht von *B. fragilis* wurde Schädler-Agar bzw. als Flüssigmedium Thioglykolat-Bouillon mit Häminzusatz verwendet. *B. fragilis* wurde in Anaerobier-Töpfen kultiviert. Die anaerobe Atmosphäre wurde durch Beigabe eines reduzierenden Mediums (Anaerokult A, Merk AG, Darmstadt) hergestellt.



Abbildung 10: Typisches Wachstumsverhalten von *Bacteroides fragilis* auf Schädler-Agar

Die jeweiligen Zusammensetzungen der selbst hergestellten Agar-Platten und Bouillons sind dem Anhang unter 7.1.3 zu entnehmen.

### 2.3 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)

Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) der Antibiotika erfolgte mittels Bouillon-Mikrodilution nach DIN 58940.

Ziel der MHK-Bestimmung war es, die Empfindlichkeit von *E. coli* gegenüber Imipenem, Ceftazidim und Moxifloxacin, sowie von *B. fragilis* gegenüber Imipenem, Cefoxitin und Moxifloxacin festzustellen.

Es wurde die MHK für jedes Antibiotikum gegenüber einer Keimdichte von  $1 \times 10^7$ /ml,  $1 \times 10^6$ /ml und  $5 \times 10^5$ /ml sowohl für *E. coli* als auch für *B. fragilis* getestet, da die MHK der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika wesentlich von der Größe des getesteten Inokulums beeinflusst wird, auch Inokulumeffekt genannt. Dieser Effekt äußert sich in vitro durch einen überproportionalen Anstieg der MHK bei geringfügiger Erhöhung des Inokulums. In vivo ist das Antibiotikum trotz nachgewiesener Empfindlichkeit des Erregers dann nicht wirksam. Der Effekt ist durch folgende Überlegungen zu

erklären: Inhibition des Antibiotikums durch  $\beta$ -Laktamasen und Bildung filamentöser Bakterienformen, die nach Abnahme der Antibiotikakonzentration ein erneutes Wachstum aufnehmen können.

### 2.3.1 MHK-Bestimmung mit E. coli

Für den Versuch diente als Testmedium kationensupplementierte Mueller-Hinton-Bouillon (MHB).

Ausgehend von einer Anfangskonzentration der Antibiotika von 16  $\mu\text{g/ml}$  wurden 1:2-Verdünnungen mit MHB angefertigt und davon jeweils 50  $\mu\text{l}$ /Vertiefung auf drei Mikrotiterplatten (Greiner, Nürtingen) mit 96 u-förmigen Vertiefungen vorgelegt. Folgende Abbildung gibt diese Versuchsanordnung schematisch wieder.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0
A	Imipenem in Doppelbestimmung											
B												
C	Ceftazidim in Doppelbestimmung											
D												
E	Moxifloxacin in Doppelbestimmung											
F												
G	Kontrolle in Doppelbestimmung											
H												

Abbildung 11: Schematische Darstellung der Mikrotiterplatte zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Über Nacht angezüchteter E. coli wurde mit frischer MHB suspendiert und durch 2 h Schüttelinkubation in die logarithmische Wachstumsphase gebracht. Dann wurde die in der log-Phase befindliche Keimsuspension durch Verdünnung mit MHB optisch und photometrisch mittels Mc Farland Standard 0,5 (bio Mérieux, Nürtingen) auf eine

Keimzahl von  $10^8$  KBE/ml eingestellt. Anschließend wurden von dieser Keimsuspension folgende drei Verdünnungen angefertigt: 1:5, 1:50 und 1:100. Von diesen Suspensionen wurden schließlich jeweils 50  $\mu$ l auf die bereits, wie oben beschrieben, mit 50  $\mu$ l Antibiotikallösung vorbereiteten Mikrotiterplatten gegeben. So entstanden drei fertige Mikrotiterplatten mit jeweils einer Keimzahl von  $1 \times 10^7$ /ml,  $1 \times 10^6$ /ml und  $5 \times 10^5$ /ml. Die inokulierten Mikrotiterplatten wurden 24 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die MHK abgelesen, wobei diese der Konzentration des Antibiotikums entsprach, bei der mit bloßem Auge keine Trübung mehr in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte zu erkennen war. Das folgende Foto zeigt die Situation einer Mikrotiterplatte nach beendeter MHK-Bestimmung.

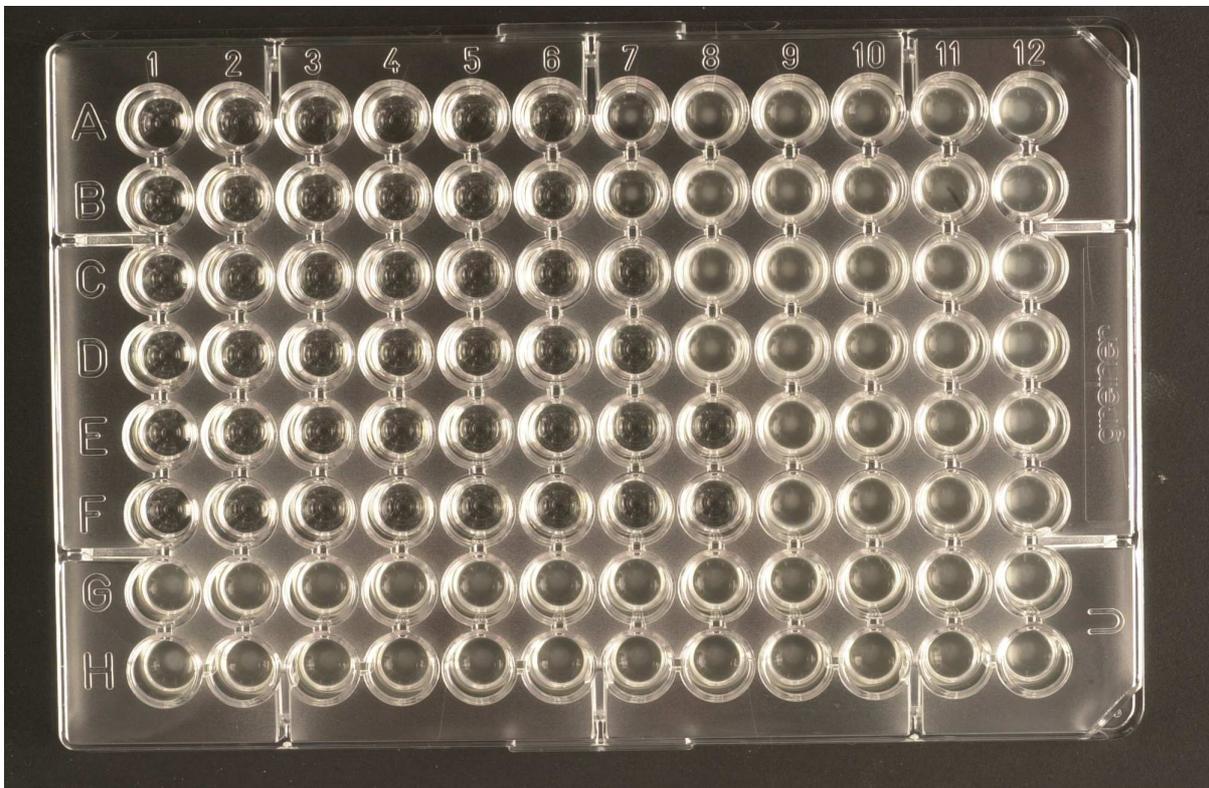


Abbildung 12: Foto der Mikrotiterplatte zu einer der minimalen Hemmkonzentrations-Bestimmungen mit *Escherichia coli* bei Versuchsende

Zur Kontrolle der nach Mc Farland Standard 0,5 eingestellten Ausgangskeimsuspension wurden Verdünnungsreihen mit NaCl-Lösung (Fresenius, Bad Homburg) hergestellt, jeweils 100  $\mu$ l der Endverdünnungen 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000 auf Mueller-Hinton-Platten ausgespachtelt, über Nacht bebrütet und ausgewertet.

### 2.3.2 MHK-Bestimmung mit *B. fragilis*

Im Gegensatz zu *E. coli* kann *B. fragilis* erst nach einem Kolonisationsalter von zwei Tagen für weitere Versuche genutzt werden. So wurden ca. 2 Kolonien des 48 h alten Keimes von der Schädler-Agar-Platte abgehoben und in ein Reagenzglas mit Thioglykolat-Bouillon überführt. Dieses Reagenzglas mit der Keimsuspension wurde im Reagenzglasständer in einen Anaerobiertopf mit einem Volumen von 2,5 Liter Inhalt überführt. Das anaerobe Milieu wurde durch Beigabe des reduzierenden Mediums Anaerokult A (Merck, Darmstadt) herbeigeführt. Anschließend fand die Inkubation im Brutschrank bei 37°C auf einem Schüttler unter ständiger Rotation für 2 h statt.

Während der Inkubationsperiode wurde die Mikrotiterplatte analog zur MHK-Bestimmung bei *E. coli* vorbereitet. Dabei wurde allerdings, für *B. fragilis* spezifisch, die Müller-Hinton-Bouillon gegen die Thioglykolat-Bouillon und das Antibiotikum Ceftazidim gegen das Antibiotikum Cefoxitin ausgetauscht. Außerdem wurde die Konzentration des Antibiotikums Imipenem von einem Anfangseinsatz von 16 mg auf 4 mg verringert, da sich in zahlreichen Vortests eine stärkere Wirkung dieses Pharmakons gegen *B. fragilis* als gegen *E. coli* gezeigt hatte.

Zur Überprüfung der Keimzahl wurden Konzentrationen der Keimsuspensionsverdünnungen (1:1.000, 1:10.000, 1:100.000) auf Schädler-Agar-Platten ausplattiert und bei 37°C für 48 h im Anaerobiertopf streng anaerob bebrütet.

## 2.4 Wachstumsversuch

Durch diese Versuchsanordnung wurde freies LPS unter standardisierten Bedingungen gewonnen, um vergleichende qualitative und quantitative Aussagen zur LPS-Liberation der zu untersuchenden Antibiotika machen zu können.

### 2.4.1 Wachstumsversuch mit *E. coli*

Es wurden zwei von über 24 h gewachsenen *E. coli* Kolonien von der Mueller-Hinton-Blutagarplatte entnommen und in 20 ml sterile MHB überimpft. Dann erfolgte eine 2-stündige Inkubation im Schüttelinkubator bei 37°C zum Erreichen der

logarithmischen Wachstumsphase. Ein Teil dieser Keimsuspension wurde in einem sterilen Reagenzröhrchen auf eine definitive Keimmenge von  $10^8$  KBE durch NaCl-Verdünnung nach optischem und photometrischem Abgleich mit McFarland Standard 0,5 eingestellt. 500  $\mu$ l von dieser Keimsuspension wurden dann mit 99,5 ml MHB vermischt, so dass 100 ml einer *E. coli* -Suspension mit einer gewünschten Ausgangs-KBE von  $5 \times 10^5$  /ml entstanden. Davon wurden 100  $\mu$ l entnommen und zur späteren LPS-Bestimmung bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren. Weitere 100  $\mu$ l wurden zur Ermittlung der Keimzahl auf einer Mueller-Hinton-Agarplatte ausgestrichen.

Von der Ausgangskeimsuspension wurden 20 ml in 4 sterile Erlenmeyerkolben pipettiert. Zu drei dieser Ansätze wurden je 20  $\mu$ l des einzusetzenden Antibiotikums in der entsprechenden MHK hinzugegeben, der vierte Erlenmeyerkolben diente als Kontrolle. Auf dem Schüttelinkubator wurden diese so präparierten Versuchsansätze im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 8 und 24 h fand eine Probenentnahme (1 ml) statt. Jede Probe wurde 3 min bei 13.000 g abzentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus Sepatech; Hanau). Danach wurden die Überstände, die das freie LPS enthielten, abgenommen und in sterile Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

Um eine Kontrolle über die während des Versuches vorhandenen Keimzahlen in den jeweiligen Erlenmeyerkolben zu erhalten, wurden zu jedem Zeitpunkt der Probenentnahmen nochmals 100  $\mu$ l in zweifacher Anfertigung entnommen und auf Mueller-Hinton-Platten mit dem Drigalski-Spatel ausplattiert.

Die Zellzahlkontrolle erfolgte, indem nach 24 h Inkubation die Agarplatten betrachtet und dabei die KBE ausgezählt wurden.

Die LPS-Bestimmung erfolgte mittels ELISA, chromogenem LAL-Test und Zytokinmessung nach dem Zellkulturversuch nach Abschluss der Versuchsreihe.

#### 2.4.2 Wachstumsversuch mit *B. fragilis*

Prinzipiell wurde genauso verfahren wie bei dem Versuch für *E. coli*.

Zu Beginn des Versuches wurden zwei Kolonien des 48 h alten Keimes von einer Schädler-Agar-Platte entnommen und in ein Reagenzglas mit Thioglykolat-Bouillon überführt. Nach gründlichem Vortexen wurde dieses Reagenzglas mit Keimsuspension im Reagenzglasständer in einen Anaerobiertopf mit einem Volumen von 2,5 Liter überführt. Unter Zusatz von Anaerokult A fand dann die zweistündige

Inkubation auf einem Schüttler im Brutschrank bei 37°C unter kontinuierlicher Rotation statt.

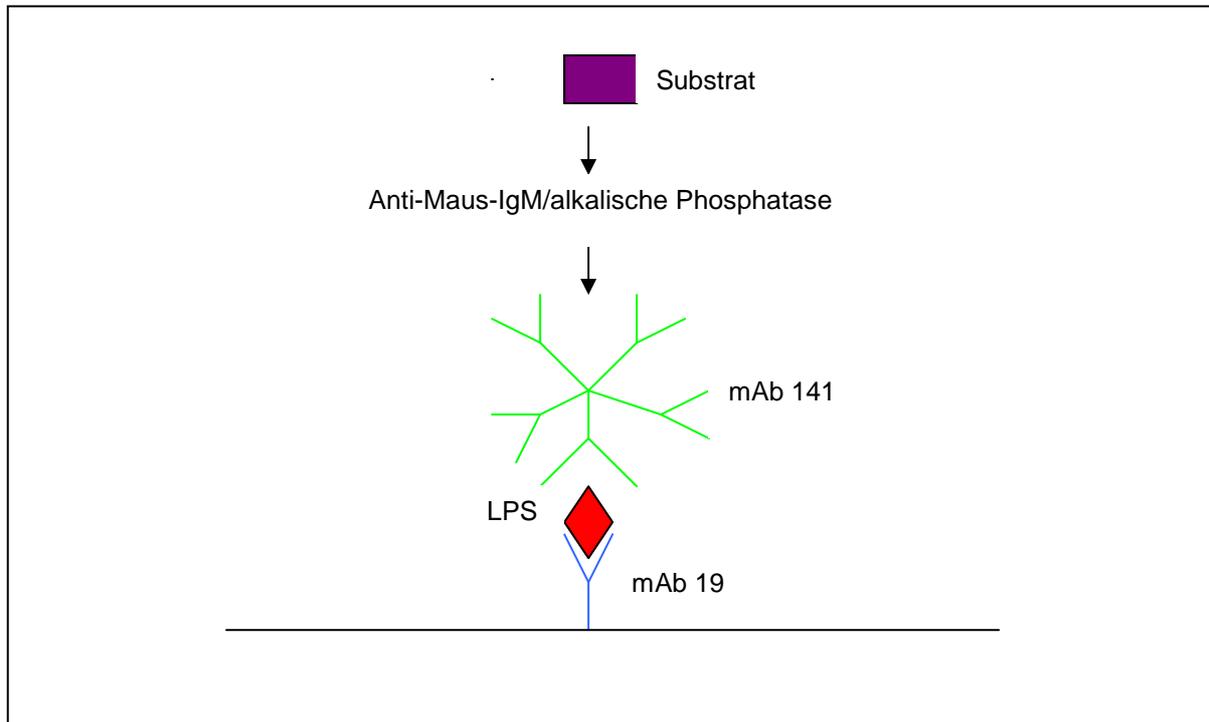
Während der Inkubationsperiode wurde analog zum Versuch mit *E. coli* verfahren. Die einzelnen Versuchsschritte blieben bestehen, die Keimkonzentrationen wurden beibehalten. Als Nährbouillon diente, speziell für *B. fragilis*, Thioglykolat. Die Antibiotika wurden in den für *B. fragilis* ermittelten MHKs eingesetzt und Ceftazidim gegen Cefoxitin ausgetauscht. Die Inkubation der Keimsuspensionen fand unter streng anaeroben Bedingungen in Anaerobiertöpfen auf einem Schüttler statt. Nach jeder Probennahme zu den Zeitpunkten wie bei *E. coli* wurde das anaerobe Milieu durch neues Anaerokult A wieder hergestellt.

Die Zellzahlkontrolle erfolgte wie bei der MHK-Bestimmung. Das LPS sollte mittels chromogenem LAL-Test und Zytokinmessung aus dem Zellkulturversuch nach Abschluss der Versuchsreihe bestimmt werden.

## **2.5 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Das ELISA-Testsystem basiert auf der Detektion von einem Antigen, hier *E. coli*-LPS, mittels zweier verschiedener monoklonaler Antikörper, die spezifisch an Bereiche der O-spezifischen-Seitenkette binden.

Dieses System entspricht dem Prinzip des Sandwich-ELISA und ist in der Abbildung 13 dargestellt:



LPS, Lipopolysaccharid; mAb, monoklonaler Antikörper

Abbildung 13: Prinzip des Sandwich-enzyme-linked immunosorbent assays zur Bestimmung der Lipopolysaccharid-Konzentrationen in den *Escherichia coli*-Kulturüberständen

Folgende Antikörper wurden eingesetzt:

Anti-LPS mAb 19 (Primärantikörper): ein monoklonales Maus-IgG, das spezifisch an ein Epitop der Seitenketten-Polysaccharide des *E. coli* O18-LPS bindet [74].

Es wurde freundlicherweise von B.M. Kaufman, Department of Biologics Research, Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D.C., USA zur Verfügung gestellt. Es lag nach Reinigung über Protein-A-Sepharose in Phosphatpuffer-Lösung in einer Konzentration von 1 mg/ml vor und wurde bei 4 bis 6°C in PBS-Puffer mit Beigabe von Na-Acid -zur Konservierung- aufbewahrt.

Anti-LPS mAb 141 (Sekundärantikörper): ein monoklonales Maus-IgM, das spezifisch an ein anderes Epitop der Seitenketten-Polysaccharide des *E. coli* O18-LPS bindet [74].

Wie der Antikörper mAb 19 wurde auch dieser Antikörper von B.M. Kaufman zur Verfügung gestellt und lag als filtrierte murine Ascitesflüssigkeit, durch Hinzugabe von Na-Azid stabilisiert, vor.

Anti-Maus-IgM (Detektionsantikörper): gekoppelt an alkalische Phosphatase (Sigma, Steinheim, A 7784 lot 54H8942), das spezifisch an die  $\mu$ -Kette von Maus-IgM bindet.

Durch Zugabe dieses enzymmarkierten Detektionsantikörpers zum ELISA-Ansatz, der an den Sekundärantikörper bindet, und weitere Zugabe eines Entwicklers, der das Enzym des Detektionsantikörpers umsetzt, kann schließlich eine Farbreaktion als optische Dichte gemessen und dadurch das Antigen quantitativ bestimmt werden.

Das *B. fragilis*-LPS sollte mit dem ELISA-Testsystem nicht detektiert werden, da für dieses Antigen keine entsprechenden monoklonalen Antikörper zur Verfügung standen.

Die für den ELISA verwendeten Lösungen und Reagenzien sind im Anhang unter Punkt 7.1.6 zusammengestellt.

Flachboden-Mikrotiterplatten mit je 96 Vertiefungen (Greiner, Nürtingen) wurden mit 100 µl des Primärantikörpers mAb 19 in einer Verdünnung von 10 µg/ml in PBS beschichtet und anschließend bei 4°C in der feuchten Kammer für 24 h inkubiert.

Am 2. Tag wird die Platte zunächst ausgeschlagen, gewaschen und im Anschluss Füllpuffer in einer Menge von 250 µl/ Vertiefung aufgetragen, um unspezifische Bindungsstellen auf der Platte abzusättigen. Nach 1 h Inkubation bei 37°C in einer luftdichten Kammer wurde die Platte ausgeschlagen und dreimal mit Wasch-PBS gewaschen. Schließlich wurden sowohl die Standards mit bekanntem LPS-Gehalt (ausgehend von 512 ng/ml in 1:2-Verdünnungen bis zu einer Konzentration von 1 ng/ml in Füllpuffer) und zugleich auch die Proben mit unbekannter LPS-Konzentration in Doppelbestimmungen à 100 µl auf die Platte gegeben. Damit die später gemessene optische Dichte der Proben im selben Bereich wie die der Standards lag und somit die der gemessenen optischen Dichte entsprechende LPS-Konzentration aus der Standardkurve abgelesen werden konnte, wurden die Proben vor dem Auftragen mit Füllpuffer in der entsprechend geeigneten Menge verdünnt. Dann erfolgte abermals eine Inkubation bei 4°C in der feuchten Kammer für 24 h.

Am Folgetag wurde die Platte ausgeschlagen und dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 100 µl des Sekundärantikörpers mAb 141 in einer Verdünnung von 1:2.000 in Füllpuffer auf die Platte aufgebracht. Es folgte eine Inkubation in der feuchten Kammer für 4 h.

Nach Ausschlagen der Platte und dreimaliger Waschung wurden 100 µl des Detektionsantikörpers Anti-Maus-IgM/alkalische Phosphatase-Konjugat in einer

Verdünnung mit Füllpuffer von 1:10.000 aufpipettiert. Nach 4-stündiger Inkubation bei 4°C in der feuchten Kammer, Ausschlagen der Platte und dreimaligem Waschen erfolgte die Entwicklung mit dem in Diethanolaminpuffer gelösten Substrat p-Nitrophenylphosphat (200 µl/Vertiefung). Nach 30 min Entwicklung bei Raumtemperatur war die enzymatische Farbreaktion abgelaufen und es erfolgte das Lesen der OD mittels ELISA-Reader (Milenia Kinetic Analyser, DPC Biermann, Bad Nauheim) bei einer Wellenlänge von 405 nm.

Nachdem alle Werte der Platte durch den ELISA-Reader ausgedruckt waren, erfolgte die Auswertung der gemessenen Werte. Dazu wurde zunächst die Standardgerade zeichnerisch auf Millimeterpapier aufgetragen. Dann erfolgte die Ablesung der Probenwerte, indem die gemessenen ODs in definitive Werte der Mengenangabe [ng/ml] an Hand der Standardgerade abgetragen, bzw. abgelesen wurden.

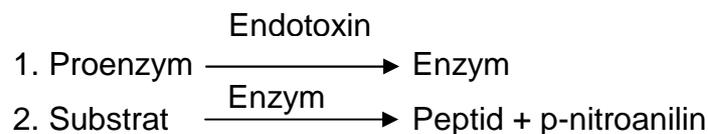
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Füller	Standard-LPS [ng/ml]										
B		512	256	182	64	32	16	8	4	2	1	0
C		Imipenem-Proben					Kontroll-Proben					
D		2h	4h	6h	8h	24h	0h	2h	4h	6h	8h	24h
E		Ceftazidim-Proben										
F		2h	4h	6h	8h	24h						
G		Moxifloxacin-Proben										
H		2h	4h	6h	8h	24h						

Abbildung 14: Beschichtungsschema der enzyme-linked immunosorbent assay-Platte

Die bei der Schilderung der Durchführung genannten Konzentrationen von Standard-LPS, Proben, Primär- sowie Sekundärantikörper und Probenverdünnungen wurden zunächst in Vorversuchen optimiert.

## 2.6 Chromogener LAL-Test (chromogener Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test)

Der Endotoxin-Gehalt in den E. coli-Kulturüberständen wurde mit einem chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test (chromogener LAL-Test) nach Berger et. al. bestimmt [13]. Dabei wird das Amöbozytenlysate (Blutzelllysate, bzw. Substrat) des Pfeilschwanzkrebses *Limulus polyphemus* (Königskrabbe) durch Endotoxin zum Gelieren gebracht. Diese Reaktion beruht darauf, dass Lipopolysaccharid ein Proenzym im Lysat, eine Serinprotease, aktiviert, die lösliches Protein, gekoppelt mit einem Farbstoff, in einen unlöslichen Komplex umwandelt.



Die Stärke der Farbreaktion ist der Endotoxinkonzentration proportional.

Die Protease ist so empfindlich, dass sie zum Nachweis sehr kleiner Endotoxinmengen in Flüssigkeiten, bzw. in menschlichen Körperflüssigkeiten, vor allem in Blut und Liquor, geeignet ist.

### 2.6.1 Verwendete Lösungen und Reagenzien

Die für den chromogenen LAL-Test verwendeten Lösungen und Reagenzien sind im Anhang unter Punkt 7.1.7 zusammengefasst.

### 2.6.2 Chromogener LAL-Test mit E. coli

Die im Wachstumsversuch gewonnenen und bei -80°C eingefrorenen E. coli - Kulturüberstände wurden aufgetaut und mit pyrogenfreiem Aqua bidest verdünnt, wobei sich unterschiedliche Verdünnungsstufen von 1:50 bis 1:2.000.000 als geeignet erwiesen.

Da in jeder Mikrotiterplatte ein zu dieser Platte gehörender LPS-Standard, hier kommerziell erworbenes E. coli O55:B5, mitgeführt wurde, musste zunächst eine Standardreihe in folgenden Konzentrationen erstellt werden: 0,024, 0,048, 0,096, 0,19, 0,38 und 0,75 EU/ml in Aqua bidest. Je 50 µl der Standards sowie der Proben wurden im Doppelansatz in eine Flachboden-Mikrotiterplatte (Nunc, Wiesbaden)

pipettiert. Als Kontrolle diente reines Aqua bidest. Dann wurde das LAL-Reagens in Aqua bidest gelöst und 50 µl/Vertiefung davon auf Standards, Proben und Leerwerte gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation der abgedeckten Mikrotiterplatte über 25 min bei 37°C.

Während dieser Inkubationszeit wurde das chromogene Substrat in Aqua bidest gelöst und 1:2 mit LAL-Puffer gemischt. Anschließend wurden 100 µl davon in alle Vertiefungen der Platte gegeben und dadurch die Farbreaktion gestartet. Nach 2 min Inkubation bei 37°C wurde die Farbreaktion mit 100 µl/Vertiefung 20%-iger Essigsäure gestoppt und innerhalb der nächsten 30 min die Absorption bei einer Wellenlänge von 405 nm im Spektralphotometer gemessen.

Die Versuchsanordnung nach abgeschlossener Farbreaktion ist in folgendem Foto abgebildet:

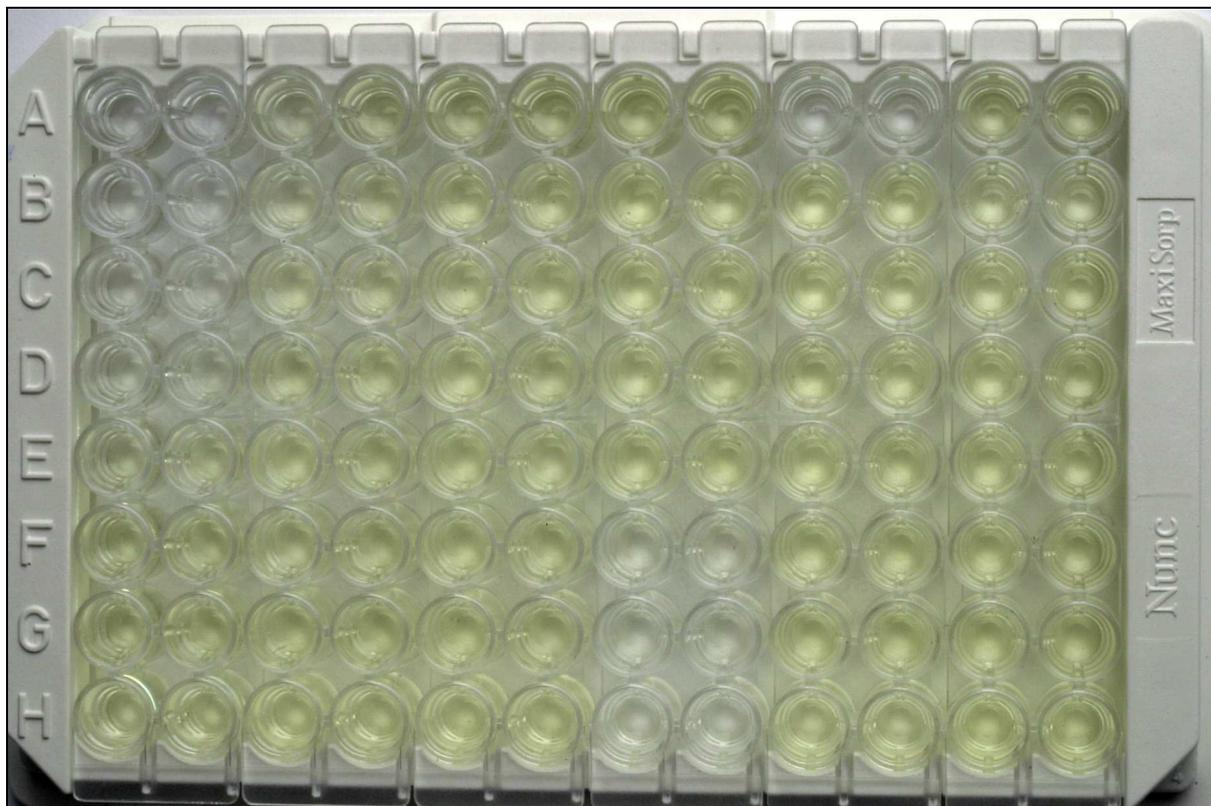


Abbildung 15: Flachboden-Mikrotiterplatte zum chromogenen *Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test* nach abgeschlossener Farbreaktion.

Da die Standardreihe des chromogenen LAL-Test mit einem kommerziell von Charles and River erworbenen LPS des *E. coli* Keims O55:B5, wie oben genannt, erfolgte, war bei der Auswertung der Ergebnisse zu berücksichtigen, dass die untersuchten LPS-Proben von dem *E. coli* Stamm Bort stammten und daher eine Umrechnung erfolgen musste. Um den Umrechnungsfaktor zu ermitteln, wurden zwei

Verdünnungsreihen (E. coli O55-LPS und E. coli O18-LPS) parallel getestet. Danach entsprachen 8 EU/ml Aktivität des E. coli O55:B5-LPS einem ng des E. coli Bort-LPS; das wiederum hieß, dass 1 EU/ml E. coli Bort-LPS einer LPS-Konzentration von 0,125 ng entsprach. Somit musste bei Bestimmung der jeweiligen LPS-Konzentration in den Proben jeweils die gemessenen OD mit dem Umrechnungsfaktor 0,125 multipliziert werden und dann noch der jeweilige Verdünnungsfaktor herausgerechnet werden.

### 2.6.3 Chromogener LAL-Test mit *B. fragilis*

Für die *B. fragilis* - Proben lagen, im Gegensatz zu den *E. coli* - Proben, noch keine eigenen Werte zu LPS-Mengen in den Wachstumsversuchsproben durch andere Tests vor. Außerdem waren auch keine fremden Erfahrungswerte zur LPS-Liberation von *B. fragilis* vorhanden. So wurden nicht alle Proben eines Versuches jeder MHK-Gruppe in einer bestimmten, geschätzten Verdünnung für Vorversuche - wie bei *E. coli* - aufbereitet. Sondern hier wurden nur wenige, ganz speziell gewählte Proben für die nachfolgende Untersuchung bereitgestellt. Die Proben-Aufbereitung erfolgte mit Aqua dest. (pyrogenfrei). Zu einer Probe wurden Verdünnungen von 1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000 und 1:1.000.000 hergestellt.

Die Durchführung des chromogenen LAL-Tests erfolgte analog zu der für *E. coli*. Zunächst wurden auch die gleichen Standards eingesetzt, da zu *B. fragilis* kein kommerziell erhältliches LPS zur Verfügung stand. Ein entsprechender Umrechnungsfaktor zur Bestimmung der LPS-Konzentration sollte später durch den Hersteller noch angegeben werden.

## 2.7 Zellkultur und Zytokinbestimmung

Die in diesem Versuch verwendete Monozyten-Zelllinie Mono-Mac 6 setzt die für die Arbeit relevanten Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  frei.

Durch Messung dieser Zytokinausschüttungen, hervorgerufen durch das antibiotikainduzierte LPS aus dem Wachstumsversuch, sollte die biologische Aktivität desselben beurteilt werden. Hieraus können Rückschlüsse auf die mögliche Reaktion des menschlichen Organismus auf eben dieses LPS gezogen werden.

Die Messung des durch Endotoxin stimulierten  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  aus den Mono Mac 6-Zellen erfolgte durch einen Sandwich-ELISA.

### 2.7.1 Verwendete Lösungen und Reagenzien

Die für die Messung der endotoxin-stimulierten  $\text{TNF}\alpha$ -Freisetzung aus der Monozytenzelllinie Mono Mac 6 verwendeten Lösungen und Reagenzien sind im Anhang unter Punkt 7.1.8 aufgeführt.

### 2.7.2 Verwendete Zelllinie

Die Versuche wurden mit der hoch differenzierten humanen monozytären Zelllinie Mono Mac 6 (DSMZ 124; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) durchgeführt. Diese Zellen stammen ursprünglich von einem an monoblastischer Leukämie erkrankten Patienten und weisen alle Eigenschaften reifer Monozyten auf. Sie sind extrem LPS-empfindlich und in der Lage, verschiedene Zytokine wie z.B.  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$ , zu produzieren.

Die Zellkulturen der Mono Mac 6-Zelllinie wurden in 50 ml Zellkulturflaschen geführt. Als Nährmedium diente das MM6-Medium [135, 142] (Zusammensetzung siehe Anhang 7.1.8).

Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$ , 95 % Luftfeuchtigkeit und 5% Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ). Sämtliche Laborarbeiten wurden steril mit Einmal-Kunststoffmaterialien unter einer laminaren Luftströmung durchgeführt, um konstant pyrogenfreie Bedingungen zu gewährleisten.

### 2.7.3 Endotoxinstimulation der Mono Mac 6-Zellen

3 Tage alte Zellkulturen wurden unter der Neubauer-Zählkammer auf optimalen Funktionszustand geprüft und durch Verdünnung mit angewärmtem Kulturmedium auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt.

Dabei galt folgende Formel:

$$\text{Zellen/ Eckquadrat} \times 10.000 \text{ (entspricht dem Kammerfaktor)} = \text{Zellen/ml}$$

Folglich sollten 50 bzw. 100 Zellen ausgezählt werden. Falls eine Verdünnung notwendig war, erfolgte diese mit vorgewärmtem Kulturmedium durch Zupipettieren in die Gewebekulturflasche.

Je 1 ml dieser Suspension wurde dann in jede Vertiefung einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen (Nunc, Roskilde, Dänemark) gegeben und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 30 min inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Proben mit dem LPS-Überstand aus dem Wachstumsversuch und pyrogenfreies Humanalbumin vorbereitet. Anschließend wurden 20 µl LPS enthaltender Bakterienkultur-Überstand und 20 µl pyrogenfreies Humanalbumin in die vorgesehenen Vertiefungen der Zellkulturplatte hinzugegeben. In die als Negativkontrolle dienende Vertiefung wurde anstatt des E. coli -Kulturüberstandes PBS zugegeben. Der Inhalt der Zellkulturplatten wurde dann 2 min auf den Schüttler (IKA, Janke & Kunkel, Staufen) bei 300 rpm gemischt und dann im Inkubationsschrank inkubiert. Nach der Antwort-Zeit-Kurve wurden zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 8 und 24 h für die TNF $\alpha$ -Versuche die Proben entnommen (d.h. die Vertiefungen komplett geleert) - für die IL-1 $\beta$ -Versuche auch noch nach 48, 72 und 96 h - in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (Eppendorf, Hamburg) pipettiert und 5 min bei 11500 g zentrifugiert. Die Überstände, die die zu bestimmenden Zytokine enthielten, wurden abgehoben, durch einen speziellen Pipettenaufsatz, der mit einem Filter versehen war (Eppendorf, Hamburg), filtriert und anschließend bis zur Zytokinbestimmung mittels Zytokin-ELISA bei -80°C eingefroren.

#### 2.7.4 Zytokin-ELISA zur Bestimmung von TNF $\alpha$ und IL-1 $\beta$

Die TNF $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ - Bestimmung erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA-System zur Bestimmung von humanem TNF $\alpha$ , bzw. IL-1 $\beta$  (Immunotech, Marseille, Frankreich). Die ELISAs wurden nach Herstellervorschrift durchgeführt.

Die kommerziell erworbenen Mikrotiterplatten waren mit dem Primärantikörper, gegen humanes TNF $\alpha$ , bzw. IL-1 $\beta$  gerichtet, beschichtet. In die ersten Vertiefungen dieser vorbereiteten Mikrotiterplatten wurden jeweils 100 µl der Standards, mit bekanntem TNF $\alpha$ -, bzw. IL-1 $\beta$  -Gehalt, zur Erstellung der LPS-Standardkurve, pipettiert. Die weiteren, noch unbesetzten Vertiefungen der Platte wurden mit 100 µl der unbekanntenen, zu bestimmenden Proben versehen.

Anschließend wurden 100 µl des Sekundärantikörpers, ein an alkalische Phosphatase gekoppelter monoklonaler anti-TNF $\alpha$ -Antikörper, bzw. anti-IL-1 $\beta$ -Antikörper, in die Mikrotiterplattenvertiefungen gegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 2 h wurde mehrmals gewaschen, anschließend wurden 200 µl des in Substratpuffer gelösten (1 mg/ml) Substrats Para-Nitrophenolphosphat in jede Vertiefung dazugeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1N NaOH gestoppt. Die Enzymaktivität wurde durch Spaltung des Substrats in ein Farbprodukt gemessen. Die Farbintensität war proportional der TNF $\alpha$ , bzw. IL-1 $\beta$  -Konzentration in der Probe. Die Messung erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Sensitivität des Tests liegt für Kulturüberstände bei 10 pg/ml. Die Bestimmung des LPS-Gehaltes der unbekanntenen Proben erfolgte über eine Standardkurve.

## 2.8 Phasenkontrastdarstellung

In diesem Versuch sollten die morphologischen Veränderungen der Bakterienzellen von *E. coli* und *B. fragilis* unter Einwirkung der jeweiligen Antibiotika untersucht werden.

### 2.8.1 Verfahren der Phasenkontrastdarstellung

Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurde eine Kolonie von einer über Nacht bebrüteten Agarplatte mit *E. coli* in MHB überimpft und für 12 h schüttelnd inkubiert. Von dieser Suspension wurde dann die Keimdichte von  $1,2 \times 10^8$  KBE eingestellt, was einem Mc Farland-Standard 4,0 oder einer OD von 1,0 bei 550 nm entsprach.

Anschließend wurden je 3 ml der Keimsuspension mit 100 µl des jeweiligen Antibiotikums in 2- und 50-facher MHK versehen. Weitere 3 ml der Keimsuspension blieben antibiotikafrei und wurden als Kontrolle mitgeführt.

Die Proben wurden bei 37°C schüttelnd inkubiert. Nach 30, 60 und 120 min Inkubationszeit wurden je 100 µl der Proben unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet.

Eine Photodokumentation war aufgrund einer defekten Mikroskopkamera nicht möglich.

### 2.8.2 Besonderheiten bei *B. fragilis*

Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurden Kolonien der 48 h alten Keimes in Thioglycolat überimpft und anschließend streng anaerob im Anaerobiertopf mit einem Volumen von 2,5 Liter mit Anaerokult A-Zusatz für 12 h schüttelnd inkubiert. Danach erfolgten Photometerabgleich und KBE-Einstellung wie im Versuch zu *E. coli*. Der Antibiotikaeinsatz wurde ebenfalls, wie oben für *E. coli* beschrieben, durchgeführt, wobei Ceftazidim gegen Cefoxitin ausgetauscht wurde.

Nach schüttelnder Inkubation in anaerobem Milieu, aber sonst gleichen Bedingungen wie zu *E. coli*, fand die Phasenkontrastmikroskopie zu den Inkubationszeitpunkten 90, 120 und 240 min., identisch zu den *E. coli* -Mikroskopien, statt.

Auch hier war eine Photodokumentation aufgrund der defekten Mikroskopkamera nicht durchzuführen.

## 2.9 Statistik

### 2.9.1 Post Hoc Test nach Tukey

Die Mittelwerte der im ELISA und chromogenen LAL-Test gemessenen Endotoxinkonzentrationen sowie die Mittelwerte der im Zytokin-ELISA gemessenen Zytokinkonzentrationen haben sich bezüglich der untersuchten Gruppen Imipenem, Ceftazidim, Moxifloxacin und Kontroll-Gruppe unterschieden. Daher wurde mit Hilfe des Post-Hoc-Tests nach Tukey im SPSS-Programm (SPSS = Statistical Package for the Social Sciences) die Differenz zwischen den gepaarten Mittelwerten berechnet, die auf einem Alpha-Niveau von 0,05 signifikant voneinander abwichen, und als p-Wert im Ergebnisteil angegeben [20, 23, 72].

### 2.9.2 Korrelationskoeffizient nach Pearson

Durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson wurde der lineare Zusammenhang der in den unterschiedlichen Tests wie ELISA, chromogener LAL-Test und Zytokin-ELISA gemessenen Mittelwerte, aus jeweils n=3 Experimenten, innerhalb der einzelnen untersuchten Gruppen geprüft, wobei die Korrelation um so

---

höher war, je mehr der berechnete Wert in einem Bereich von -1 bis +1 von 0 abwich [61, 108, 143].

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Minimale Hemmkonzentration (MHK)

##### 3.1.1 MHK von E. coli

Es wurde die minimale Hemmkonzentration jedes eingesetzten Antibiotikums für drei verschiedene Inokula ( $5 \times 10^5/\text{ml}$ ,  $1 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $1 \times 10^7/\text{ml}$ ) bestimmt, um die antimikrobiellen Pharmaka in vergleichbaren, wirksamen Konzentrationen in den weiteren Experimenten verwenden zu können. Begleitend erfolgte zu jedem Versuch eine Kontrolle der Einsaat sowohl in den antibiotikaversehenen Inkubationsansätzen, als auch in dem pharmakafreien Kontrollansatz in Doppelbestimmung, um Ergebnisverfälschungen durch irreguläres Bakterienwachstum zu vermeiden.

Die ermittelten Ergebnisse der MHK-Bestimmungen werden in Tabelle 2 dargestellt.

*Tabelle 2: Minimale Hemmkonzentration der eingesetzten Antibiotika bei verschiedenen Inocula von Escherichia coli*

Testsubstanz	Minimale Hemmkonzentration (MHK) in mg/ml		
	initiale Keimzahl		
	$5 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
Imipenem	0,25	0,25	6
Ceftazidim	0,125	0,125	1,5
Moxifloxacin	0,06	0,06	1,5

Für ein Inokulum von  $5 \times 10^5$  und  $1 \times 10^6$  KBE von E. coli wurde für Imipenem jeweils eine MHK von 0,25, für Ceftazidim von 0,125 und für Moxifloxacin für 0,06 mg/ml bestimmt. Bei einem Inokulum von  $1 \times 10^7$  KBE lag die MHK von Imipenem bei 6, von Moxifloxacin und Ceftazidim bei 1,5 mg/ml. Dieser Anstieg der MHK bei höheren Inokula ist für  $\beta$ -Lactamasen ein bekanntes Phänomen, auch Inokulum-Effekt genannt.

##### 3.1.2 MHK von B. fragilis

Wie unter 3.1.1 beschrieben, wurde auch für B. fragilis die MHK jedes eingesetzten Antibiotikums für drei verschiedene Inokula, analog zu E. coli, bestimmt. Mit dem Keim B. fragilis wurde zunächst zweimal der komplette Versuch unter dem Einsatz

des Cephalosporins Ceftazidim durchgeführt, das sich jedoch als unwirksam gegenüber dem Anaerobier *B. fragilis* erwies. So wurde es gegen das Cephalosporin Cefoxitin ausgetauscht, mit dem dann schließlich die komplette MHK-Bestimmung dreimal erfolgte. Die aus den Versuchen ermittelten Ergebnisse werden nun wiederum in Tabelle 3 wiedergegeben.

*Tabelle 3: Minimale Hemmkonzentration der eingesetzten Antibiotika bei verschiedenen Inocula von Bacteroides fragilis*

Testsubstanz	Minimale Hemmkonzentration (MHK) in mg/ml		
	initiale Keimzahl		
	$5 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^7$
Imipenem	0,015	0,015	0,125
Cefoxitin	1	1	2
Moxifloxacin	0,125	0,125	0,5

Für *B. fragilis* konnten für die Inokula von  $5 \times 10^5$  sowie  $1 \times 10^6$  KBE unter Hemmung durch Imipenem eine MHK von 0,015, unter Hemmung durch Cefoxitin von 1 und unter Hemmung von Moxifloxacin von 0,125 mg/ml gemessen werden. Bei einer KBE von  $1 \times 10^7$  betrug die MHK für Imipenem 0,125, für Cefoxitin 2 und für Moxifloxacin 0,5 mg/ml. Auch hier gilt, dass der Anstieg der MHK bei höheren Inokula für  $\beta$ -Lactame ein bekanntes Phänomen ist.

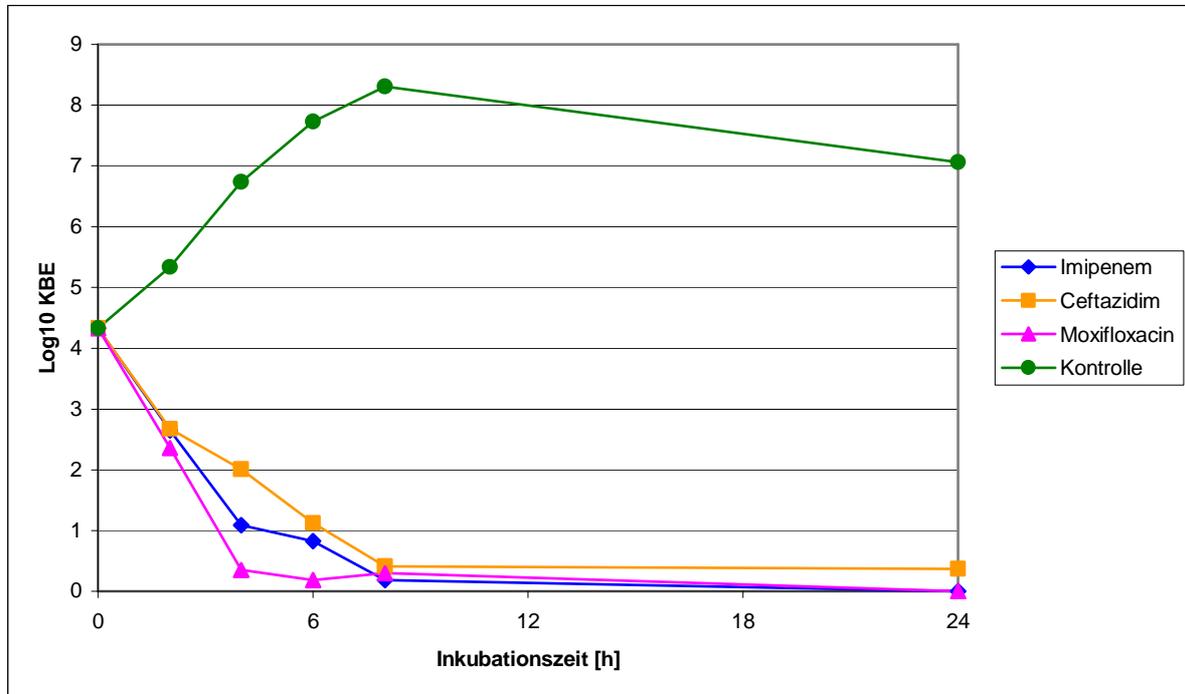
### 3.2 Abtötungskinetik der Antibiotika

#### 3.2.1 Abtötungskinetik der Antibiotika zu *E. coli*

Die Zellzahlkontrolle wurde parallel zum Wachstumsversuch mit dessen Proben durchgeführt, um einen Überblick über die initial eingesetzte Keimzahl und die im weiteren Versuchsverlauf vorhandenen KBE zu haben. Dazu wurde wie unter Material und Methoden Punkt 2.4.1 beschrieben, verfahren. Nach Auszählung der Kolonien auf den Agarplatten wurde die entsprechende KBE/ml nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Anzahl der Kolonien} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10}{100 \mu\text{l}}$$

Die koloniebildenden Einheiten für die Versuche zu 2 x MHK werden in dem anschließenden Kurvendiagramm dargestellt. Es zeigt die Abtötungskinetik von *E. coli* in Gegenwart der verschiedenen Antibiotika sowie der antibiotikafreien Kontrolle.

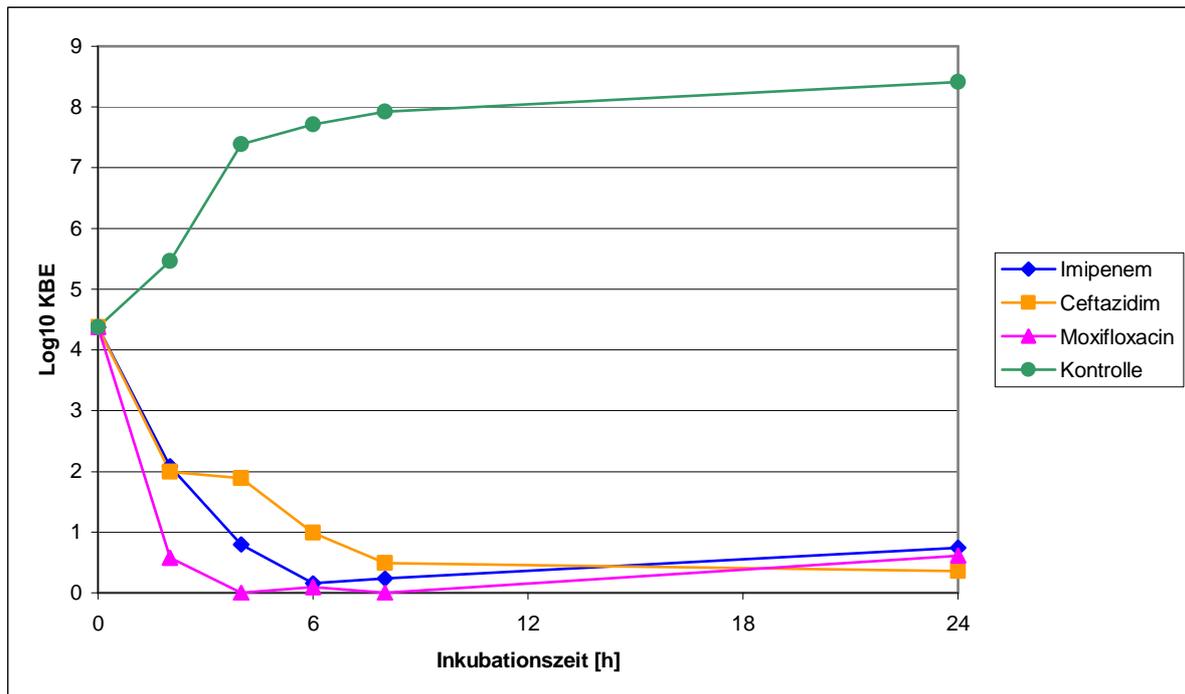


KBE, koloniebildende Einheiten

Abbildung 16: Abtötungskinetik von *Escherichia coli*: Darstellung der Mittelwerte aller koloniebildenden Einheiten in logarithmischer Form bei 2-facher minimaler Hemmkonzentration als Kurvendiagramm

Bei einer eingesetzten Konzentration der Antibiotika entsprechend der 2-fachen MHK zeigte sich schon während der ersten zwei Inkubationstunden eine deutliche Verminderung der initialen koloniebildenden Einheiten und somit eine schnelle Abtötung der Bakterien. Bereits nach 8 h Inkubation waren die Keime unter Einfluss aller drei verwendeten Antibiotika fast vollständig abgetötet, wobei kaum Unterschiede zwischen den drei Antibiotika zu verzeichnen waren. So wurde die rascheste Keimabtötung unter der Moxifloxacinwirkung festgestellt, unter Imipenem kam es zu vergleichbar geringem Bakterienwachstum, unter Ceftazidim hingegen kam das stärkste zu Stande. In dem Kontrollansatz wurde bis zu einem Inkubationszeitpunkt von 8 h ein Keimzahlanstieg um 4 log-Stufen gemessen. Danach kam es zu einer Keimreduktion von ca.  $10^1$  Keimen, was durch das zu geringe Nährstoffangebot aufgrund der extrem hohen Keimzahl zu erklären war.

In dem nachfolgenden Kurvendiagramm sind nun die koloniebildenden Einheiten für 10 x MHK wiedergegeben.

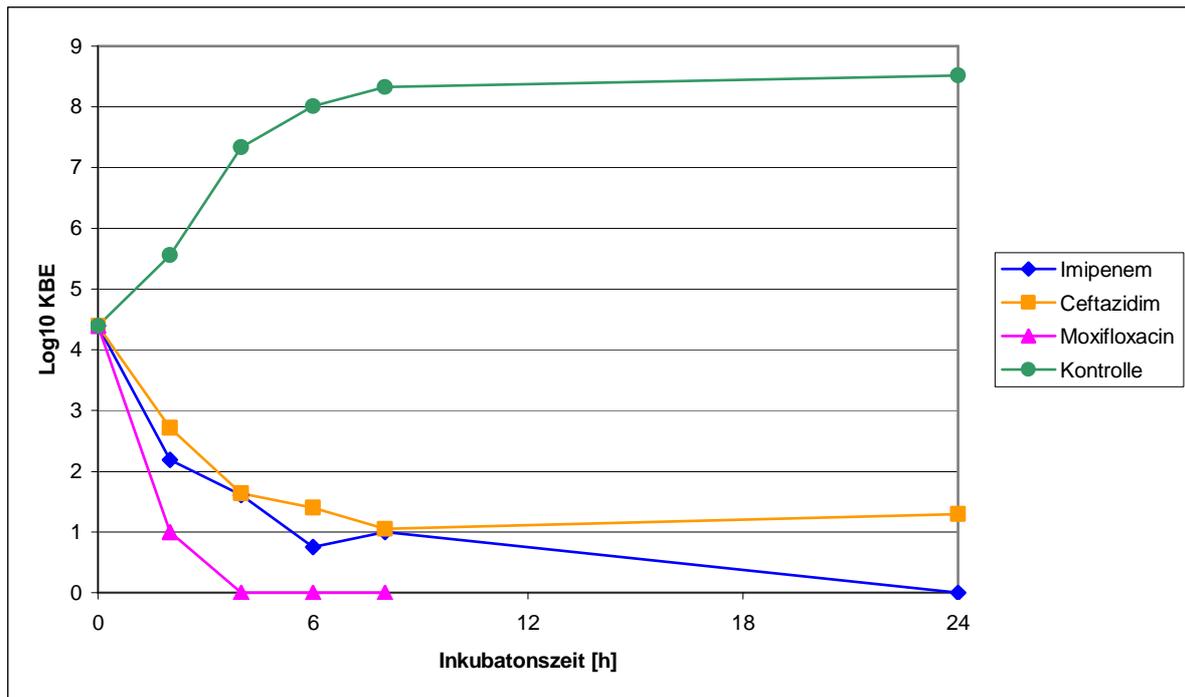


KBE, koloniebildende Einheiten

Abbildung 17: Abtötungskinetik von *Escherichia coli*: Darstellung der Mittelwerte aller koloniebildenden Einheiten in logarithmischer Form bei 10-facher minimaler Hemmkonzentration als Kurvendiagramm

Im Vergleich zu den ermittelten Werten bei 2-facher MHK zeigte sich für den Antibiotikaeinsatz mit 10-facher MHK eine ähnliche Abtötungskinetik, besonders für Imipenem und Ceftazidim. Unter der Moxifloxacin-Wirkung wurden die Keime jedoch bereits nach 2 h um fast 2 Zehnerpotenzen stärker lysiert als bei 2-facher MHK. Im Diagramm wurde das in der deutlich steiler abfallenden Moxifloxacin -Kurve bei 10-facher MHK sichtbar.

Wie bereits oben für 2 x und 10 x MHK dargestellt, folgt nun das Kurvendiagramm für die koloniebildenden Einheiten bei 50 x MHK.



KBE, koloniebildende Einheiten

Abbildung 18: Abtötungskinetik von *Escherichia coli*: Darstellung der Mittelwerte aller koloniebildenden Einheiten in logarithmischer Form bei 50-facher minimaler Hemmkonzentration als Kurvendiagramm

Auch bei 50-facher MHK ließen sich die für alle drei Antibiotika ermittelten KBE mit denen für 2-fache und 10-fache MHK vergleichen, wobei unter Moxifloxacin-Einfluss die KBE zu jedem Messzeitpunkt ca. eine Zehnerpotenz unter der von Imipenem und Ceftazidim lagen.

Bei Betrachtung aller Daten wies Moxifloxacin das stärkste Abtötungspotential auf.

### 3.2.2 Abtötungskinetik der Antibiotika zu *B. fragilis*

Wie unter 3.2.1 zu dem Keim *E. coli* dargestellt, wurde auch eine Zellzahlkontrolle des Wachstumsversuches zu *B. fragilis* erstellt.

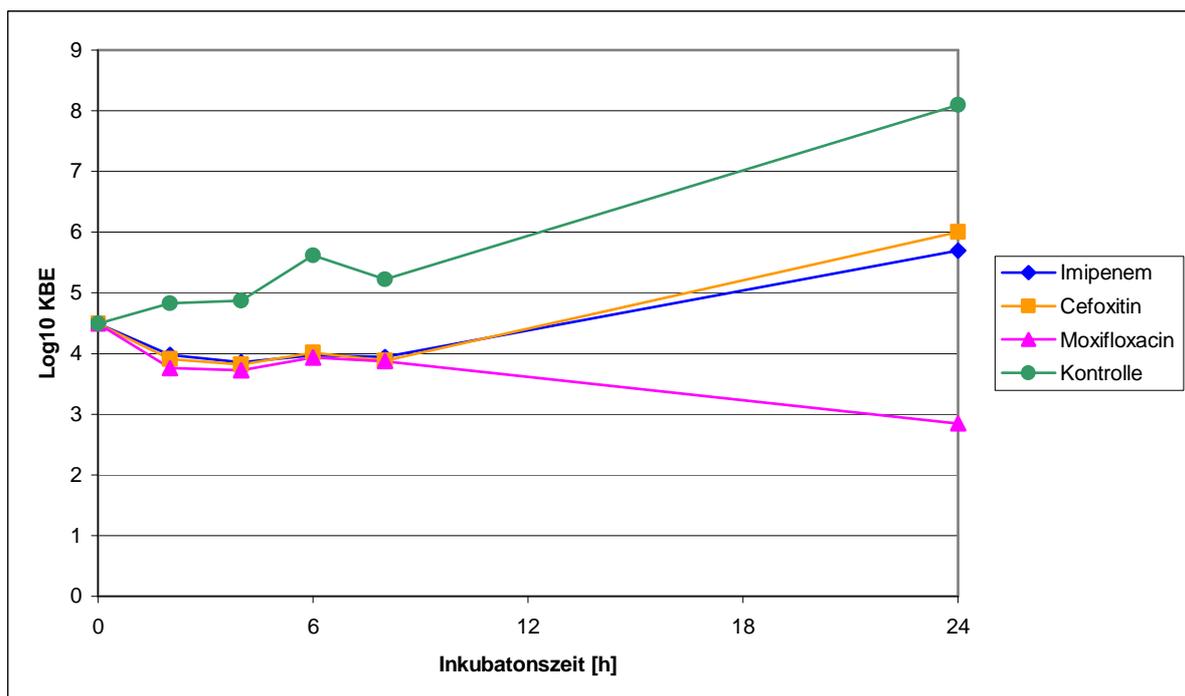
Bei allen Versuchen wurde auch hier zu jedem Inkubationszeitpunkt, d.h. sowohl zur anfangs eingesetzten Keimzahl, als auch zu der im Versuchsverlauf vorhandenen Kolonienzahl eine Zellzahlkontrolle durchgeführt.

In diesem Versuchsteil galt es besonders, streng anaerobe Verhältnisse durch Anaerobiertopf und Anaerokult A aufrechtzuerhalten.

Nach Auszählung der Kolonien auf den Agarplatten wurde die entsprechende KBE/ml nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\text{Anzahl der Kolonien} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10}{100 \mu\text{l}}$$

Das nachfolgende Kurvendiagramm gibt die koloniebildenden Einheiten für 2 x MHK unter Einwirkung der drei Antibiotika sowie der antibiotikafreien Kontrolle wieder und stellt so die entsprechende Abtötungskinetik von *B. fragilis* dar.



*KBE, koloniebildende Einheiten*

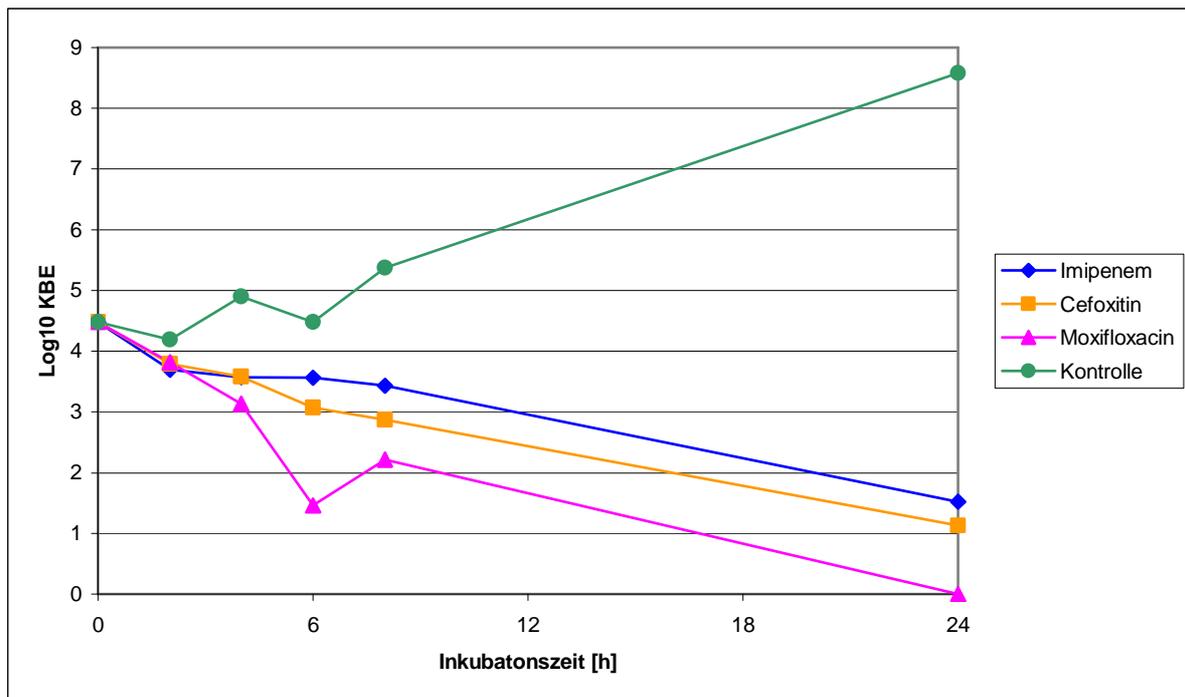
*Abbildung 19: Abtötungskinetik von Bacteroides fragilis: Darstellung der Mittelwerte aller koloniebildenden Einheiten in logarithmischer Form bei 2-facher minimaler Hemmkonzentration als Kurvendiagramm*

Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass das Keimwachstum in der antibiotikafreien Kontrolle ungehemmt stattfinden konnte. Vom Zeitpunkt 0 über einen 24-stündigen Inkubationszeitraum kam es zu einer Keimvermehrung von 3,6 log- Stufen.

Im Gegensatz dazu wurde das Keimwachstum unter Antibiotikaeinfluss deutlich gehemmt. Im Inkubationszeitraum von 0 bis 8 h kam es unter allen drei eingesetzten Antibiotika zu einem fast identischen Kurvenverlauf, der jeweils keine KBE-Zunahme von *B. fragilis* zeigte. Im weiteren Versuchsverlauf von 8 bis 24h kam es unter Cefoxitin und Imipenem dann jedoch zu einem deutlichen Kurvenanstieg, wobei eine

KBE-Zunahme von 2 log-Stufen zu verzeichnen war. Unter Moxifloxacin wurde *B. fragilis* dagegen im Inkubationszeitintervall von 8 bis 24 h um über 1 log- Stufe abgetötet.

In dem folgenden Kurvendiagramm ist nun die Abtötungskinetik der koloniebildenden Einheiten für 10 x MHK wiedergegeben.

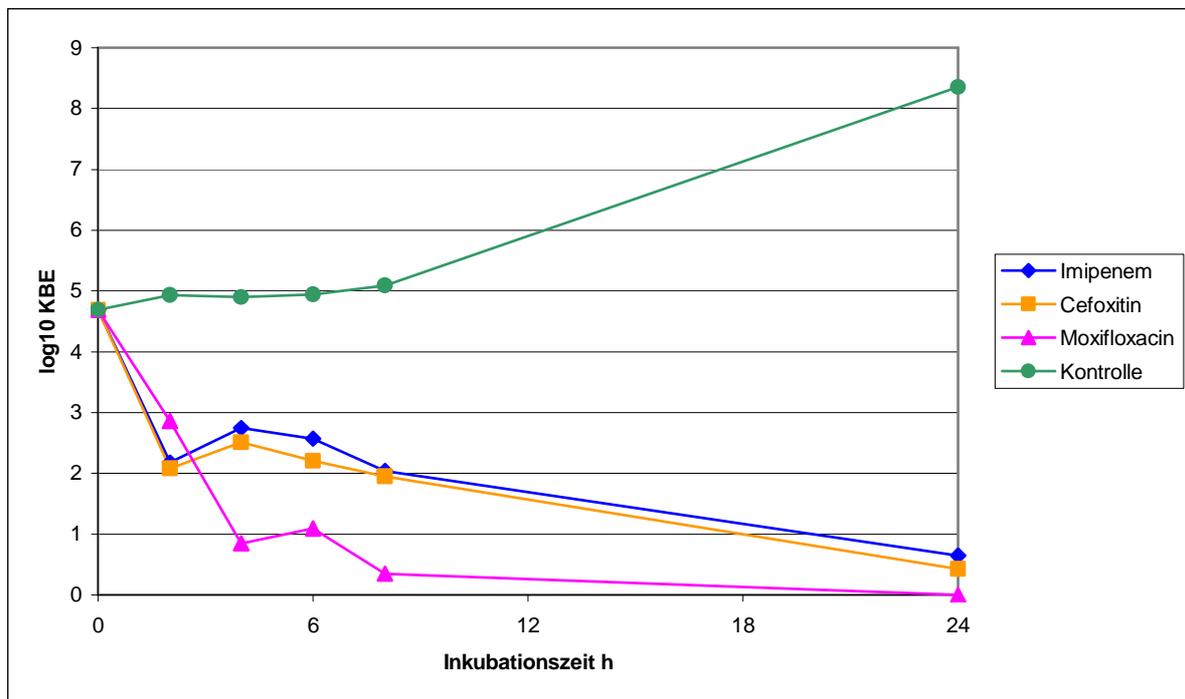


*KBE, koloniebildende Einheiten*

*Abbildung 20: Abtötungskinetik von Bacteroides fragilis: Darstellung der Mittelwerte aller koloniebildenden Einheiten in logarithmischer Form bei 10-facher minimaler Hemmkonzentration als Kurvendiagramm*

Die Abbildung zeigt für die ungehemmt wachsenden Kontrollansätze, wie zu erwarten war, den gleichen Kurvenverlauf wie im Diagramm zu 2 x MHK. Für die mit Antibiotika behandelten Gruppen unterschieden sich die einzelnen Verläufe jedoch stark von denen zu 2 x MHK. Für alle drei Antibiotika kam es bereits nach einem Inkubationszeitraum von 4 h zu einer KBE-Verminderung von mehr als einer Zehnerpotenz. Unter Imipenem und Cefoxitin wurde *B. fragilis* nach 24 h auf eine nur wenig unterschiedliche KBE von  $10^{1,5}$  bzw.  $10^1$  vermindert, wobei Moxifloxacin den Keim über den beobachteten Versuchszeitraum vollständig eliminieren konnte.

Wie bereits oben für 2 und 10 x MHK dargestellt, folgt nun das Kurvendiagramm mit der Abtötungskinetik für die koloniebildenden Einheiten bei 50 x MHK.



*KBE, koloniebildende Einheiten*

*Abbildung 21: Abtötungskinetik von Bacteroides fragilis: Darstellung der Mittelwerte aller koloniebildenden Einheiten in logarithmischer Form bei 50-facher minimaler Hemmkonzentration als Kurvendiagramm*

Auch aus dem Kurvendiagramm zu 50 x MHK ist für die Kontrollgruppe erneut eine ungehemmte, zu den beiden vorherigen Kontroll-Kurven identische, Keimvermehrung abzulesen. Für die drei Antibiotikagruppen kam es bei 50-facher MHK bereits nach 2 h zu einer starken Keimabtötung von über 2 log-Stufen. Für Imipenem und Cefoxitin war der Kurvenverlauf über den weiteren Versuchsteil fast identisch, wobei es nach 24 h zu einer 99%igen Lyse des Keimes kam, für Moxifloxacin war diese Situation bereits nach 8 h erreicht.

Unter Berücksichtigung aller Daten zeigte Moxifloxacin auch für *B. fragilis*, analog zu den *E. coli*-Daten, die stärkste Keimabtötung.

### 3.3 Ergebnissen- ELISA

#### 3.3.1 Standardgerade

Zunächst musste ein ELISA-System zusammengesellt werden, mit dem alle Proben des Wachstumsversuches zu messen waren. LPS-Konzentration der Standards, Antikörperkonzentration und Probenverdünnung galt es auszutesten und aufeinander abzustimmen.

Für die Standardgerade erwiesen sich nach zahlreichen Vortests LPS-Standards von maximal 512 ng/ml abfallend bis 0 ng/ml als geeignet für die weiteren ELISA-Versuche. Die folgende Tabelle zeigt die im weiteren Versuch eingesetzten Verdünnungsschritte der LPS-Standards für die Standardgerade.

*Tabelle 4: Lipopolysaccharid-Standards des enzyme-linked immunosorbent assay-Systems mit den gemessenen optischen Dichten*

Standard LPS [ng/ml]	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0
OD	1	0,9	0,8	0,7	0,6	0,4	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1

*LPS, Lipopolysaccharid; OD, optische Dichte*

Bei Austestung der Konzentration der LPS-Standards wurde gleichzeitig die optimale Konzentration der beiden verwendeten Antikörper getestet. Die folgende Tabelle gibt die schließlich eingesetzte Menge von mAb 19 und mAb 141 wieder.

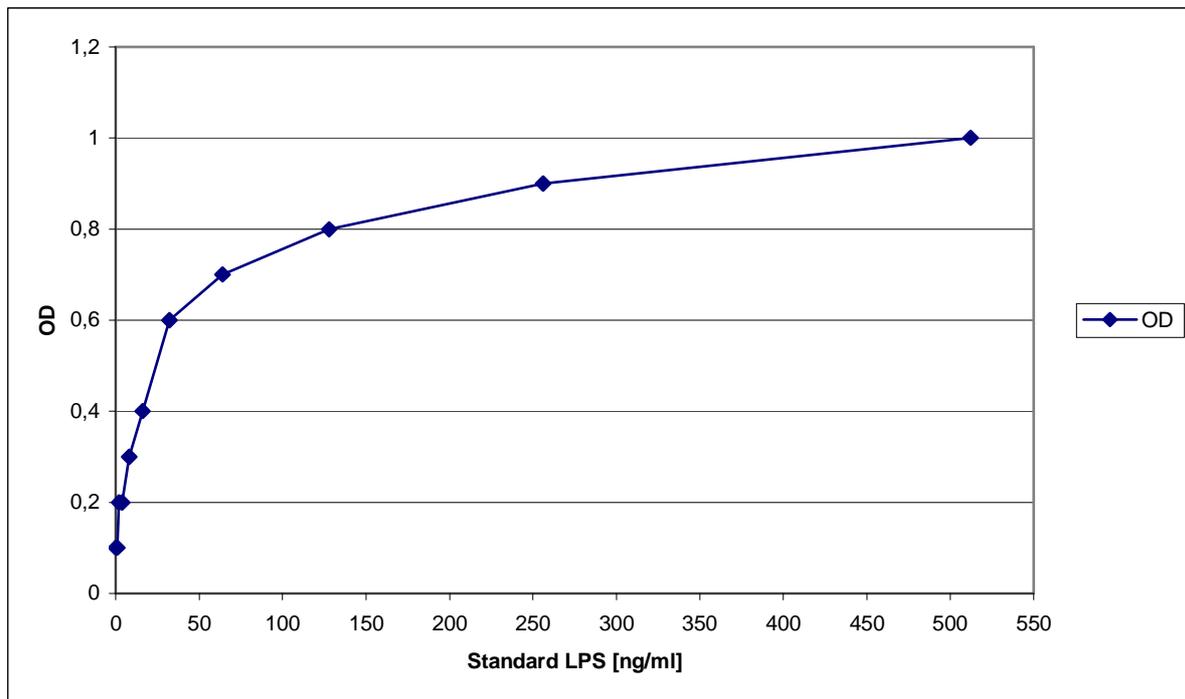
*Tabelle 5: Antikörperkonzentration im enzyme-linked immunosorbent assay-System*

Antikörper	Konzentration
mAb 19	10 µg/ml 100 µl/Vertiefung
mAb 141	1:2000 100 µl/Vertiefung

*mAb, monoklonaler Antikörper*

Auf die zwei Parameter, nämlich LPS-Standardkonzentration und Antikörperkonzentration, mussten zuletzt die Verdünnungen der unbekanntes LPS-Proben aus den Wachstumsversuchen abgestimmt werden. Dabei erwiesen sich sowohl für die unterschiedlichen Antibiotika, bzw. Kontrolle, für die unterschiedlichen MHKs, als auch für die verschiedenen Zeitpunkte der Probennahme nach Inkubation unterschiedliche Verdünnungsstufen als optimal.

Schließlich konnte die unten dargestellte Standardgerade, aus 9 ELISA-Versuchen gemittelt, etabliert werden.



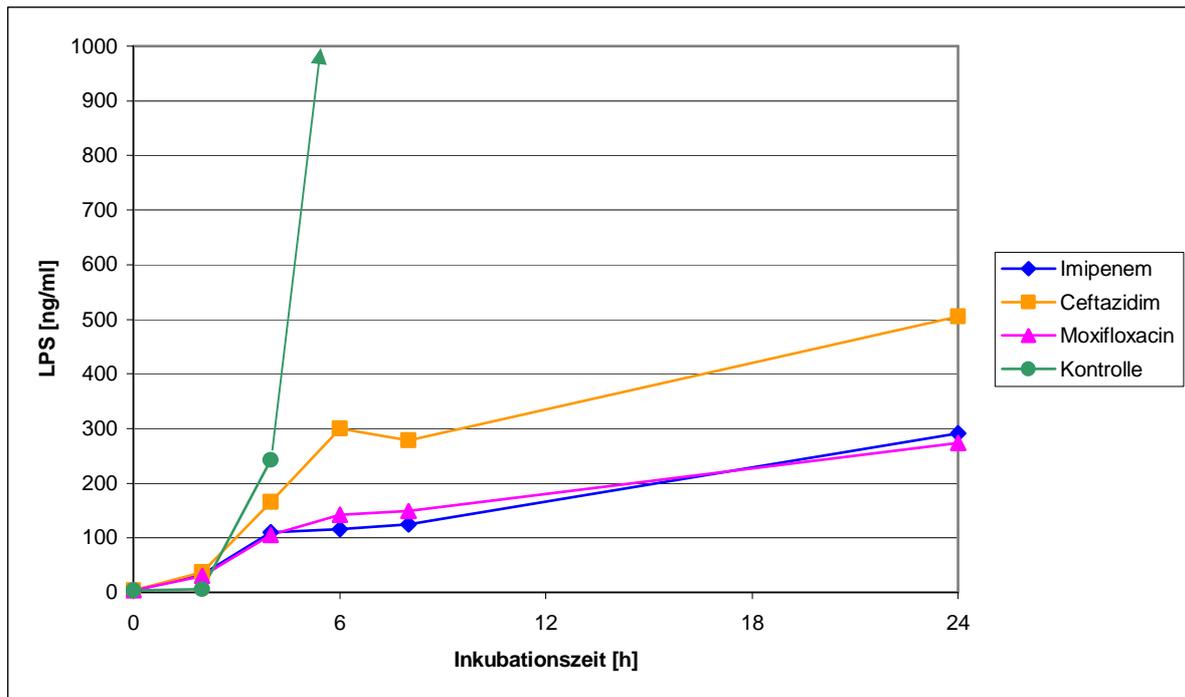
*LPS, Lipopolysaccharid; OD, optische Dichte*

*Abbildung 22: enzyme-linked immunosorbent assay-Standardkurve*

### 3.3.2 Kinetik

Es werden im folgenden Abschnitt zu jeder MHK jeweils die Mittelwerte aus drei Einzelversuchen in einem Kurvendiagramm graphisch abgebildet.

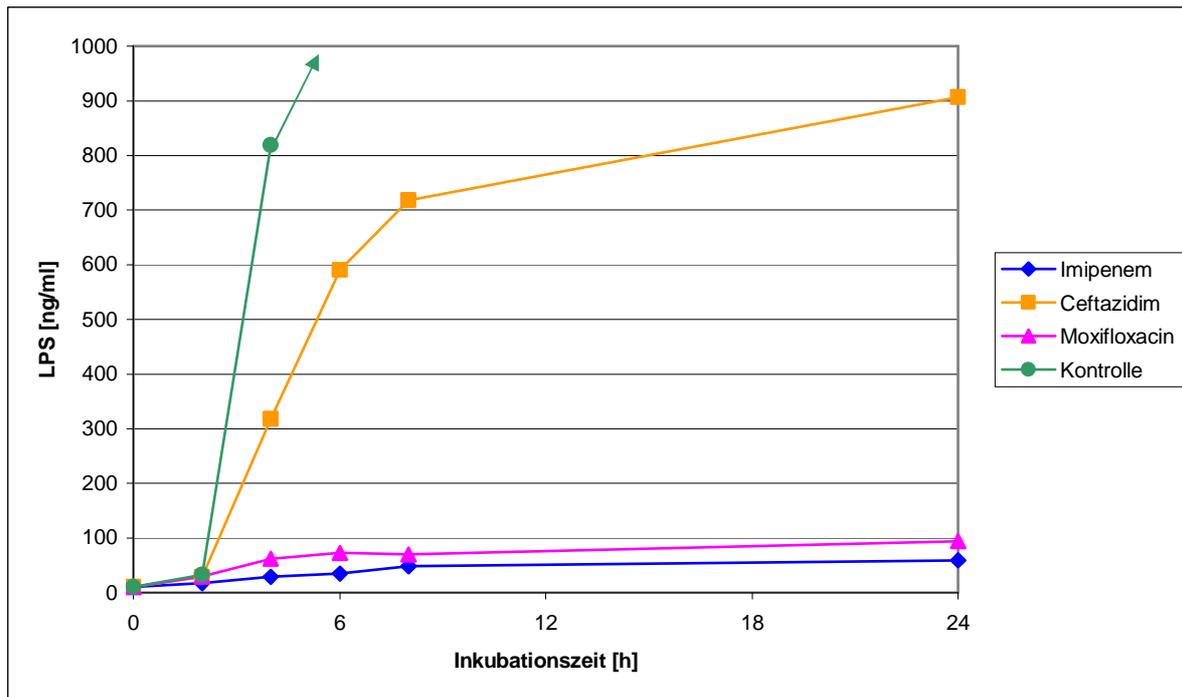
Den Kurvendiagrammen ist jeweils der Verlauf der LPS-Liberation über den Inkubationszeitraum, mit Peak der LPS-Freisetzung zu einem bestimmten Zeitpunkt, zu entnehmen.



LPS, Lipopolysaccharid

Abbildung 23: Freisetzung von Lipopolysaccharid aus *Escherichia coli* in Gegenwart der Antibiotika bei 2-facher minimaler Hemmkonzentration und in Gegenwart der antibiotikafreien Kontrolle

Aus dem Kurvendiagramm zu 2 x MHK kann entnommen werden, dass die LPS-Konzentration in den antibiotikafreien Kontroll-Kulturüberständen am höchsten war. Gegenüber dem Start betrug der Anstieg des LPS im Versuchsverlauf über 24 h in dieser Gruppe etwas mehr als das 20.000-fache. Die für Ceftazidim gemessenen LPS-Konzentrationen lagen während des ganzen Inkubationszeitraumes deutlich niedriger als die der Kontrolle, aber höher als die von Moxifloxacin und Imipenem - nach 24 h Inkubation ca. 200 ng/ml. Die LPS-Werte von Imipenem sowie Moxifloxacin waren während des gesamten Versuchs vergleichbar niedrig und zeigten über den gesamten Inkubationszeitraum einen Anstieg von 200 ng/ml.

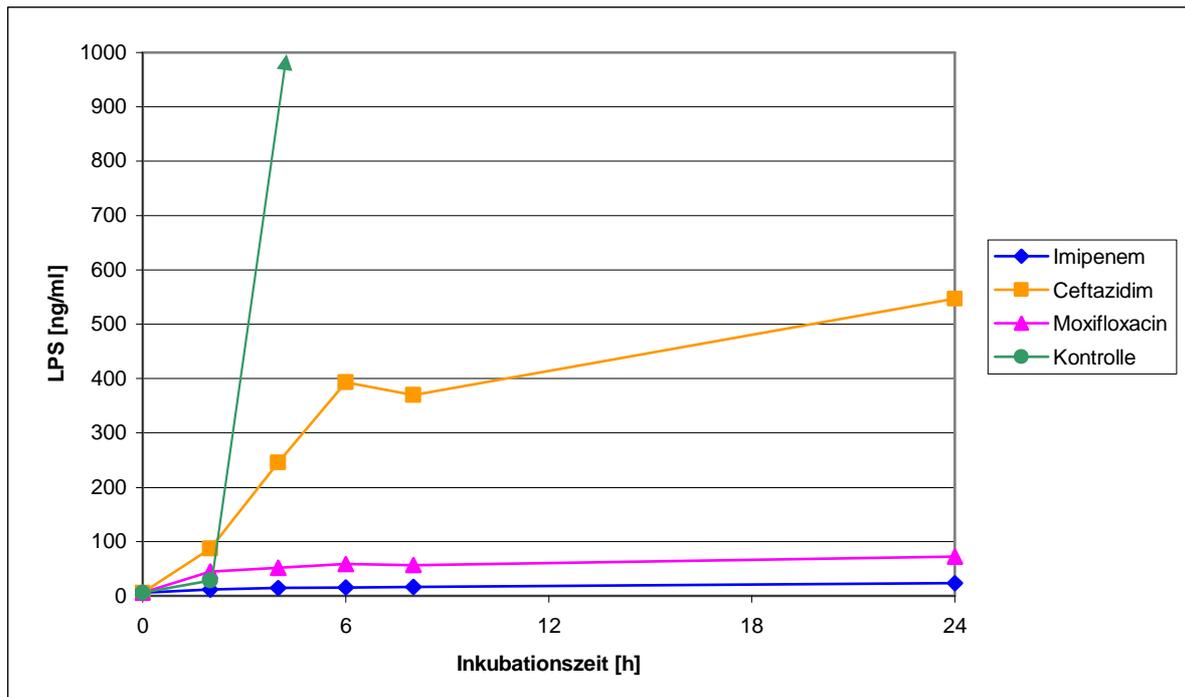


LPS, Lipopolysaccharid

Abbildung 24: : Freisetzung von Lipopolysaccharid aus *Escherichia coli* in Gegenwart der Antibiotika bei 10-facher minimaler Hemmkonzentration und in Gegenwart der antibiotikafreien Kontrolle

Unter dem Antibiotikaeinfluss von 10 x MHK stiegen die Werte der LPS-Liberation für Ceftazidim während des 24-stündigen Inkubationszeitraumes auf das 90-fache des Ausgangswertes an und lagen somit fast 10 x höher als die liberierten LPS-Konzentrationen unter Imipenem- und Moxifloxacin-Einfluss. Diese beiden Antibiotika zeigten kaum Unterschiede in ihrer Beeinflussung der LPS-Freisetzung. Während des gesamten Versuchsverlaufes kam es unter beiden Antibiotika zu einem vernachlässigbar geringen LPS-Anstieg unter dem Faktor 10.

Im Vergleich zu 2 x MHK waren die Unterschiede in der Freisetzung von LPS zwischen Ceftazidim und Imipenem, bzw. Moxifloxacin bei 10-facher MHK insbesondere in den ersten 8 Inkubationsstunden deutlicher. Für Moxifloxacin und Imipenem lagen die LPS-Werte bei 10 x MHK insgesamt niedriger als bei 2 x MHK, während unter Ceftazidim-Einfluss bei 10-facher MHK fast doppelt so viel LPS freigesetzt wurde als bei 2-facher.



LPS, Lipopolysaccharid

Abbildung 25: : Freisetzung von Lipopolysaccharid aus *Escherichia coli* in Gegenwart der Antibiotika bei 50-facher minimaler Hemmkonzentration und in Gegenwart der antibiotikafreien Kontrolle

Bei 50 x MHK war der Unterschied in der LPS-Liberation von Ceftazidim zu Moxifloxacin und Imipenem ähnlich hoch wie bei 10 x MHK, wobei es bereits nach 6 h Inkubationszeit zu einer deutlich höheren LPS-Freisetzung von ca. 200 ng/ml unter Ceftazidim im Vergleich zu Moxifloxacin und Imipenem kam. Nach 24 h Inkubationszeitraum hatte sich dieser Unterschied noch verdeutlicht.

Insgesamt zeigten die drei oben dargestellten Kinetiken, dass durch die Kontrollproben am meisten LPS freigesetzt wurde. Imipenem und Moxifloxacin induzierten eine vergleichbar niedrige LPS-Freisetzung ( $p=0,904$ ). Unter Ceftazidim-Einfluss wurde signifikant mehr Endotoxin liberiert ( $p=0,000$ ).

In der folgenden Tabelle werden diese Ergebnisse nach statistischer Auswertung mit dem SPSS-Programm dargestellt.

Tabelle 6: Post-Hoc-Test nach Tukey, Mehrfachvergleich

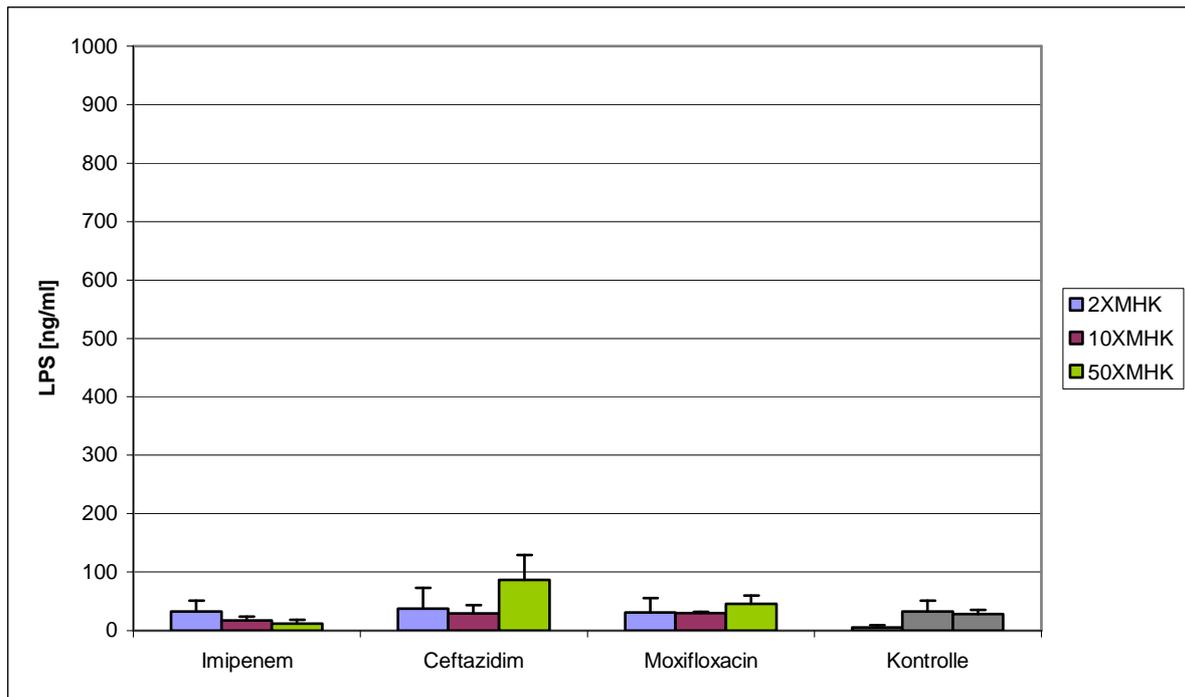
Die dargestellten Werte ergeben sich aus einem Mehrfachvergleich der gemessenen Lipopolysaccharid-Werte, bezogen auf das jeweilige Antibiotikum

(I) Wirkstoff	(J) Wirkstoff	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Imipenem	Ceftazidim	-252,37963(*)	47,702100	<b>,000</b>	-374,12317	-130,63609
	Moxifloxacin	-20,46019	47,702100	<b>,904</b>	-142,20373	101,28336
Ceftazidim	Imipenem	252,37963(*)	47,702100	<b>,000</b>	130,63609	374,12317
	Moxifloxacin	231,91944(*)	47,702100	<b>,000</b>	110,17590	353,66299
Moxifloxacin	Imipenem	20,46019	47,702100	<b>,904</b>	-101,28336	142,20373
	Ceftazidim	-231,91944(*)	47,702100	<b>,000</b>	-353,66299	-110,17590

Weitere statistische Auswertungen sind dem Anhang 7.2 zu entnehmen.

### 3.3.3 Säulendiagramm mit Standardabweichung

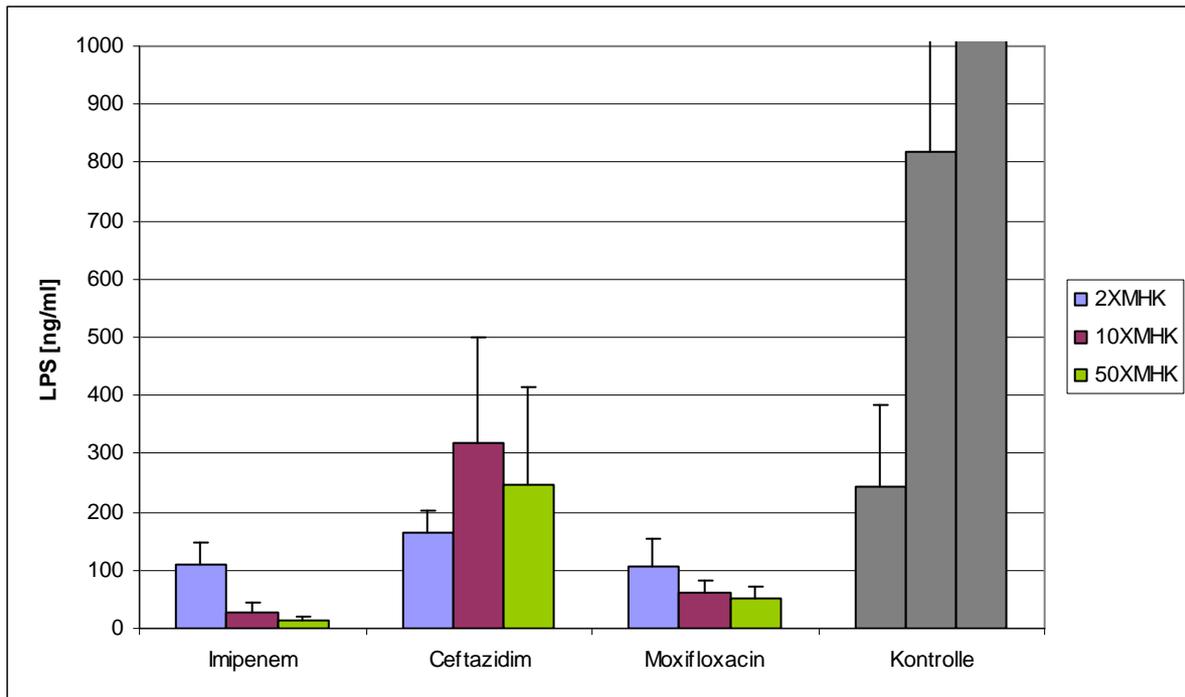
Nachdem im vorausgehenden Abschnitt die LPS-Liberation zu jeder MHK als Verlaufskurve dargestellt worden war, vergleichen die Säulendiagramme dieses Abschnittes die LPS-Konzentration der Antibiotikaproben, bzw. Kontroll-Proben bezogen auf die verschiedenen MHKs zu jedem Inkubationszeitpunkt separat.



LPS, Lipopolysaccharid; MHK, minimale Hemmkonzentration

Abbildung 26: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der Lipopolysaccharid-Konzentrationen bei 2-, 10-, 50-facher minimaler Hemmkonzentration nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden für die drei Antibiotika und die Kontrolle als Säulendiagramm

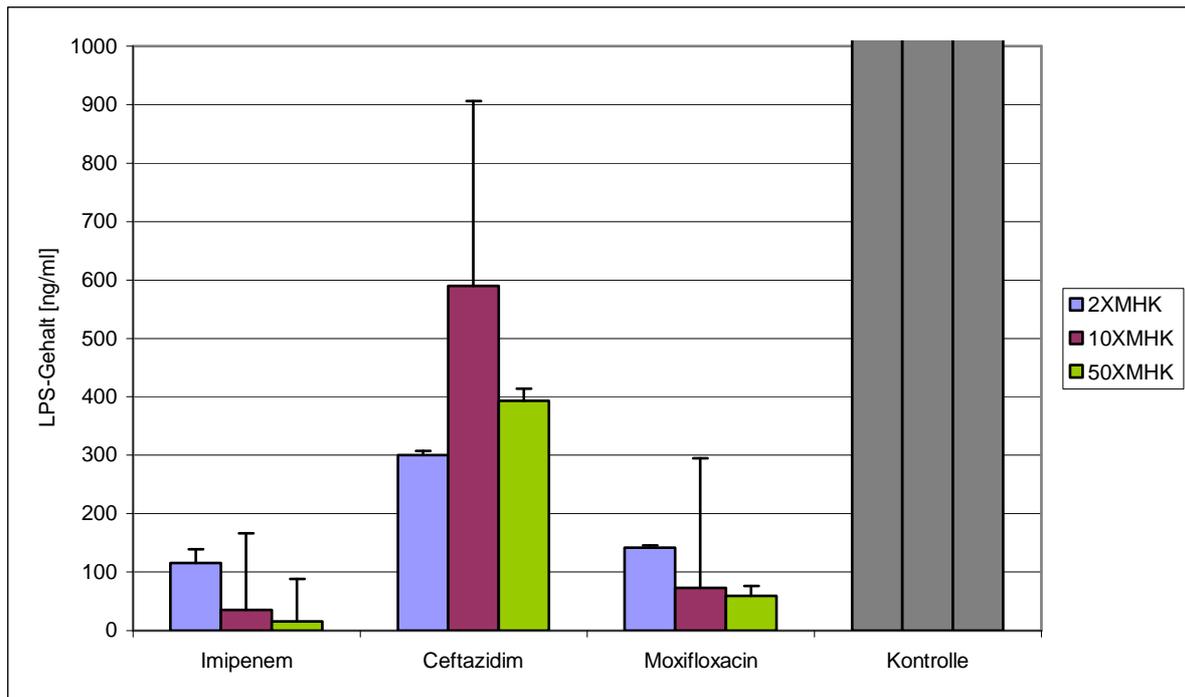
Nach 2-stündiger Inkubationszeit war zwischen den antibiotikabehandelten Probenansätzen und der Kontrolle kein Unterschied in der LPS-Liberation zu verzeichnen, lediglich für die Ceftazidimproben bei 50-facher MHK war eine Tendenz zu einer stärkeren LPS-Liberation abzulesen.



LPS, Lipopolysaccharid; MHK, minimale Hemmkonzentration

Abbildung 27: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der Lipopolysaccharid-Konzentrationen bei 2-, 10-, 50-facher minimaler Hemmkonzentration nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden für die drei Antibiotika und die Kontrolle als Säulendiagramm

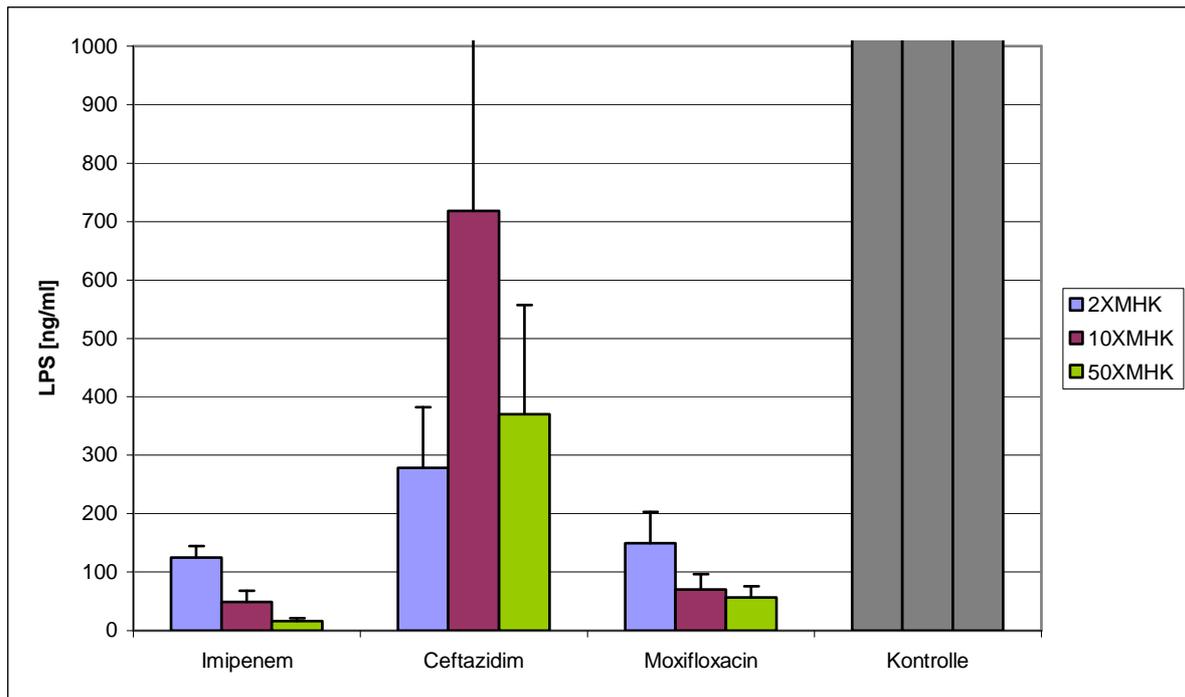
Nach einer Inkubationszeit von 4 h wurde in den Kontrollansätzen bereits deutlich mehr LPS freigesetzt, als durch die drei antibiotikabehandelten Proben. Unter diesen setzten Imipenem und Moxifloxacin vergleichbar geringe Mengen an LPS frei, wobei die Menge der LPS-Liberation mit zunehmender MHK sank, so z.B. von 2 x MHK zu 50 x MKH für Imipenem um fast 90 ng/ml, für Moxifloxacin um über 50 ng/ml. Ceftazidim induzierte bereits nach dieser kurzen Inkubationszeit für alle drei MHKs eine deutlich höhere LPS-Liberation als Imipenem und Moxifloxacin. Weiter zeigte sich für Ceftazidim, anders als unter Moxifloxacin- und Imipenem-Einfluß, bei 10 x MHK die höchste LPS-Ausüttung, für 50 x MHK um 60 ng/ml abfallend und um weitere 80 ng/ml abfallend zu 2 x MHK.



LPS, Lipopolysaccharid; MHK, minimale Hemmkonzentration

Abbildung 28: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der Lipopolysaccharid-Konzentrationen bei 2-, 10-, 50-facher minimaler Hemmkonzentration nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden für die drei Antibiotika und die Kontrolle als Säulendiagramm

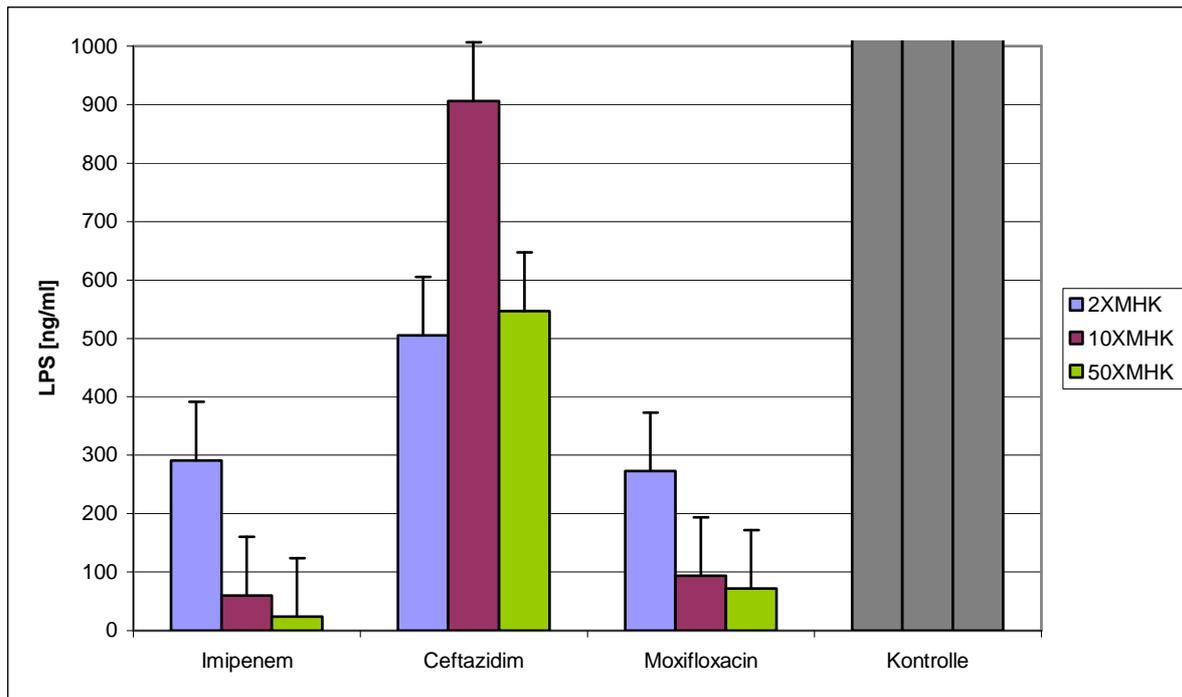
Nach 6 h Inkubation wurde die sich bereits nach 4 h Inkubationszeit aufzeigende Tendenz verdeutlicht. Die Kontrollproben setzten am meisten LPS frei, Imipenem und Moxifloxacin vergleichbar geringe Mengen mit Abfällen der LPS-Konzentration von 2 zu 50 x MHK. Ceftazidim setzte bei 10 x MHK über 500 ng/ml mehr LPS frei als Moxifloxacin und Imipenem. Für 50 x MHK war der Unterschied geringer und lag bei über 300 ng/ml, bei 2 x MHK betrug der Unterschied nur noch 150 ng/ml.



LPS, Lipopolysaccharid; MHK, minimale Hemmkonzentration

Abbildung 29: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der Lipopolysaccharid-Konzentrationen bei 2-, 10-, 50-facher minimaler Hemmkonzentration nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden für die drei Antibiotika und die Kontrolle als Säulendiagramm

Nach 8-stündiger Inkubation der Proben verdeutlichte sich die bereits nach 4 und 6 h entwickelnde Tendenz weiter. So waren in den Kontrollansätzen die deutlich höchsten LPS-Mengen zu messen, gefolgt von Ceftazidim. Unter diesem Antibiotikum wurde bei 10 x MHK im Vergleich zu den weiteren Antibiotikagruppen am meisten LPS freigesetzt, über 10 x mehr als unter Moxifloxacin und Imipenem. Bei 50 x MHK sank der Unterschied, bei 2 x MHK setzte Ceftazidim nur noch ca. 2 x mehr LPS frei als Imipenem oder Moxifloxacin. Diese beiden Antibiotika setzten wiederum gleich wenig LPS frei, wobei die Menge mit steigender MHK von 2 zu 50 x um ca. 100 ng/ml sank.



LPS, Lipopolysaccharid; MHK, minimale Hemmkonzentration

Abbildung 30: Mittelwerte mit zugehörigen Standardabweichungen der Lipopolysaccharid-Konzentrationen bei 2-, 10-, 50-facher minimaler Hemmkonzentration nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden für die drei Antibiotika und die Kontrolle als Säulendiagramm

Bei Abschluss des Versuches nach 24 h Inkubation hatte sich die bereits in den vorherigen Inkubationsschritten aufgezeigte Tendenz weiter verstärkt. So ist den Säulendiagrammen zum ELISA-Test, wie schon den Kurvendiagrammen, zu entnehmen, dass in den antibiotikafreien Kontroll-Kulturüberständen die höchsten LPS-Konzentrationen gemessen wurden, gefolgt von Ceftazidim. In dieser Antibiotikagruppe wurde bei 10 x MHK am meisten LPS liberiert, abfallend über 50 x MHK zu 2 x MHK mit einem Unterschied von 400 ng/ml. Moxifloxacin und Imipenem setzen deutlich geringere Mengen LPS frei, wobei der Unterschied zu Ceftazidim bei 10 x MHK mit einer über 10 mal geringeren LPS-Liberation am deutlichsten war. Weiter zeigte sich für Imipenem und Moxifloxacin, dass umso weniger LPS liberiert wurde, je höher die MHK war. Die Erklärung dafür ist in der geringeren Erregerdichte und damit verbunden geringeren LPS-Produktion zu sehen.

### 3.4 Ergebnisse - chromogener LAL-Test

#### 3.4.1 Standardgerade zu E. coli

Im chromogenen LAL-Test galt es zunächst, die Standardgerade und die Verdünnung der zu messenden Wachstumsversuchsproben so aufeinander abzustimmen, dass die gemessenen ODs der unbekanntenen Proben in den linearen Bereich der Standardgerade fielen.

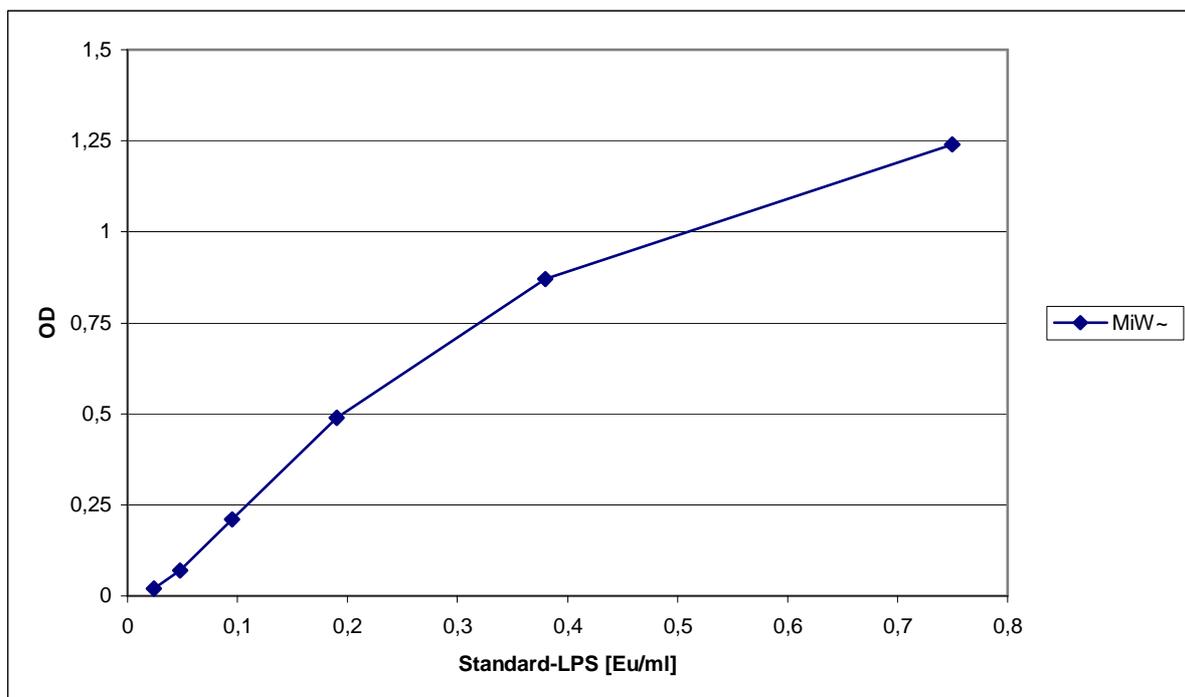
Die aus 9 chromogenen LAL-Tests gemittelte Standardgerade wird in der folgenden Tabelle gezeigt.

Tabelle 21: Typische Standardkurve des chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests

	Standard Nr.					
	1	2	3	4	5	6
Standard-LPS	0,024	0,048	0,095	0,19	0,38	0,75
Optische Dichte $\pm$ SD	$0,02 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,04$	$0,21 \pm 0,08$	$0,49 \pm 0,15$	$0,87 \pm 0,25$	$1,24 \pm 0,19$

LPS, Lipopolysaccharid; n=9 Experimente; SD, Standardabweichung

Aus oben aufgeführter Tabelle resultiert das folgende Kurvendiagramm.



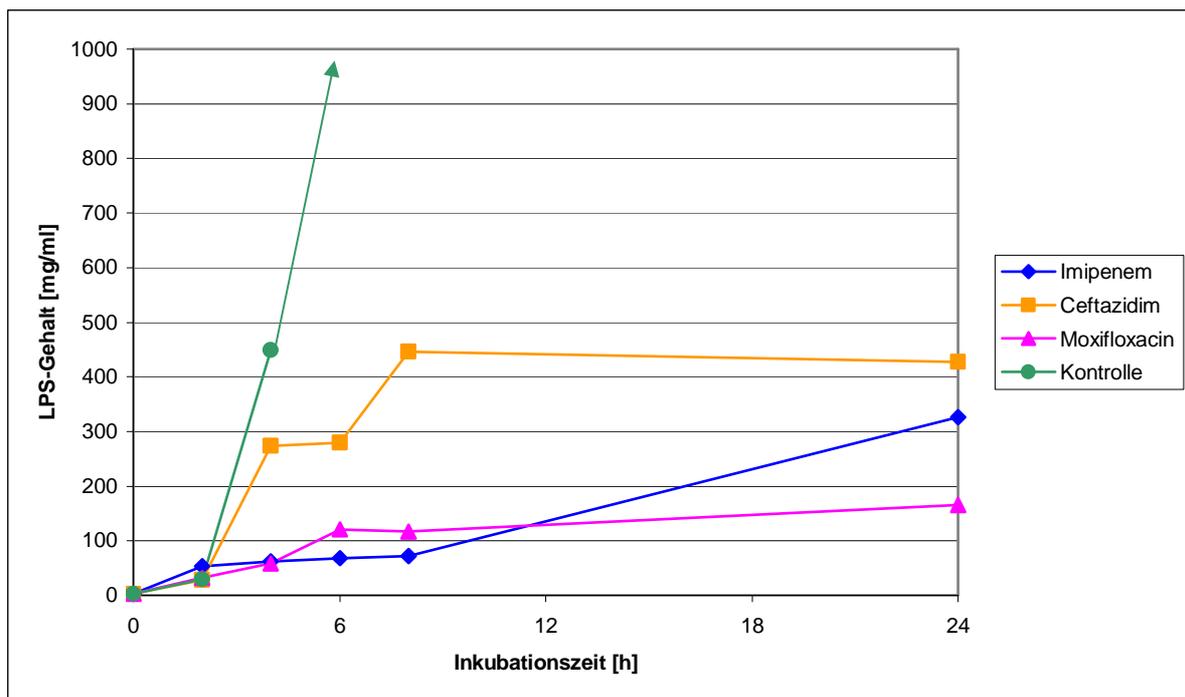
MiW, Mittelwert; OD, optische Dichte

Abbildung 31: Standardgerade des chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests

Da die Standardgerade aus kommerziell erworbenen E.coli- LPS erstellt wurde, war diese somit nicht variabel. Daher mussten die Verdünnungen der LPS-Proben dem linearen Bereich der Standardgerade angepasst werden. Dabei erwiesen sich unterschiedliche Verdünnungsschritte von 1:50 bis zu 1:2.000.000 für die verschiedenen Antibiotika, MHKs und auch die einzelnen Inkubationszeitpunkte als ideal.

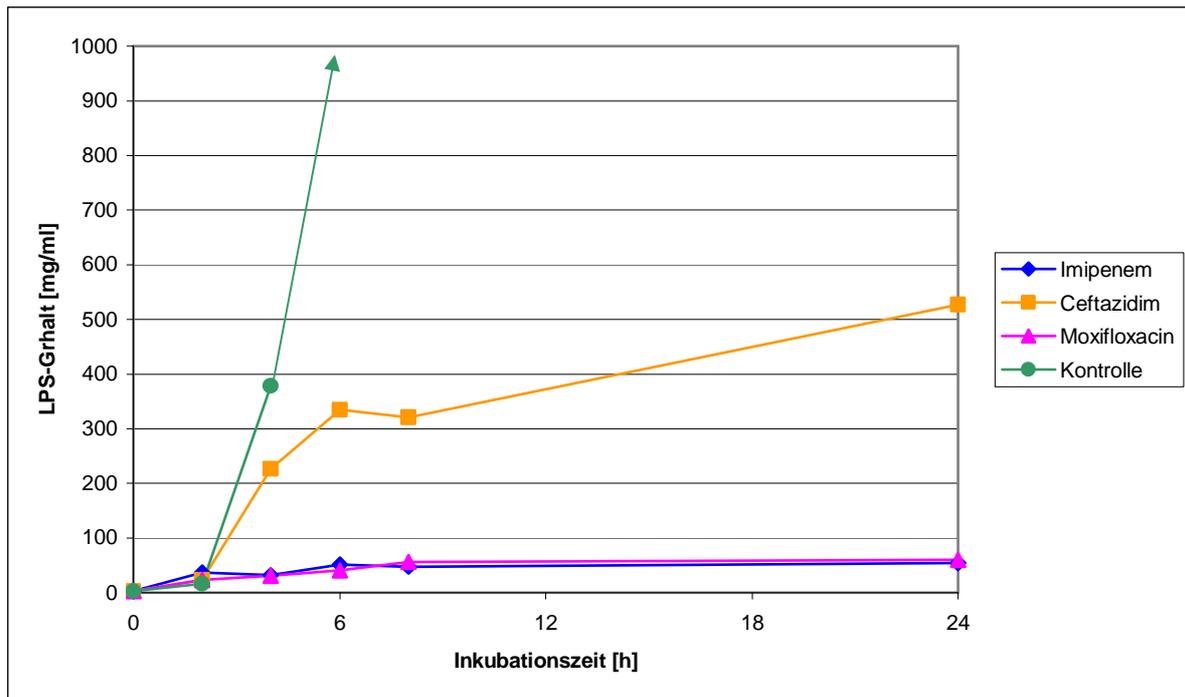
### 3.4.2 Kinetik zu E. coli

In diesem Ergebnisteil sind die Mittelwerte des chromogenen LAL-Tests zu jeder der drei MHK-Einheiten in einem Kurvendiagramm dargestellt. Aus den Diagrammen ist der Verlauf der LPS-Liberation von E. coli über den Inkubationszeitraum von 24 h zu entnehmen.



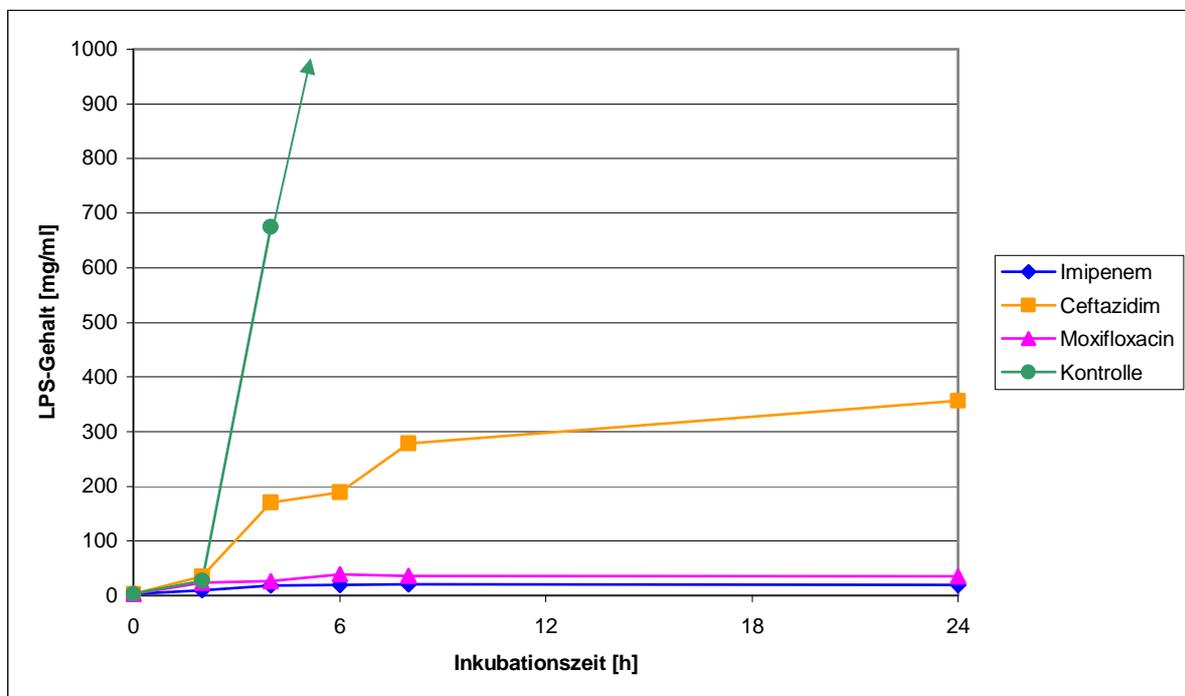
*LPS, Lipopolysaccharid*

*Abbildung 32: Kinetik des Lipopolysaccharid-Gehalts im chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test zu den Wachstumsversuchsproben bei 2-facher minimaler Hemmkonzentration*



LPS, Lipopolysaccharid

Abbildung 33: Kinetik des Lipopolysaccharid-Gehalts im chromogenen *Limulus*-Amöbozyten-Lysat-Test zu den Wachstumsversuchsproben bei 10-facher minimaler Hemmkonzentration



LPS, Lipopolysaccharid

Abbildung 34: Kinetik des Lipopolysaccharid-Gehalts im chromogenen *Limulus*-Amöbozyten-Lysat-Test zu den Wachstumsversuchsproben bei 50-facher minimaler Hemmkonzentration

Den Kurvendiagrammen des chromogenen LAL-Tests sind die gleichen Aussagen zu entnehmen wie den Kurvendiagrammen des ELISA. Die jeweiligen Kurvenverläufe sind fast identisch, was für eine sehr gute Übereinstimmung der Messergebnisse spricht.

Man erkennt, dass die mit dem chromogenen LAL-Test gemessenen LPS-Konzentrationen in den Kulturüberständen der Kontrolle wiederum am höchsten waren und um 3,3 bis 4 log-Stufen im gesamten Versuchsverlauf anstiegen.

Die LPS-Konzentration der mit Ceftazidim behandelten Kulturüberstände lag bei allen drei Konzentrationsstufen unter denen der Kontrolle, aber immer signifikant über der jeweiligen von Moxifloxacin und Imipenem ( $p=0,000$ ). Bei 10 und 50 x MHK wurden wie schon im ELISA-Test wiederum 10 x höhere LPS-Konzentrationen unter Ceftazidim-Einfluss im Vergleich zu Moxifloxacin und Imipenem verzeichnet, wobei diese hier vergleichbar geringe Mengen an LPS liberierten ( $p=0,986$ ). Bei 2 x MHK war dieser Unterschied, analog der Messergebnisse aus dem ELISA, noch wenig ausgeprägt. In den mit Moxifloxacin behandelten Kulturen kam es zur geringsten LPS-Freisetzung, in den mit Imipenem behandelten zu wenig mehr und in den mit Ceftazidim behandelten, wie bereits erwähnt, zu der höchsten, abgesehen von der Kontrolle.

Durch die nachfolgende Tabelle werden die genannten Ergebnisse statistisch dargestellt und belegt. Die Auswertung erfolgte mit dem SPSS-Programm.

*Tabelle 8: Post-Hoc-Test nach Tukey, Mehrfachvergleich*

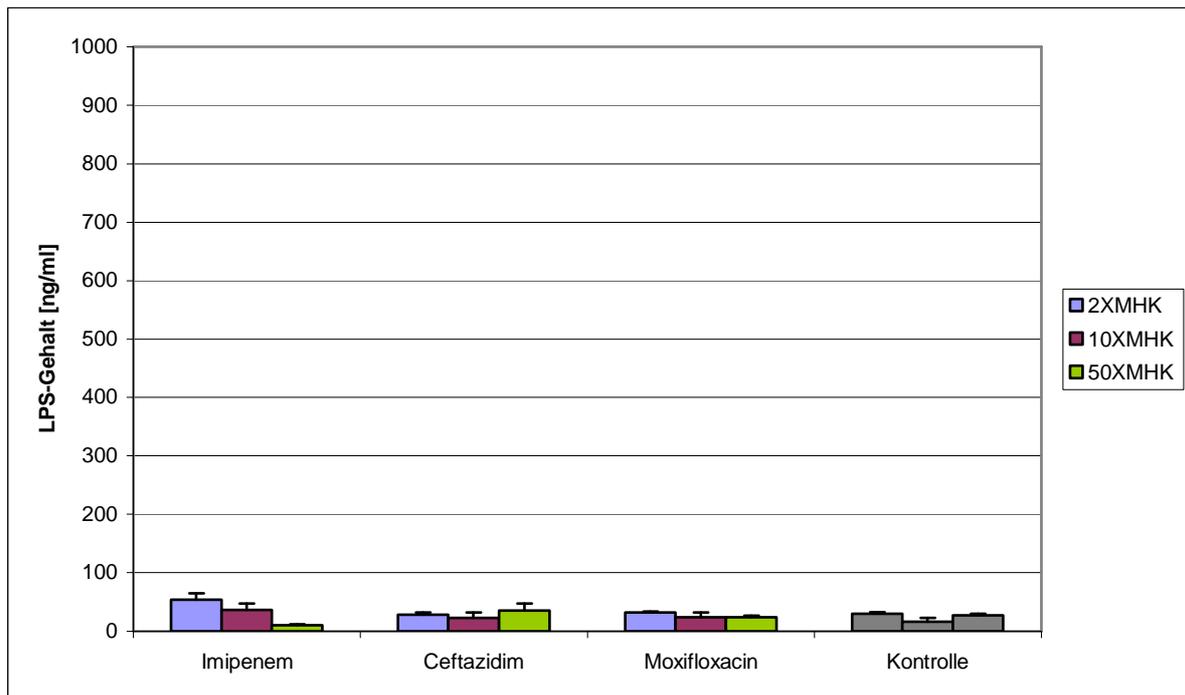
*Die dargestellten Werte ergeben sich aus einem Mehrfachvergleich der im chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test gemessenen Lipopolysaccharid-Werte, bezogen auf das jeweilige Antibiotikum*

(I) Wirkstoff	(J) Wirkstoff	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Imipenem	Ceftazidim	-168,03449(*)	9,060261	<b>,000</b>	-191,15776	-144,91123
	Moxifloxacin	1,44352	9,060261	<b>,986</b>	-21,67975	24,56678
Ceftazidim	Imipenem	168,03449(*)	9,060261	<b>,000</b>	144,91123	191,15776
	Moxifloxacin	169,47801(*)	9,060261	<b>,000</b>	146,35474	192,60127
Moxifloxacin	Imipenem	-1,44352	9,060261	<b>,986</b>	-24,56678	21,67975
	Ceftazidim	-169,47801(*)	9,060261	<b>,000</b>	-192,60127	-146,35474

Weitere Daten zur statistischen Ausarbeitung sind dem Tabellenanhang 7.2 zu entnehmen.

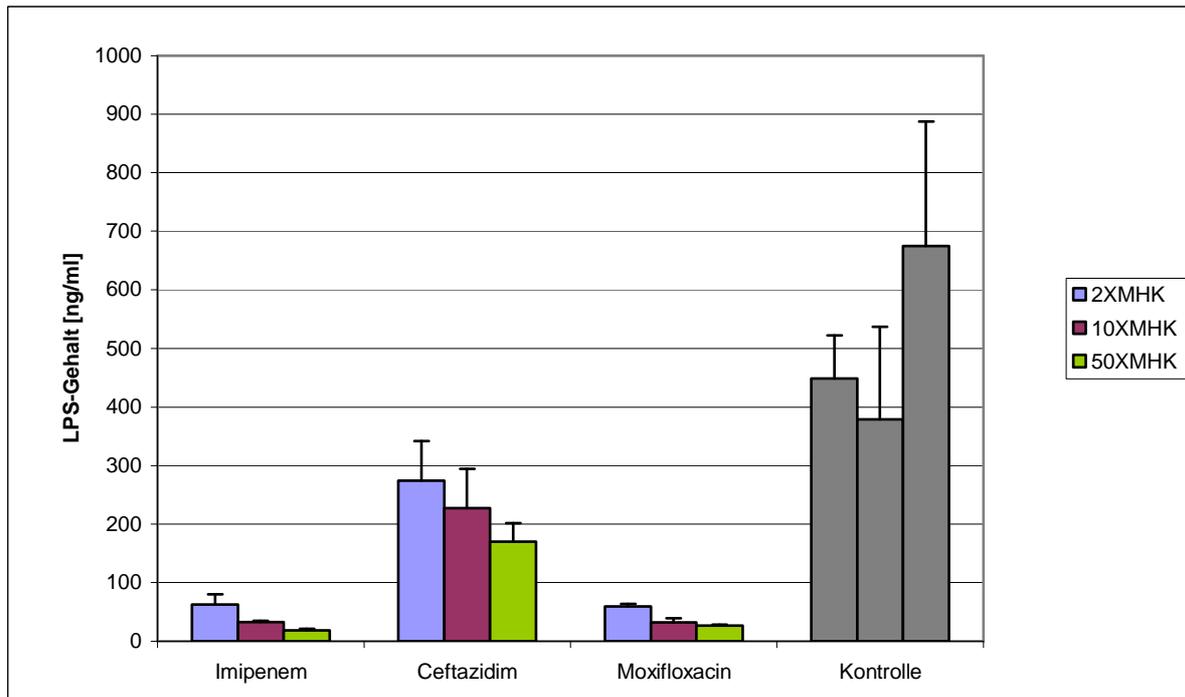
## 3.4.3 Säulendiagramme zu E. coli

Nachdem im vorausgehenden Abschnitt die LPS-Liberation zu jeder MHK als Verlaufskurve dargestellt worden war, vergleichen Säulendiagramme dieses Abschnitts die LPS-Konzentration der Antibiotikaproben, bzw. Kontroll-Proben bezogen auf die verschiedenen MHKs zu jedem Inkubationszeitpunkt separat.



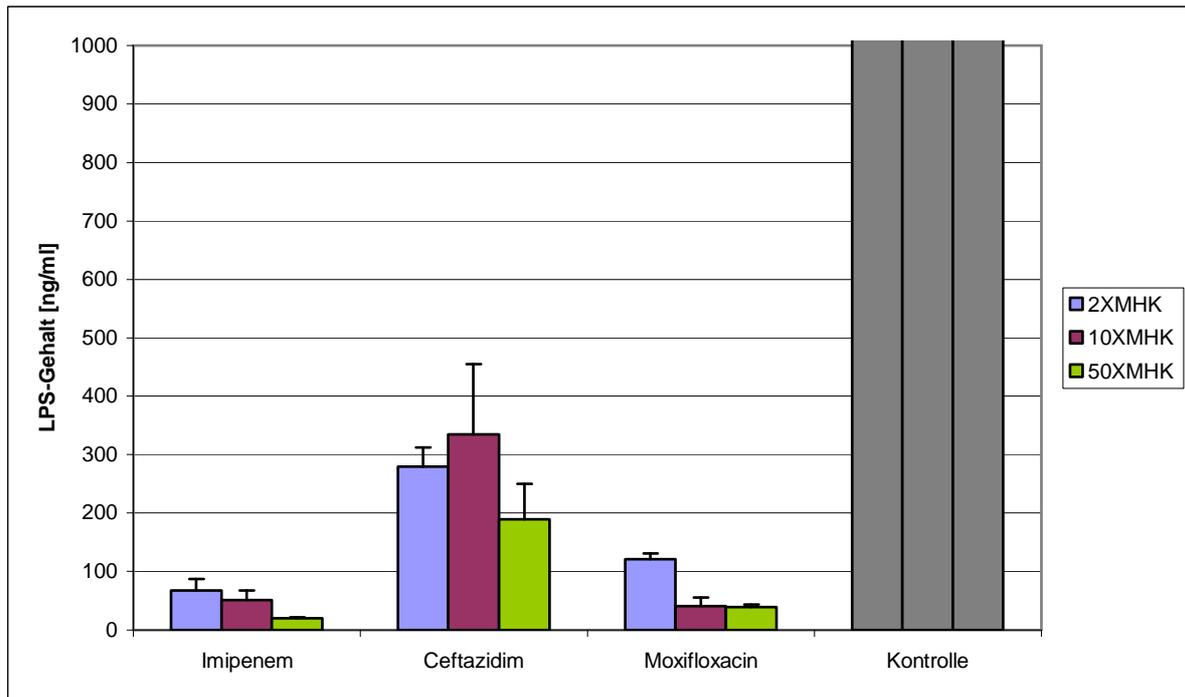
*LPS, Lipopolysaccharid; MHK, minimale Hemmkonzentration*

*Abbildung 35: Mittelwerte mit Standardabweichungen der Lipopolysaccharid-Konzentrationen im chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test bei 2-, 10-, 50-facher minimaler Hemmkonzentration nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden für die drei Antibiotika und die Kontrolle als Säulendiagramm*



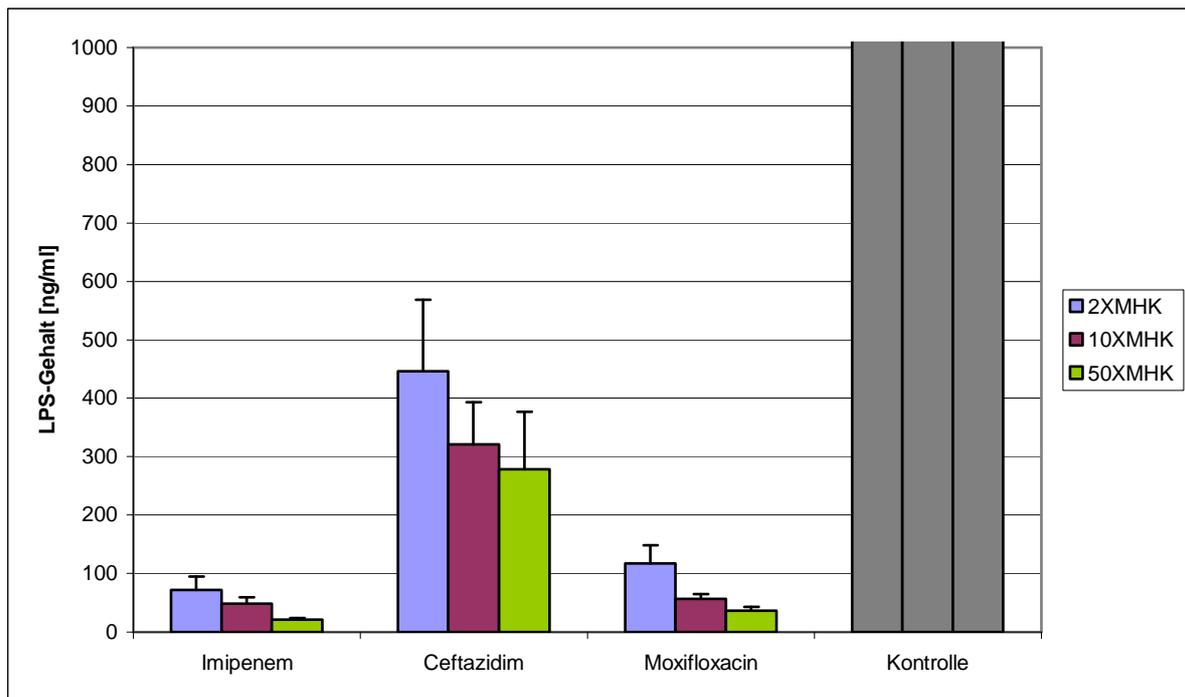
LPS, Lipopolysaccharid; MHK, minimale Hemmkonzentration

Abbildung 36: Mittelwerte mit Standardabweichungen der Lipopolysaccharid-Konzentrationen im chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test bei 2-, 10-, 50-facher minimaler Hemmkonzentration nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden für die drei Antibiotika und die Kontrolle als Säulendiagramm



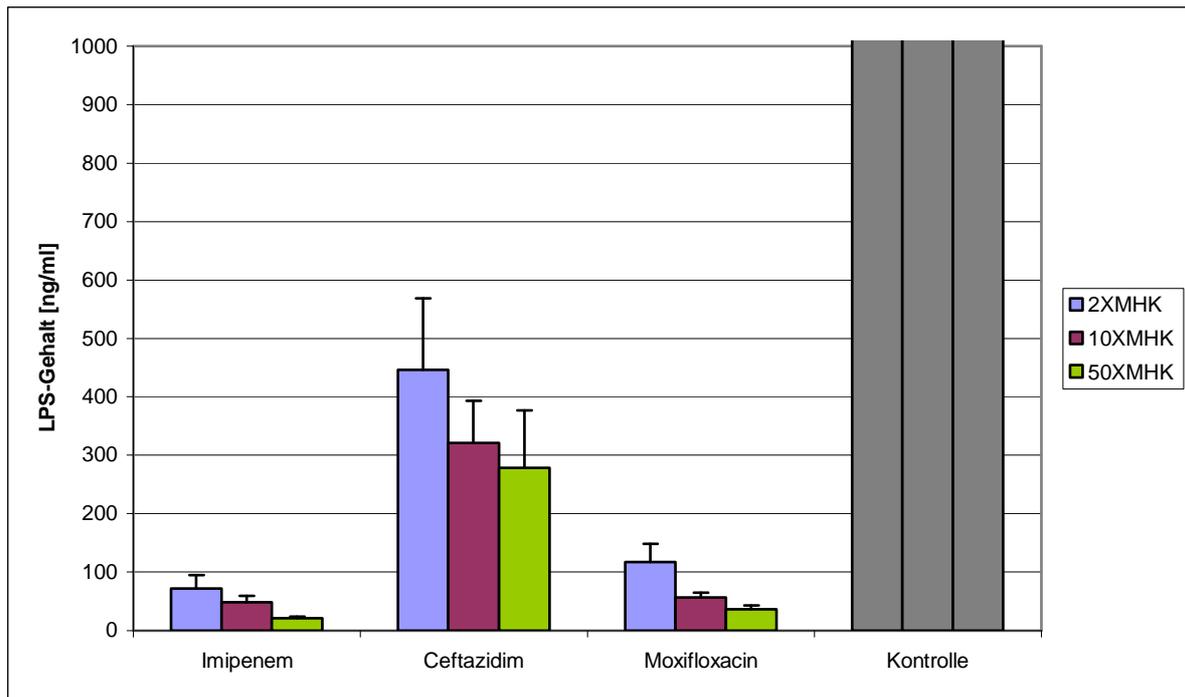
LPS, Lipopolysaccharid; MHK, minimale Hemmkonzentration

Abbildung 37: Mittelwerte mit Standardabweichungen der Lipopolysaccharid-Konzentrationen im chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test bei 2-, 10-, 50-facher minimaler Hemmkonzentration nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden für die drei Antibiotika und die Kontrolle als Säulendiagramm



LPS, Lipopolysaccharid; MHK, minimale Hemmkonzentration

Abbildung 38: Mittelwerte mit Standardabweichungen der Lipopolysaccharid-Konzentrationen im chromogenen Limulus-Amöbozyten.-Test bei 2-, 10-, 50-facher minimaler Hemmkonzentration nach einer Inkubationszeit von 8 Stunden für die drei Antibiotika und die Kontrolle als Säulendiagramm



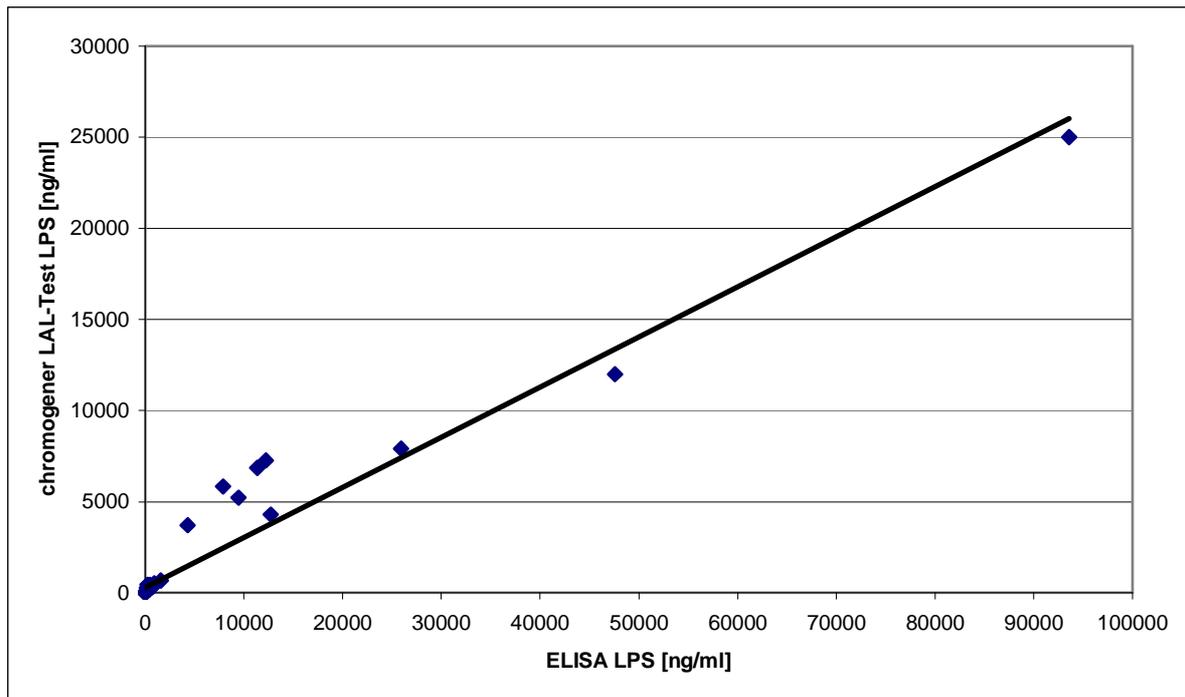
LPS, Lipopolysaccharid; MHK, minimale Hemmkonzentration

Abbildung 39: Mittelwerte mit Standardabweichungen der Lipopolysaccharid-Konzentrationen im chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test bei 2-, 10-, 50-facher minimaler Hemmkonzentration nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden für die drei Antibiotika und die Kontrolle als Säulendiagramm

Den Säulendiagrammen zum chromogenen LAL-Test ist die gleiche Aussage zu entnehmen, wie den Säulendiagrammen zum ELISA. Auch hier war nach 2 h Inkubationszeit für alle MHK-Stufen sowie für den antibiotikafreien Kontrollansatz noch keine fundierte Aussage zu einer differierenden Beeinflussung der LPS-Freisetzung zu treffen. Nach 4-stündiger Inkubation induzierten Imipenem und Moxifloxacin jedoch bereits eine deutlich geringere LPS-Freisetzung als Ceftazidim in allen Konzentrationsstufen.

Für Imipenem sowie für Moxifloxacin wurde außerdem, wie schon im ELISA deutlich, dass die Menge des freigesetzten LPS in umgekehrter Relation zur eingesetzten Konzentration der Antibiotika, bezogen auf die MHK, stand.

Um zu zeigen, dass zwischen den für die Kulturüberstände im ELISA gemessenen und den im chromogenen LAL-Test gemessenen LPS-Konzentrationen ein Zusammenhang besteht, wurden die Werte aus dem ELISA gegen die des chromogenen LAL-Tests im Diagramm aufgetragen und der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet.



*chromogener LAL-Test, chromogener Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; LPS, Lipopolysaccharid*

*Abbildung 40: Korrelation zwischen den im enzyme-linked immunosorbent assay und den im chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test gemessenen Lipopolysaccharid-Konzentrationen. Es wurde ein Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet:  $R=0,97$*

Aufgrund des Diagramms und eines Pearson's  $R= 0,97$  konnte eine signifikante Korrelation gezeigt werden.

#### 3.4.4 Ergebnisse zu *B. fragilis*

Wie unter Material und Methoden beschrieben, waren zu *B. fragilis* weder Orientierungswerte zum LPS-Gehalt der Wachstumsversuchsproben, noch Hinweise zur Verdünnung der Proben bekannt. So wurden zunächst die bekannten Standards zu *E. coli* O55:B5 mitgeführt, um die OD-Werte der unbekanntenen Proben einschätzen zu können.

Von allen *B. fragilis* Proben wurden 2 Proben zur ausführlichen Verdünnungssuche ausgewählt. Dabei handelte es sich um die Proben der Kontrollgruppe aus der 10 x MHK-Versuchseinheit zu den Inkubationszeitpunkten 0 und 8 h. Bei dieser Wahl wurde bedacht, dass zum Inkubationszeitpunkt 0 h ein niedriger Ausgangswert gemessen werden müsste. Nach 8 h Inkubation sollte es dann in der Kontrollgruppe ohne Antibiotikazusatz zu einer deutlichen LPS-Liberation gekommen.

Es wurden 5 gleiche Verdünnungen zu den beiden Proben angefertigt, um sicher zu stellen, dass eine der gemessenen ODs jeder Probe sicher in den linearen Bereich der Standardkurve fallen würde. In folgenden 2 Tabellen sind die Probenverdünnungen mit gemessenen ODs dargestellt.

*Tabelle 9: Verdünnungen und gemessene optische Dichten der Proben aus der Kontrollgruppe ohne Antibiotikazusatz bezüglich der Versuchseinheit zu der 10-fachen minimalen Hemmkonzentration nach 0 Stunden Inkubationszeit*

Verdünnung	1:10	1:100	1:1000	1:10.000	1:100.000
Mean-OD	0,506	0,051	0,006	0,002	0,004

*OD, optische Dichte*

*Tabelle 10: Verdünnungen und gemessene optische Dichten der Proben aus der Kontrollgruppe ohne Antibiotikazusatz bezüglich der Versuchseinheit zu der 10-fachen minimalen Hemmkonzentration nach 8 Stunden Inkubationszeit*

Verdünnung	1:10	1:100	1:1000	1:10.000	1:100.000
Mean-OD	0,442	0,039	0,016	0,002	0,003

*OD, optische Dichte*

Den Tabellen ist zu entnehmen, dass die Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1.000 auf der Standardgerade liegen würden. In der geringsten Verdünnungsstufe wurde der höchste OD-Wert gemessen, kontinuierlich abfallend zur höchsten Verdünnungsstufe. Es war jedoch kein, auch nur geringer, Unterschied zwischen der Inkubationszeit 0h und der Inkubationszeit 8h, die wesentlich höhere ODs in stärkeren Verdünnungsstufen zeigen sollte, festzustellen. Daraus ergibt sich, dass das *B. fragilis* LPS mit dem chromogenen LAL-Test nicht nachgewiesen werden kann.

### **3.5 Ergebnisse - Zytokinbestimmungen**

In zwei kommerziellen Sandwich-ELISA-Systemen mit zwei monoklonalen Antikörpern gegen zum einen humanes TNF $\alpha$  und zum anderen humanes IL-1 $\beta$  wurde dessen Freisetzung aus Mono Mac 6-Zellen, stimuliert durch *E. coli*-Kulturüberstände, die mit drei verschiedenen Antibiotika behandelt worden waren, getestet. Die im Wachstumsversuch gewonnenen *E. coli*-Kulturüberstände enthielten

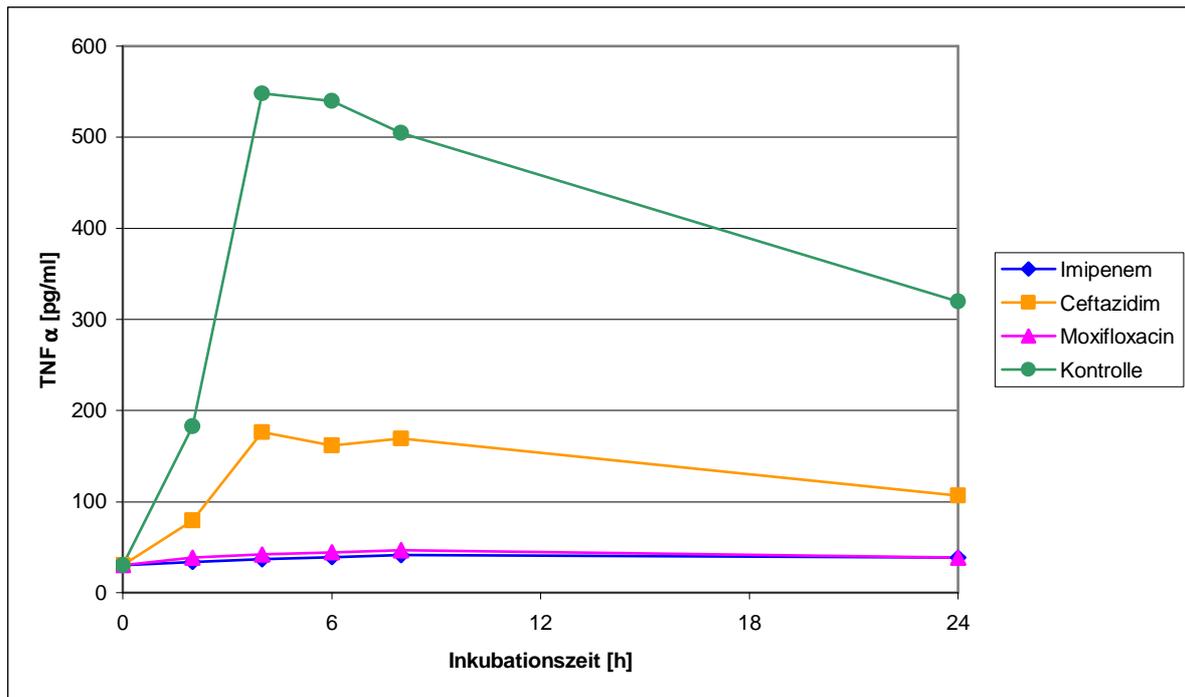
LPS, dessen biologische Aktivität anhand der bewirkten TNF $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Freisetzung untersucht werden sollte.

Gemessen wurde zunächst die OD des bei der enzymatischen Reaktion entstandenen Farbstoffes bei 405 nm. Die den gemessenen OD-Werten entsprechenden Zytokin-Konzentrationen (in pg/ml) wurden aus den mitgeführten TNF $\alpha$ - bzw. IL-1 $\beta$ -Standardkurven direkt im Anschluss durch das ELISA-Lesegerät maschinell ermittelt.

#### 3.5.1 TNF $\alpha$ -Kinetik zu E. coli

Für die Erstellung der Kinetik der TNF $\alpha$ -Liberation über einen 24-stündigen Inkubationszeitraum aus der Mono Mac 6-Zelllinie wurden zur Stimulation die Kulturüberstände aus dem Wachstumsversuch von 10 x MHK nach 6 h Inkubationszeit ausgewählt, da diese Proben aus den vorliegenden Ergebnissen von ELISA und chromogenem LAL-Test das meiste LPS enthielten und nach einem Zeitraum von 6 bis 8 h die Spitze der Endotoxinfreisetzung erreicht war.

Aus drei Kinetiken konnten schließlich die in dem anschließenden Kurvendiagramm dargestellten Werte ermittelt werden.



$TNF\alpha$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$

Abbildung 41: Kinetik zur Tumornekrosefaktor  $\alpha$ -Liberation aus der Mono Mac 6 Zelllinie nach Stimulation mit Lipopolysaccharid-Proben aus dem Wachstumsversuch bei 10-facher minimaler Hemmkonzentration nach 6 Stunden Inkubation

Aus der Kinetik ist zu entnehmen, dass das freigesetzte LPS biologisch aktiv war und dass der Stimulationspeak für die Monozyten bei 6 bis 8 h lag. Danach kam es für den Kontrollansatz sowie für die Ceftazidim-Proben nach einem initial steil ansteigenden Kurvenverlauf wieder zu einem Abfall, wobei die Kontroll-Proben bis zu fast 3 x mehr  $TNF\alpha$ -Freisetzung induzierten.

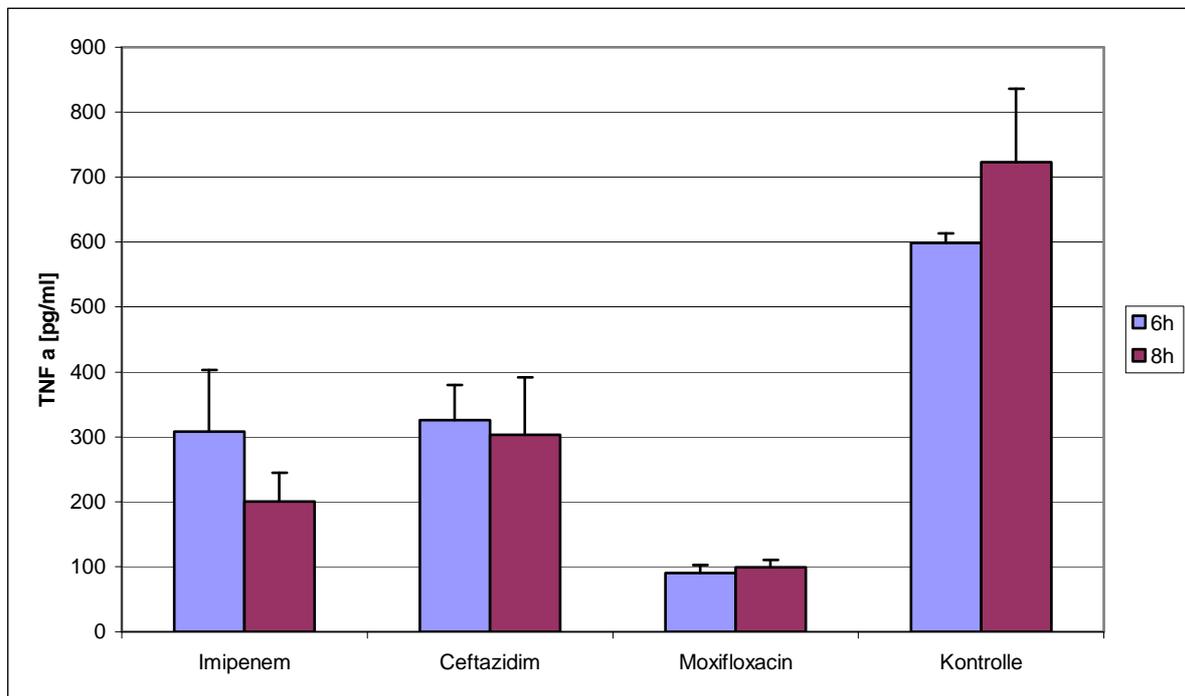
Unter Imipenem- und Moxifloxacin-Einfluß wurde vergleichbar wenig  $TNF\alpha$  freigesetzt, im Vergleich zu Ceftazidim kam es zu einer 4-fach geringeren Zytokin-Liberation.

Im weiteren Versuchsteil wurden alle Kulturüberstände des Wachstumsversuches sowohl 6 h, als auch 8 h lang mit der Mono Mac 6-Zelllinie inkubiert und anschließend die Zytokinliberationen untersucht.

### 3.5.2 $TNF\alpha$ -Werte zu E. coli

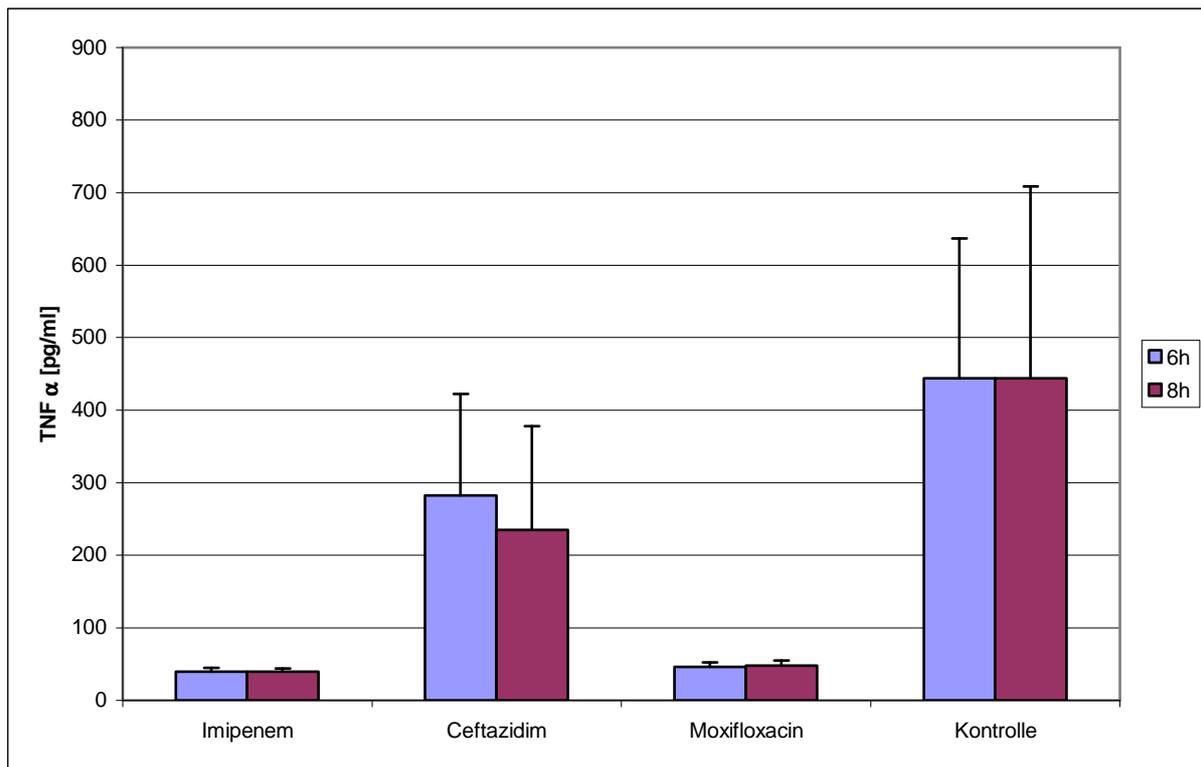
Wie bereits unter 3.5.1 beschrieben werden in diesem Abschnitt die Ergebnisse der  $TNF\alpha$ -Ausschüttung nach 6 und 8-stündiger Inkubation der Mono Mac 6-Zelllinie mit

den Proben des Wachstumsversuches nach 6 h Inkubationszeit in 3 Säulendiagrammen, entsprechend der MHK, dargestellt.



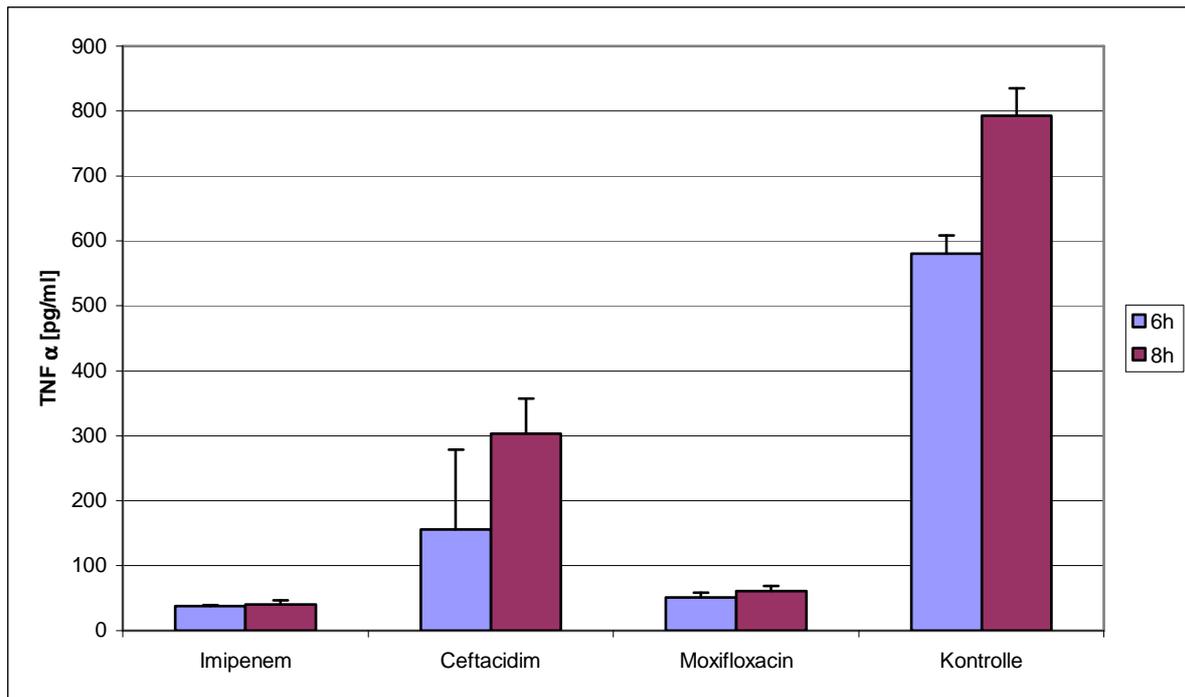
*TNF $\alpha$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$*

*Abbildung 42: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der Tumornekrosefaktor  $\alpha$ -Liberation aus der Mono Mac 6- Zelllinie nach 6 und 8 Stunden Inkubationszeit mit den Lipopolysaccharid-Proben des Wachstumsversuchs nach 6 Stunden Inkubationszeit bei 2-facher minimaler Hemmkonzentration der Antibiotika*



*TNF $\alpha$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$*

*Abbildung 43: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der Tumornekrosefaktor  $\alpha$ -Liberation aus der Zelllinie Mono Mac 6 nach 6 und 8 Stunden Inkubationszeit mit Lipopolysaccharid-Proben des Wachstumsversuchs nach 6 Stunden Inkubationszeit bei 10-facher minimaler Hemmkonzentration der Antibiotika*



*TNF $\alpha$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$*

*Abbildung 44: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der Tumornekrosefaktor  $\alpha$ -Liberation aus der Zelllinie Mono Mac 6 nach 6 und 8 Stunden Inkubationszeit mit Lipopolysaccharid-Proben des Wachstumsversuchs nach 6 Stunden Inkubationszeit bei 50-facher minimaler Hemmkonzentration der Antibiotika*

Allen drei Säulendiagrammen ist zu entnehmen, dass zwischen einer 6- und 8-stündigen Monozytenstimulation kein wesentlicher Unterschied bestand. Die Kontrollproben führten bei allen drei MHKs zu der stärksten Reizung der Monozyten und enthielten das meiste TNF $\alpha$ , jeweils gefolgt von den Ceftazidim-Kulturüberständen, wobei hier der Unterschied bei 2 x MHK zu Imipenem nur gering vorhanden war. Die Moxifloxacin Proben führten bei allen MHKs zu einer mehr als 200 pg/ml geringeren, bzw. signifikant geringeren TNF $\alpha$ -Ausschüttung als die Ceftazidim-Proben ( $p=0,000$ ), für Imipenem galt ebenfalls ein signifikanter Unterschied zu Ceftazidim ( $p=0,000$ ), besonders deutlich wurde dies allerdings nur bei 10 und 50 x MHK. Bei 2 x MHK lag die LPS-Liberation unter Imipenem-Einfluss nämlich recht hoch und deutlich über der von Moxifloxacin, so dass sich dieser Unterschied in einem p-Wert von 0,491 noch gerade als signifikant erwies. Der insgesamt zu beobachtende leichte Rückgang der TNF $\alpha$ -Liberation mit zunehmender MHK korrelierte mit den Ergebnissen des ELISA und der dabei gemessenen niedrigeren LPS-Konzentration bei geringerer Keimdichte im Wachstumsversuch.

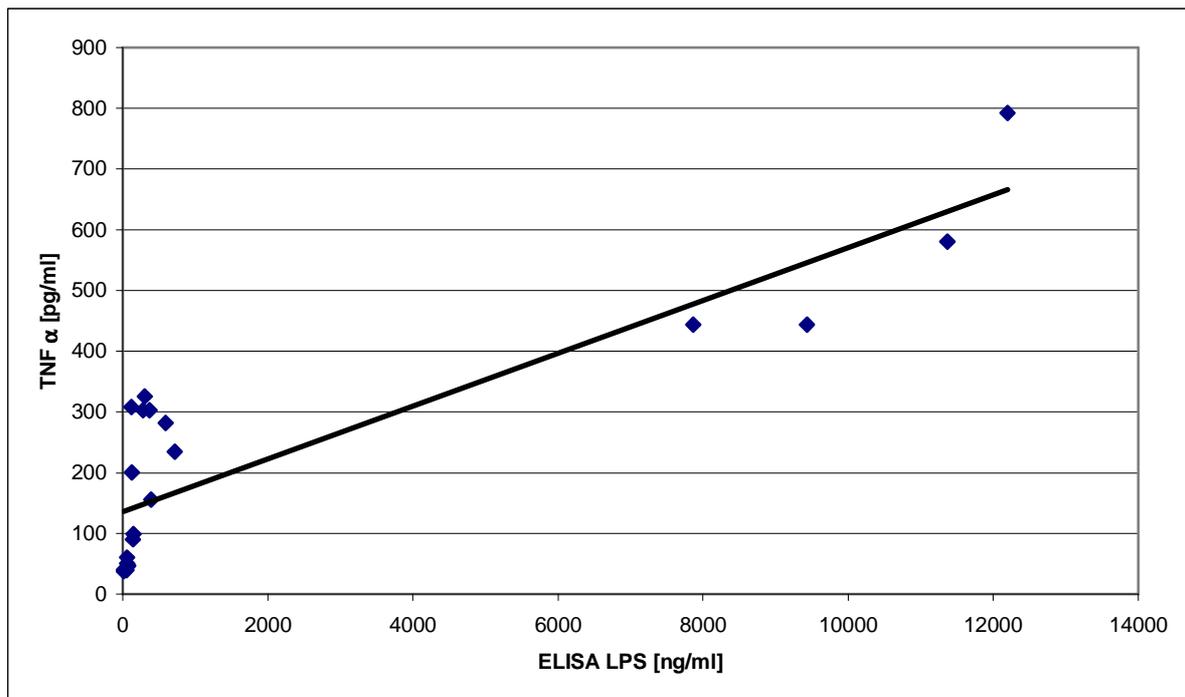
In der nachfolgenden, mit Hilfe des SPSS-Programmes erstellten Tabelle, werden die genannten Ergebnisse statistisch zusammengefasst dargestellt.

*Tabelle 11: Post-Hoc-Test nach Tukey, Mehrfachvergleich*

*Die dargestellten Werte ergeben sich aus einem Mehrfachvergleich aller im Tumornekrosefaktor  $\alpha$ -enzyme-linked immunosorbent assay gemessenen Zytokin-Konzentrationen, bezogen auf das jeweilige Antibiotikum*

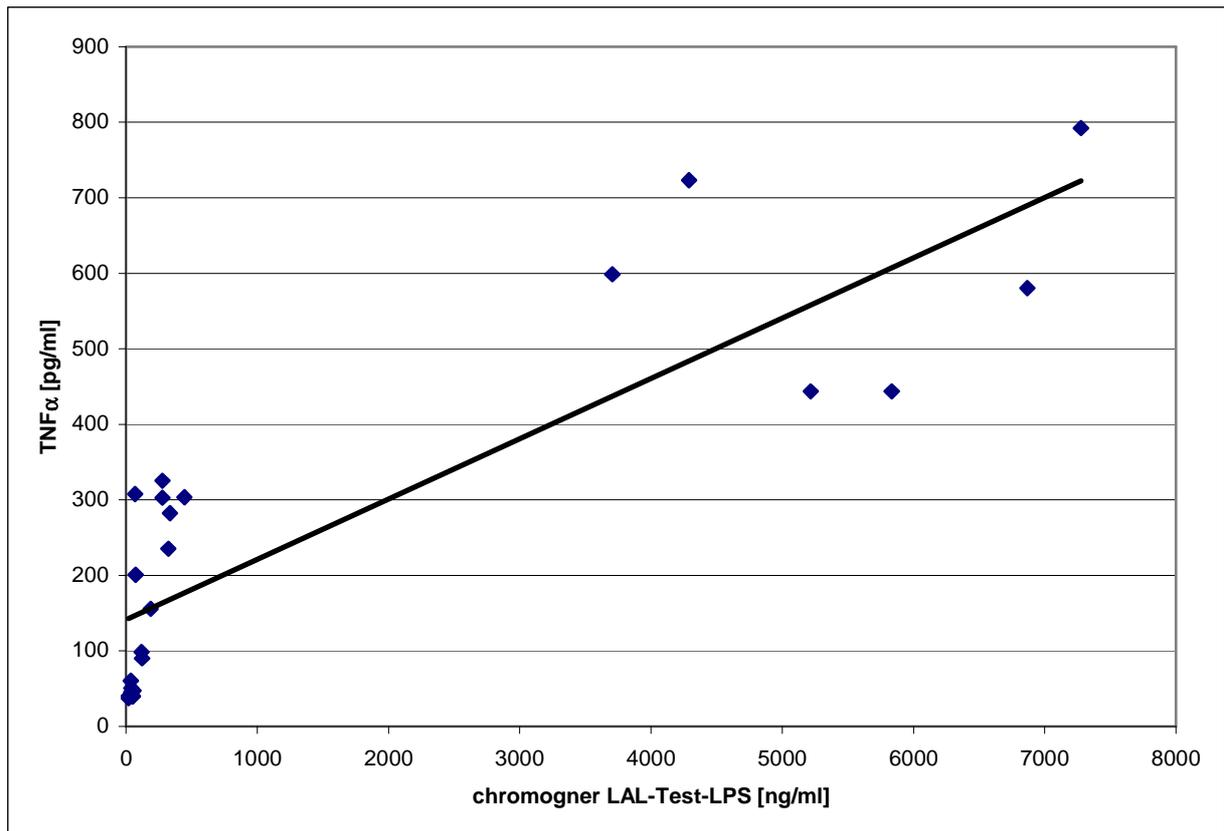
(I) Wirkstoff	(J) Wirkstoff	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Imipenem	Ceftazidim	-155,679(*)	28,3989	,000	-226,092	-85,266
	Moxifloxacin	32,754	28,3989	,491	-37,659	103,167
Ceftazidim	Imipenem	155,679(*)	28,3989	,000	85,266	226,092
	Moxifloxacin	188,433(*)	28,3989	,000	118,020	258,846
Moxifloxacin	Imipenem	-32,754	28,3989	,491	-103,167	37,659
	Ceftazidim	-188,433(*)	28,3989	,000	-258,846	-118,020

Um festzustellen, ob zwischen den für die Kulturüberstände im ELISA, bzw. im chromogenen LAL-Test gemessenen LPS-Konzentrationen und den TNF $\alpha$ -Konzentrationen in den Mono Mac 6-Kulturüberständen, die durch die gleichen E. coli-Kulturüberstände stimuliert wurden, ein Zusammenhang bestand, wurde im nachfolgenden Diagramm die LPS-Konzentration jeweils gegen die TNF $\alpha$ -Konzentration aufgetragen und der Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet.

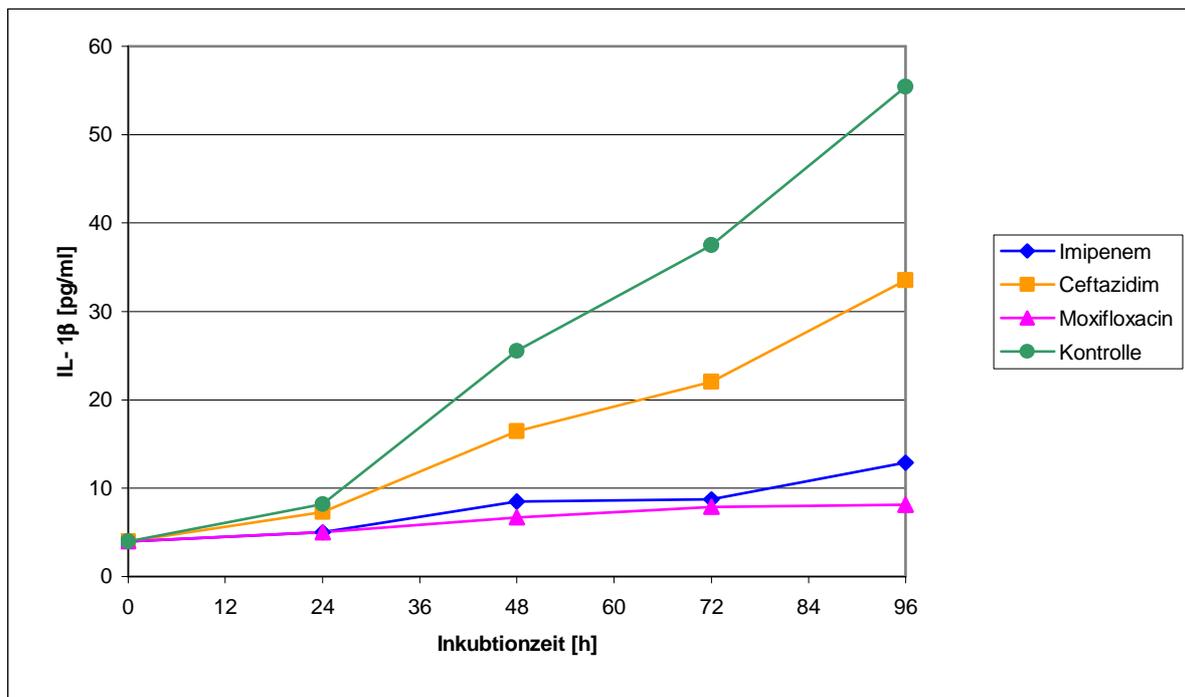


*ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; TNF $\alpha$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$*

*Abbildung 45: Korrelation zwischen im enzyme-linked immunosorbent assay gemessenen Lipopolysaccharid-Konzentrationen und Tumornekrosefaktor  $\alpha$ -Ausschüttung. Es wurde ein Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet:  $R= 0,87$*



Kulturüberstände aus dem Wachstumsversuch von 10 x MHK nach 6 h Inkubationszeit eingesetzt. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass IL-1 $\beta$  zu einem späteren Zeitpunkt als TNF $\alpha$  liberiert wurde. Daher wurden die Probe-Kinetiken immer bis zu einem Inkubationszeitpunkt von 96 h erstellt. Daraus ergab sich schließlich das folgende Diagramm.



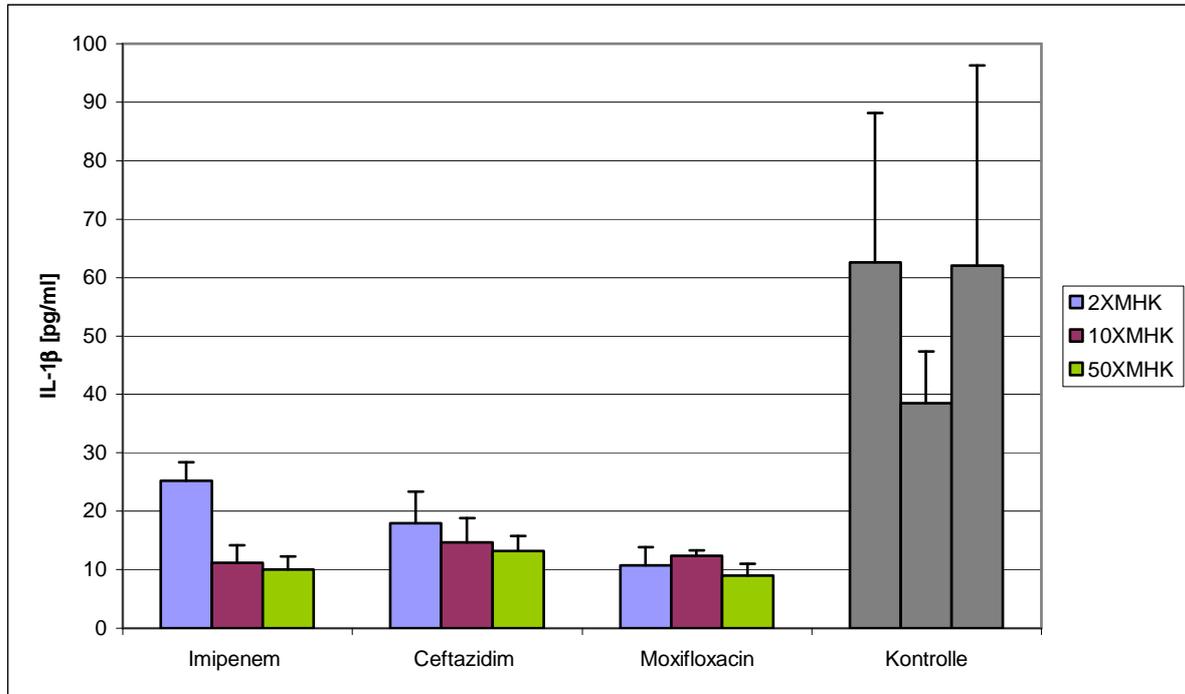
#### IL-1 $\beta$ ; Interleukin-1 $\beta$

Abbildung 47: Kinetik zur Interleukin-1 $\beta$ -Liberation der Mono Mac 6 Zelllinie nach 96 Stunden Inkubation unter Stimulation mit Lipopolysaccharid-Proben aus dem Wachstumsversuch bei 10-facher minimaler Hemmkonzentration

Aus dem Kurvenverlauf der IL-1 $\beta$ -Liberation war wie bei der TNF $\alpha$ -Liberation zu entnehmen, dass das LPS biologisch aktiv war. Allerdings lag hier der Peak der Zytokinfreisetzung nach einem fast linearen Kurvenanstieg bei 96 h. Im Gegensatz zu TNF $\alpha$  handelte es sich also um ein sehr spät exprimiertes Zytokin. Folglich wurde im weiteren Versuchteil die Mono Mac 6-Zelllinie 96 h mit den 6 h-LPS-Proben des Wachstumsversuches inkubiert.

3.5.4 IL-1 $\beta$ -Werte zu E. coli

Der folgende Abschnitt zeigt ein Säulendiagramm der IL-1 $\beta$ -Werte zu den drei MHKs nach einer Inkubationszeit von 96 h.



IL-1 $\beta$ ; Interleukin-1 $\beta$ ; MHK, minimale Hemmkonzentration

Abbildung 48: Säulendiagramm mit Standardabweichung zu den Mittelwerten der Interleukin-1 $\beta$ -Liberation aus der Zelllinie Mono Mac 6 nach 96 Stunden Inkubationszeit mit Lipopolysaccharid-Proben des Wachstumsversuchs nach 6 Stunden Inkubationszeit bei 2-, 10- und 50-facher minimaler Hemmkonzentration der Antibiotika

Aus dem Säulendiagramm ist abzulesen, dass die durch die Kontroll-Proben hervorgerufenen IL-1 $\beta$ -Werte deutlich über den mit Antibiotika behandelten Proben lagen. Unter den Antibiotika führte Moxifloxacin bei allen MHKs zu der geringsten Zytokinliberation. Der Unterschied zu Ceftazidim war signifikant ( $p=0,024$ ). Imipenem lag bei 10 und 50 x MHK vergleichbar niedrig wie Moxifloxacin, bei 2 x MHK kam es jedoch zu einer deutlich höheren IL-1 $\beta$  Freisetzung, die auch über der von Ceftazidim lag. So kam es weder von Imipenem zu Ceftazidim ( $p=0,614$ ), noch von Imipenem zu Moxifloxacin ( $p=0,171$ ) zu einem signifikanten Unterschied. Ansonsten setzte Ceftazidim wieder die größte Menge Zytokin unter den Antibiotika frei.

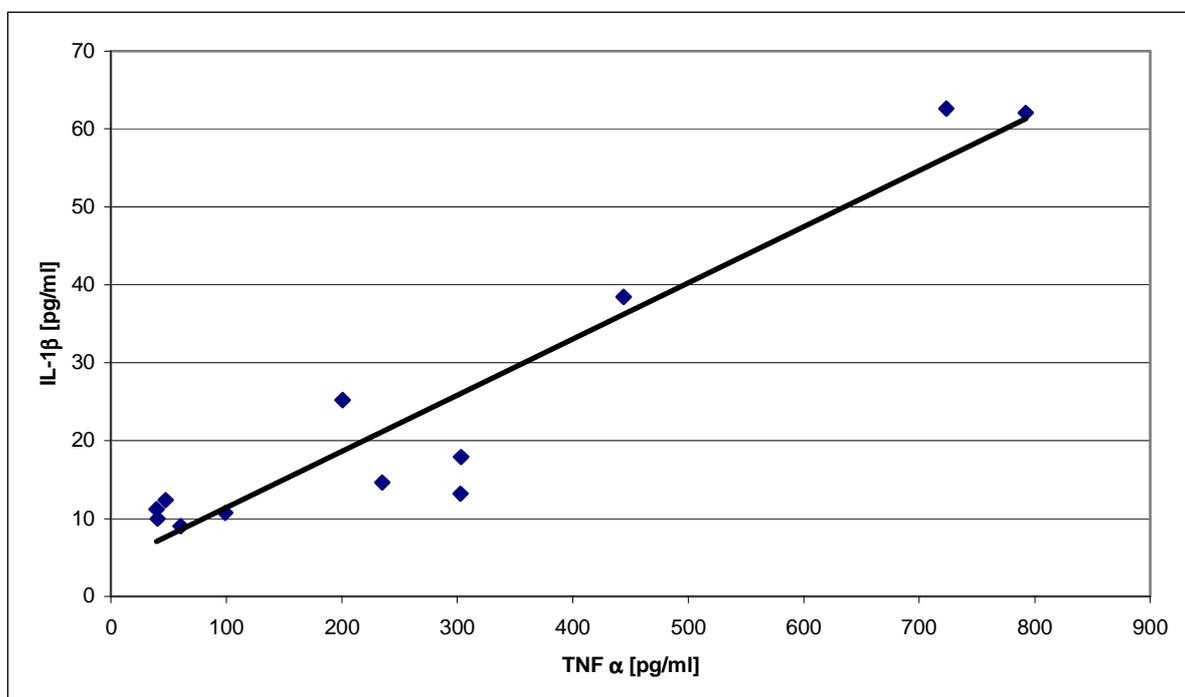
In der unten folgenden SPSS-Tabelle sind diese Aussagen nach statistischer Ausarbeitung belegt.

*Tabelle 12: Post-Hoc-Test nach Tukey, Mehrfachvergleich*

*Die dargestellten Werte ergeben sich aus einem Mehrfachvergleich aller im Interleukin-1 $\beta$ -Werte, bezogen auf das jeweilige Antibiotikum*

(I) Wirkstoff	(J) Wirkstoff	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Imipenem	Ceftazidim	-2,236	2,3539	,614	-8,061	3,588
	Moxifloxacin	4,364	2,3539	,171	-1,461	10,188
Ceftazidim	Imipenem	2,236	2,3539	,614	-3,588	8,061
	Moxifloxacin	6,600(*)	2,3539	,024	,776	12,424
Moxifloxacin	Imipenem	-4,364	2,3539	,171	-10,188	1,461
	Ceftazidim	-6,600(*)	2,3539	,024	-12,424	-,776

Um nun zu zeigen, dass die Messungen zu TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  miteinander und auch mit den beiden weiteren Test, dem ELISA sowie dem chromogenen LAL-Test, korrelierten, wurden nachfolgende Diagramme erstellt und der Pearson's R berechnet.

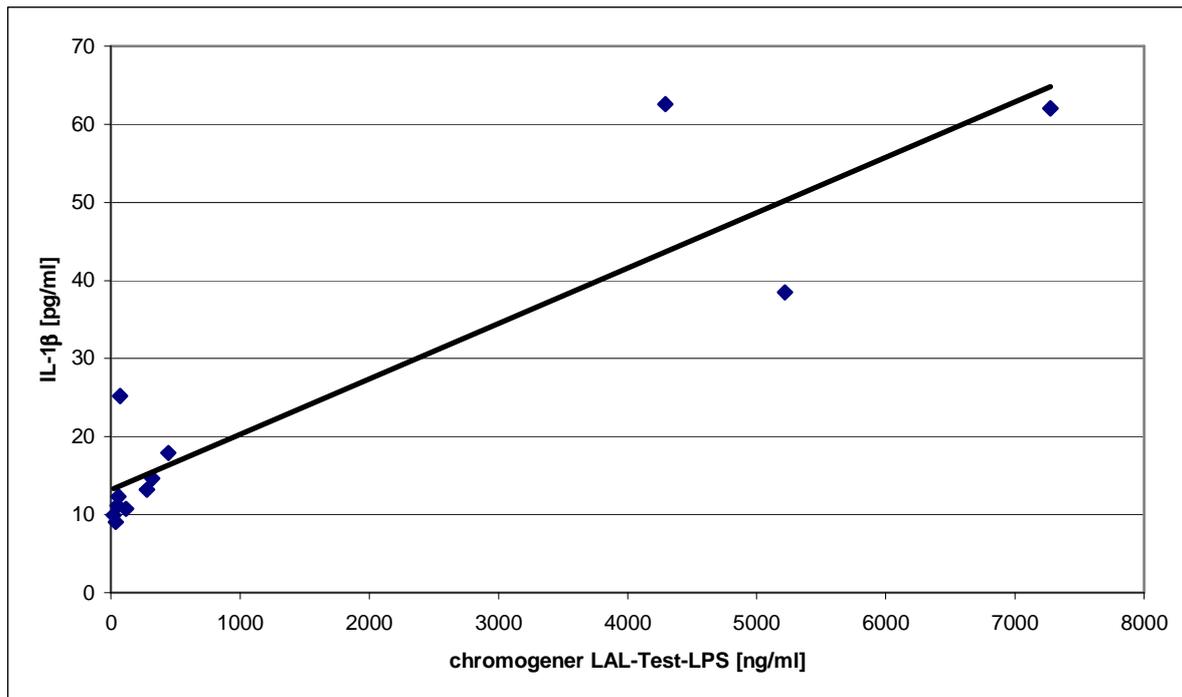


*IL-1 $\beta$ ; Interleukin-1 $\beta$ ; TNF $\alpha$ , Tumornekrosefaktor  $\alpha$*

*Abbildung 49: Korrelation zwischen Tumornekrosefaktor  $\alpha$ - und Interleukin-1 $\beta$ -Ausschüttung.*

*Es wurde ein Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet:  $R= 0,93$*





chromogener LAL-Test, chromogener Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test; IL-1 $\beta$ ; Interleukin-1 $\beta$

Abbildung 51: Korrelation zwischen im chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test gemessenen Lipopolysaccharid-Konzentrationen und Interleukin-1 $\beta$ -Ausschüttung. Es wurde eine Korrelationskoeffizient nach Pearson berechnet:  $R=0,9$

Sowohl durch die Diagramme, als auch durch die Berechnung des Pearson's R kann gezeigt werden, dass zwischen TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  ( $R=0,93$ ), zwischen ELISA und IL-1 $\beta$  ( $R=0,9$ ) und auch zwischen chromogenem LAL-Test und IL-1 $\beta$  ( $R=0,9$ ) signifikante Korrelationen bestanden.

Weitere Angaben zur Statistik sind dem Anhang 7.2 zu entnehmen.

### 3.5.5 TNF $\alpha$ -Versuch zu *B. fragilis*

Da zu *B. fragilis* weder durch den ELISA, noch durch den chromogenen LAL-Test LPS-Werte der Wachstumsversuchsproben bekannt waren, wurde hier zunächst wie zu *E. coli* verfahren. Es wurden Proben des Wachstumsversuches bei 10-facher MHK mit dem Inkubationszeitpunkt 8 h getestet. Weiter wurden Einzelmessungen mit den Wachstumsversuchsproben bei 10 x MHK und den Inkubationszeitpunkten 4 und 6 h durchgeführt. Die folgende Tabelle zeigt exemplarisch eine Kinetik.

*Tabelle 13: Kinetik zur Tumornekrosefaktor  $\alpha$ -Liberation aus der Mono Mac 6 Zelllinie nach Stimulation mit Lipopolysaccharid-Proben aus dem Wachstumsversuch bei 10-facher minimaler Hemmkonzentration nach 8 Stunden Inkubation*

Testansatz	Zytokingehalt (pg/ml) zum Zeitpunkt					
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	24 h
Imipenem	29	32,1	35,8	36,4	35,5	34,5
Ceftazidim	29	30,9	34,6	36,8	35	33,5
Moxifloxacin	29	33,4	35,2	36,2	34,4	31,5
Kontrolle	29	33,3	33,8	36	36,4	33,2

Aus der Tabelle ist abzulesen, dass es weder Unterschiede in den Werten der Antibiotikaproben untereinander oder im Vergleich zu der Kontrolle, noch zu den einzelnen Inkubationszeitpunkten der Proben mit der Mono Mac 6-Zelllinie gab. Somit musste davon ausgegangen werden, dass mit diesem Test das B. fragilis-LPS nicht nachweisbar war.

### 3.5.6 IL-1 $\beta$ -Versuch zu B. fragilis

Zur Testung der IL-1 $\beta$ -Liberation durch B. fragilis-LPS wurde wie schon zu TNF $\alpha$  zunächst eine Kinetik erstellt, wobei wiederum die Proben bei 10 x MHK und 8 h Inkubationszeitpunkt zur Analyse ausgewählt wurden. Weitere Wachstumsversuchsproben von 10 x MHK und 4 bzw. 6 h Inkubation wurden im Anschluss ebenfalls getestet. In folgender Tabelle sind die Ergebnisse einer Kinetik beispielhaft dargestellt.

*Tabelle 14: Kinetik zur Interleukin-1 $\beta$ -Liberation aus der Mono Mac 6 Zelllinie nach Stimulation mit Lipopolysaccharid-Proben aus dem Wachstumsversuch bei 10-facher minimaler Hemmkonzentration nach 8 Stunden Inkubation*

Testansatz	Zytokingehalt (pg/ml) $\pm$ SD zum Zeitpunkt									
	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
Imipenem	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	5,9	9,9	
Ceftazidim	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	5,5	8	
Moxifloxacin	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	5,3	8,6	
Kontroll-LPS	<5	<5	<5	<5	<5	<5	5,2	7,6	11,8	

*SD, Standardabweichung*

Auch diese Tabelle weist, wie schon beim TNF $\alpha$ -ELISA gesehen, keine Unterschiede zwischen den Antibiotikaproben noch zu der Kontrolle auf, lediglich im Inkubationszeitraum von 48 bis 96 h kam es zu einem minimalen IL-1 $\beta$ -Anstieg. Dieser Anstieg war jedoch nicht aussagekräftig, da er zu gering und in allen Proben

gleich war. Er war als normale Reaktion der Zelllinie auf die lange Inkubationszeit zu werten.

Auch der IL-1 $\beta$ -ELISA konnte folglich nicht das *B. fragilis*-LPS nachweisen.

### 3.6 Ergebnisse - Phasenkontrastdarstellung

#### 3.6.1 Morphologiebeschreibung von *E. coli*

Nach 30 min Inkubationszeit zeigten sich erste Unterschiede in der morphologischen Entwicklung der Keime unter Einfluss der 3 verschiedenen Antibiotika. Nachmals 30 min später, also nach 1 h Inkubationszeit, bestand die deutliche Tendenz, dass sich *E. coli* in Gegenwart von Imipenem abkugelte und zu kugeligen bzw. rundlichen Kolonien zusammenlagerte. Der Einfluss von Moxifloxacin schien die gleiche Entwicklung hervorzurufen, d.h. ebenfalls eine runde Bakterienmorphologie zu induzieren.

Bei Bebrütung des Keimes mit Ceftazidim nahmen die Zellen jedoch eher längliche Formen an und lagerten sich zusätzlich zu langen Filamenten zusammen.

Nach einer Inkubationszeit von 2 h hatte sich die vorher aufgezeigte Tendenz herauskristallisiert: es fand durch Imipenem- und Moxifloxacineinfluss eine Sphäroplastenbildung der Zellen statt. Ceftazidim induzierte eine Filamentbildung.

#### 3.6.2 Morphologiebeschreibung von *B. fragilis*

Bei Inkubation von *B. fragilis* mit den Antibiotika Imipenem, Cefoxitin und Moxifloxacin waren unter Einfluss dieser jeweiligen Antibiotikaklassen die gleichen morphologischen Veränderungen festzustellen, wie die für *E. coli* unter 3.6.1 beschrieben.

## 4. Diskussion

Sepsis ist immer noch eine der häufigsten Todesursachen auf Intensivstationen, trotz jahrzehntelanger Forschung über die Pathophysiologie derselben und zahlreichen Studien an septischen Patienten. Erstaunlicherweise steigt nach neueren Forschungsdaten sogar die Sepsis-Inzidenz. In den USA wird diese mit Steigerungsraten zwischen 1,5 und 8 % pro Jahr angegeben [4, 7, 87, 98].

In Zukunft wird sie wohl noch weiter steigen, da der medizinische Fortschritt in vielen Bereichen sowohl mit einer Zunahme der Invasivität diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen bei immer älteren Patienten als auch mit der Notwendigkeit einer Intensivtherapie morbider Patienten verbunden ist.

Diese steigende Inzidenz der mit einer hohen Mortalität und hohen Kosten belasteten Erkrankung bedingt die Notwendigkeit des Einsatzes wirksamer aber auch effizienter Therapieverfahren. Es zeigte sich allerdings im klinischen Alltag, dass ein einziges, die Prognose bestimmendes Therapieverfahren im Fall der Sepsis nicht existiert. Zurzeit setzt sich die Behandlung der schweren Sepsis und des septischen Schocks aus einem Mosaik verschiedener Therapieansätze zusammen. Die Standardtherapie besteht aus einer antiinfektiösen Therapie der Patienten mit Sanierung des infektiösen Fokus und der supportiven Therapie, unter der die Wiederherstellung bzw. der Erhalt der Vital- und Organfunktionen verstanden wird. Zusätzlich sollten noch adjuvante Therapieverfahren dazu beitragen, das Behandlungsergebnis durch Modifizierung der inflammatorischen Wirtsantwort und Modulation der Gerinnung zu verbessern. Trotz vielversprechender Phase-I- und Phase-II-Studien konnte eine große Zahl hier ansetzender Substanzen die Letalität der Sepsis nicht weiter senken - so unter anderem monoklonale Antikörper gegen Endotoxin, Ibuprofen, Interleukin-1-Rezeptorantagonisten, Immunglobuline, Antithrombin III, „Tissue factor pathway inhibitor“ und hochdosiertes N-Acetylcystein [2, 134].

Davon abzugrenzen sind jedoch zwei weitere adjuvante Therapieansätze. So konnte zum einen durch eine niedrig dosierte Hydrokortisontherapie (200 mg/d) die Mortalität bei Patienten mit relativer Nebennierenrindeninsuffizienz und einem pathologischen ACTH-Test reduziert werden. Zum anderen wurde durch die Gabe von rekombinantem humanen aktivierten Protein C (Drotrecogin alfa [ aktiviert ]) in einer Dosierung von 24 µg/kgKG/Stunde über 96 Stunden bei Erwachsenen mit

schwerer Sepsis und mindestens zwei Organdysfunktionen die 28-Tages-Gesamtletalität signifikant gesenkt [16, 86].

In einer Analyse bei Patienten über 75 Jahre war dieser Unterschied in der Letalität auch noch nach zwei Jahren nachzuweisen [65].

Aktiviertes Protein C ist eine antikoagulatorisch wirksame Substanz, so dass es unter der Therapie mit aktiviertem Protein C auch zu einer erhöhten Blutungsneigung kommen kann. Beim Einsatz von Drotrecogin alfa (aktiviert) sind daher die hauptsächlich auf Blutungskomplikationen abgestimmten Kontraindikationen zu beachten. Weiterhin sind bei invasiven Maßnahmen die ausgewiesenen Sperrzeiten einzuhalten, da Drotrecogin alfa (aktiviert) nicht antagonisiert werden kann.

Die aufgeführten adjunktiven Therapieansätze sind somit nur eingeschränkt einsetzbar und dienen vor allem dazu, Sepsismediatoren zu beeinflussen und erst am Ende einer fulminanten Sepsiskaskade zu wirken.

Daher ist es notwendig, ein Therapiekonzept zu entwickeln, das am Anfang der Sepsisentwicklung angreift und den Hauptfaktor in der Auslösung des septischen Schocks berücksichtigt.

Bakterielle Zellwandbestandteile, die Endotoxine, stellen bei Infektionen durch gram-negative Bakterien diesen Hauptfaktor in der Sepsisgenese dar. Endotoxine wie Lipopolysaccharide (LPS) und Lipooligosaccharide (LOS) sind sehr potente Stimuli einer proinflammatorischen Zytokinantwort [14, 24, 58].

Im Falle gram-positiver Bakterien scheinen es vor allem lösliche Peptidoglykane (soluble peptidoglycans - sPG) zu sein, die für eine kreislaufwirksame Zytokinausschüttung sorgen [43, 90, 122].

Bei gram-negativen Infektionen ist das Lipopolysaccharid hauptverantwortlich für das septische Geschehen.

Das Lipopolysaccharid der Zellwand gram-negativer Bakterien setzt sich aus drei Strukturen, nämlich der äußeren O-spezifischen Seitenkette, dem Kernpolysaccharid und dem innen gelegenen Lipoid A, zusammen. Über den Lipoid A-Anteil ist es in der Zellmembran verankert und wird während der Zellyse freigesetzt. Studien von Leeson und Morrison zeigten, dass freies LPS verglichen mit zellgebundenem LPS einen ungefähr zwanzig bis fünfzigmal höheren Stimulus für die Aktivierung der Immunreaktion des infizierten Organismus darstellt und dass die biologische Aktivität von löslichem LPS signifikant reduziert wird, wenn es experimentell an Latex-Partikel in der Größe von Bakterien gebunden wird [81].

Bucklin und Fujihara erklärten dies mit der Überlegung, dass Lipoid A die biologisch aktive Komponente des LPS darstellt und in der an Zellen gebundenen Form nicht vollständig zugänglich ist [21].

Daher wurde in der vorgelegten Arbeit nur das gewonnene freie LPS analysiert.

Eine Strategie, die nun eben auf diesen Sepsisauslöser zielt, indem sie die Entstehung des septischen Schocks verhindert, liegt im Einsatz geeigneter Antibiotika mit Minimierung der LPS-Produktion und Liberation. In der Vergangenheit konnte nämlich in etlichen Studien gezeigt werden, dass sich die einzelnen Antibiotikaklassen hinsichtlich der Menge der durch sie induzierten Endotoxin-Liberation stark unterscheiden [21, 31, 39, 43, 63, 70, 113].

So zeigten Shenep et al., dass Antibiotika, die auf die Zellwand gram-negativer Bakterien einwirken, größere Mengen an Endotoxin freisetzen, als andere Substanzen, die, wie z.B. die Aminoglykoside, in die Proteinsynthese eingreifen oder die, wie z.B. die Fluorochinolone, die Nukleinsäuresynthese beeinflussen [113].

Im letzten Jahrzehnt wurde deutlich, dass gerade zwischen den auf die Zellwand wirkenden Antibiotika Unterschiede hinsichtlich der Endotoxinfreisetzung bestehen. In einer In-Vitro-Studie gelang es Jackson und Kropp, die Zusammenhänge zwischen den Mechanismen des antibakteriellen Angriffs der Antibiotika und der Menge des freigesetzten Endotoxins zu zeigen [70].

Sie untersuchten die zellwandaktiven Antibiotika Ceftazidim und Imipenem, die sich signifikant darin unterscheiden, biologisch aktives Endotoxin aus Kulturen von *Pseudomonas aeruginosa* freizusetzen. Jackson und Kropp betrachteten die Eigenschaften von eben diesem Ceftazidim und eben diesem Imipenem, zweier  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, auf molekularer Ebene. Dabei fielen ihre unterschiedlichen Bindungseigenschaften auf. Der Wirkungsmechanismus dieser beiden Antibiotika ist im Prinzip jedoch derselbe, nämlich die Inhibition von Enzymen der bakteriellen Zellmembran, welche die Stadien der Zellwandsynthese katalysieren. Daraus resultiert eine Instabilität der Zellwand mit anschließender Lyse.

Die inhibierten Enzyme der Zellmembran werden auch penicillinbindende Proteine (PBP) genannt. Insgesamt sind 7 PBP bekannt, wovon drei hochmolekulare für die  $\beta$ -Laktambindung am wichtigsten sind. Diese werden nach ihrer relativen Molekülmasse als PBP 1, 2 und 3 nummeriert.

Antibiotika lagern sich an unterschiedliche PBP an und blockieren folglich unterschiedliche PBP, was wiederum zu einer unterschiedlichen Wirkung an der

Bakterienzelle führt. Die Blockade nur eines der drei essentiellen PBP führt nicht unbedingt zum Absterben der Bakterienzelle. Der optimale Therapieerfolg, also der rasche Tod der Mikroorganismen, kann nur durch Inaktivierung aller drei PBPs erreicht werden. Viele Antibiotika induzieren jedoch zunächst die Bildung von deformierten, länglichen oder rundlichen aberranten Bakterien, welche noch leben. Dies geschieht in Abhängigkeit von der Konzentration des Antibiotikums, der PBP-Bindungsspezifität der Substanz und der Eigenschaft des inhibierten Proteins durch das Chemotherapeutikum. Bei Bindung des Antibiotikums an PBP 1 resultiert in einer Konzentration oberhalb der MHK ein relativ schnelles Absterben der Bakterien [102].

Im Gegensatz dazu erfolgt bei hoher Affinität zur Bindung an PBP 2 durch Hemmung des Keimzellmassenwachstums die Bildung von rundlichen Zellen, sogenannten Sphäroplasten. Dieser Umwandlung von gram-negativen Stäbchen in runde, sphäroide oder kokkoide, bakterielle Zellen folgt eine Bakteriolyse ohne einen allzu ausgedehnten Zellwandzerfall. Dadurch bleibt die Endotoxin-Freisetzung begrenzt [102, 105, 124].

Die Carbapeneme Imipenem und Meropenem sind typische Vertreter von PBP 2-Inhibitoren [60].

Weiter gehören Mecillinam, Clavulansäure, Cefepim und andere Cephalosporine der vierten Generation zu den PBP 2- spezifischen Antibiotika.

Durch selektives Binden der Antibiotika an PBP 3 wird die Bildung des Querseptums bei der Zellteilung verhindert, wodurch die Zellen unkontrolliert in die Länge wachsen. Es kommt zur Bildung von langen Filamenten. Zu den Antibiotika, die dieses Wachstum induzieren, gehören Aztreonam, Piperacillin, Mezlocillin, bei niedrigen Antibiotika-Konzentrationen auch Cefuroxim und die Cephalosporine der dritten Generation, unter ihnen auch das in dieser Arbeit wichtige Ceftazidim [37, 60, 96, 100].

Durch mehrere Arbeitsgruppen konnte nun gezeigt werden, dass die Lyse dieser filamentösen bakteriellen Zellen aufgrund der großen Biomasse zu einer schnellen und deutlichen Zunahme der Endotoxin -Freisetzung führt [66, 67, 70, 79, 104, 105, 119, 123, 124].

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnten sowohl in In-vivo- als auch in In-vitro-Studien erhöhte Endotoxin-Konzentrationen gemessen werden, wenn PBP 3-

spezifische Antibiotika bei gram-negativen Infektionen zum Einsatz kamen [70, 119, 123, 124].

Antibiotika anderer Wirkstoffklassen, deren Angriffspunkt nicht die bakterielle Zellwandsynthese ist, setzten nach Shenep et al., wie bereits oben erwähnt, weniger Endotoxin frei als die  $\beta$ -Lactame; allerdings bestehen auch unter ihnen einige Unterschiede bezüglich des LPS. So üben Polymyxine einen Endotoxin-bindenden Effekt aus und hemmen die biologische Aktivität der Endotoxine [8, 27, 30]. Bei ihrer Verwendung kommt es, wie auch bei anderen Nicht-Zellwandantagonisten, zu einem Viabilitätsverlust ohne ausgedehnte Lyse der Mikroorganismen, so dass die Konzentration an freiem Endotoxin relativ niedrig bleibt [92, 124, 127].

Auch durch den Einsatz von Aminoglykosiden werden nur geringe Endotoxin-Spiegel erzielt. Gentamicin, Tobramycin und Amikacin können Endotoxin binden und neutralisieren [6, 41].

Die Glykopeptide Vancomycin und Teicoplanin setzten sowohl wenig Endotoxin frei, können es aber auch neutralisieren und die biologischen Effekte herunterregulieren. Bezüglich der Fluorochinolone ist dagegen die Datenlage bisher nicht schlüssig. Durch einige Studien konnte eine sehr geringe Endotoxin-Freisetzung nach Verwendung von Ciprofloxacin nachgewiesen werden [92, 123], während in Arbeiten von Prins et al. mit Ciprofloxacin Effekte wie bei dem Einsatz von PBP 3-spezifischen Antibiotika beobachtet wurden, nämlich die Formation von langen, filamentösen Zellen und Induktion einer starken  $\text{TNF}\alpha$ - und IL-6-Antwort [102, 103].

In der vorliegenden Arbeit sollte nun der Einfluss der Fluorochinolone auf die Endotoxinfreisetzung weiter analysiert werden. Dazu wurde Moxifloxacin ausgewählt. Moxifloxacin ist ein Chinolon, das wie Trovafloxacin oder Clinafloxacin zu den Fluorochinolonen der Gruppe IV, eingeteilt nach Naber und Adam, gehört [94]. Es unterscheidet sich im Wesentlichen von den Fluorochinolonen der Gruppe 1, 2 und 3 durch eine höhere intrinsische Aktivität gegenüber grampositiven Erregern wie Staphylokokken, Streptokokken, Pneumokokken und Enterokokken bei, im Vergleich zu Gruppe 2 und 3, etwas schwächerer Aktivität gegen gram-negative Erreger. Hinzu kommt die verbesserte Wirkung gegen atypische Erreger und Anaerobier [132].

Weitere Merkmale sind die einmal tägliche Verabreichung und die niedrige Rate an Nebenwirkungen.

Haupteinsatz findet das im September 1999 eingeführte Moxifloxacin als Atemwegs-Antibiotikum, weitere Indikationen für den Einsatz der Substanz ergeben sich bei

Haut- und Weichteilinfektionen aufgrund der hohen Aktivität gegenüber den typischen Erregern sowie beim diabetischen Fuß-Syndrom durch die hohe Penetration in die Subcutis und die schnelle bakterizide Wirkung [44, 55, 56, 84, 88, 97].

Bei schweren Infektionen wie komplizierten intraabdominellen Infekten, Peritonitis und Sepsis stellt Moxifloxacin eine Alternative zu den bislang üblicherweise eingesetzten Antibiotikakombinationen in der kalkulierten Antibiotikatherapie wegen des raschen Wirkeintritts, des breiten Wirkspektrums und der einfachen Handhabung dar [56, 84].

Sowohl bei komplizierten intraabdominellen Infekten, als auch bei der Peritonitis oder der Sepsis ist mit einem breiten Erregerspektrum zu rechnen.

Bei komplizierten intraabdominellen Infekten variiert das Erregerspektrum sowohl in Abhängigkeit von der primären Erkrankung, als auch in Abhängigkeit davon, ob die Infektion ambulant oder hospitalisiert erfolgte. Insgesamt wurden Enterobakterien am häufigsten isoliert, unter denen wiederum *E. coli* die vorherrschende Spezies war. Jedoch andere gram-positive und gram-negative aerobe oder anaerobe Keime wurden ebenfalls in verschiedenen Kombinationen häufig nachgewiesen. Unter ihnen *B. fragilis* und andere *B. spp.*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, *Peptostreptococcus spp.* und *Clostridium spp.* Krankenhaus-assoziierte Infektionen hingegen wurden häufig durch antibiotikaresistente Keime, wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.*, methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus spp.* verursacht [29, 83, 117].

Auch wenn sich Ursache und Erregerspektrum komplizierter intraabdomineller Infektionen unterscheiden können, ist die Behandlung üblicherweise die gleiche, nämlich die chirurgische Intervention und die antimikrobielle Therapie. Solange es dies bezüglich keinen Keimnachweis gibt, ist eine empirische Therapie unausweichlich. Diese ist umso effektiver, wenn die antibiotische Substanz aerobe, anaerobe und Aktivität gegen *B. fragilis* in sich vereint [95].

Sobald Daten über das Erregerspektrum mit zugehörigem Antibiogramm bekannt sind, sollten Keim-spezifische Antibiotika verabreicht werden. Die zur Zeit anerkannte empirische Antibiotikatherapie komplizierter intraabdomineller Infekte beinhaltet  $\beta$ -Lactam-Antibiotika und Carbapeneme, oder besteht aus einer Kombination von *B. fragilis*-aktiven Substanzen ( im Allgemeinen Metronidazol oder Clindamycin) mit Cephalosporinen, Monobactamen oder Fluorochinolonen [91, 117].

Im Hinblick auf die Fluorochinolone konnte in einer Studie von Malangoni et al. gezeigt werden, dass eine Monotherapie mit Moxifloxacin in der Eradikation der meist vorhandenen aeroben und anaeroben Keime, vor allem E. coli und B. fragilis, bei einer komplizierten intraabdominellen Infektion ebenso effektiv ist, wie der Einsatz eines Standard-Kombinationsregimes, bestehend aus Piperacillin-Tazobactam gefolgt von Amoxicillin-Clavulansäure [84].

Einen speziellen Fall unter den komplizierten intraabdominellen Infektionen stellt die akut nekrotisierende Pankreatitis dar. Denn die akute Pankreatitis ist zunächst eine abakterielle Erkrankung, aus der schließlich doch 10 bis 20 % der entsprechenden Patienten eine akut nekrotisierende Pankreatitis mit infektiösen Komplikationen entwickeln, an denen dann wiederum auch heute noch 40 bis 70 % der Patienten versterben. Dennoch wird die standardisierte antibiotische Behandlung entsprechender Patienten weiterhin kontrovers diskutiert. Nationale und internationale Leitlinien zur Behandlung der akuten Pankreatitis empfehlen die prophylaktische antibiotische Behandlung von Patienten mit den Risiken eine sekundäre Infektion zu bekommen [10, 11, 47, 126, 132].

Viele offene Studien und Metaanalysen haben gezeigt, dass durch eine Antibiotikaprofylaxe sowohl eine Reduktion der Infektionsrate als auch der Mortalität oder eines schweren klinischen Verlaufes erreicht werden kann [57, 112].

Die einzige große, randomisierte doppel-blinde, klinische Studie, ASAP-Studie genannt, konnte jedoch keinen Vorteil der Antibiotikaprofylaxe bei Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis zeigen [69].

Mögliche Gründe für das Versagen der Studie sind der verspätete Einsatz der Antibiotika und die limitierte Penetration der Antibiotika in das Pankreasgewebe, denn das Pankreas stellt ein spezielles Gewebe mit verminderter Medikamentenpenetration dar. Die Anzahl der pankreasgewebegängigen Antibiotika ist gering. Aminoglycoside z.B. penetrieren nicht gut genug in das Gewebe [118].

Für die zur Behandlung der akuten Pankreatitis empfohlenen Antibiotika Imipenem sowie die Fluorochinolone Ciprofloxacin und Ofloxacin konnte allerdings bei Tieren und Menschen eine hohe Gewebegängigkeit (Gewebe/Plasma-Relation) nachgewiesen werden [3, 22, 38].

In einer neueren Studie von Wacke et al. konnte gezeigt werden, dass sich ein weiteres Fluorochinolon, nämlich Moxifloxacin, gut als Antibiotikaprofylaxe der akuten nekrotisierenden Pankreatitis eignet. Moxifloxacin penetriert gut in das

menschliche Pankreas und erreicht eine hohe Gewebekonzentration nach einmaliger oraler oder intravenöser Gabe. Auch unter Berücksichtigung des Erregerspektrums bei Patienten mit akuter nekrotisierender Pankreatitis mit relativer Verlagerung in den gram-positiven Bereich stellt Moxifloxacin eine interessante Alternative dar, da es eine gleichwertige Aktivität wie andere Fluorochinolone, z.B. Ciprofloxacin, gegenüber gram-negativen Keimen besitzt, aber eine höhere Aktivität gegen gram-positive Bakterien aufweist [13, 54].

Auch die Peritonitis oder die Sepsis kann, wie die oben beschriebenen intraabdominellen Infektionen, durch aerobe und anaerobe, gram-positive und gram-negative Erreger verursacht werden. Häufig liegt auch hier eine Mischinfektion vor.

Wichtigste Erreger bei der Peritonitis sind fakultativ aerobe Enterobakterien wie *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiellen* und *Enterococcus spp.*. Nicht selten sind aber auch obligat anaerobe Bakterien wie *Bacteroides spp.*, *Fusobakterien*, *Clostridien* und *Peptostreptokokken* an der Infektion beteiligt. Etwas anders sieht das Erregerspektrum bei der postoperativen Peritonitis aus, bei der infolge der fast regelhaften antibiotischen Vorbehandlung Enterokokken, Staphylokokken und gram-negative Erreger wie *E. coli*, *Proteus spp.* und *Klebsiella spp.* stärker vertreten sind. Therapeutisch ist primär eine chirurgische Herdsanierung vorzunehmen und ein breit und zugleich rasch wirkendes Antibiotikum zu verabreichen. Entsprechend der Leitlinien der amerikanischen Fachgesellschaft, die in etwas modifizierter Form von der Paul-Ehrlich-Gesellschaft übernommen wurde, kann bei der sekundären, lokal begrenzten Form der Peritonitis primär mit einem Aminopenicillin jeweils in Kombination mit einem  $\beta$ -Laktamase-Inhibitor behandelt werden. Bei der diffusen Peritonitis empfiehlt die Paul-Ehrlich-Gesellschaft ein Carbapenem oder ein Fluorochinolon der Gruppe IV, wie Moxifloxacin.

Bei der Sepsis ist nach Angaben des Kompetenznetzwerkes SepNet gleichermaßen mit gram-positiven und gram-negativen Erregern zu rechnen, wobei nach zahlreichen anderen Darstellungen die gram-negativen Erreger leicht überwiegen. Aufgrund der hohen Letalität der Sepsis ist, wie bei der Peritonitis, neben der Sanierung der Infektionsquelle eine rasche und zuverlässig wirksame Antibiotikatherapie erforderlich, wobei diese nach dem Prinzip der kalkulierten Therapie zu wählen ist.

Dabei wird das Erfolgskonzept der Antibiotikabehandlung im Rahmen der Sepsis auch durch die sich zunehmend verändernde Resistenzlage der Bakterien beeinflusst. Resistenzsurveillance-Studien zeigen, dass sogar Mikroorganismen der

physiologischen Standortflora zunehmend Resistenzen entwickeln: Inzwischen sind bereits 70 % der Koagulase-negativen Staphylokokken gegen verschiedene Antibiotika resistent. Auch bei Enterobakterien der Darmflora muss mit Resistenzen gegen Penicilline und gegen Cephalosporine gerechnet werden. Zu beachten ist weiter, dass obligat anaerobe *Bacteroides* spp. Metallo- $\beta$ -Laktamasen und Carbapenemasen bilden und so resistent gegenüber allen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, inklusive Carbapenemen, werden können. Vereinzelt sind auch bereits Resistenzen gegenüber Metronidazol bekannt. Ein besonderes Resistenzproblem stellen die nosokomialen Infektionen dar, die vor allem bei Intensivpatienten zu einer zusätzlichen Gefährdung führen. Nach Erhebungen des Kompetenznetzes Sepsis geht hier die Infektion der Sepsispatienten zu 63 % von den Atemwegen als führende Lokalisation aus, bei 25 % ist eine intraabdominelle Infektion die Ursache. Überproportional häufig entwickelt sich eine Sepsis oder ein septischer Schock bei älteren multimorbiden Patienten. Bei diesen Patienten ist aufgrund der oft vielfachen antibiotischen Vorbehandlung häufig mit einer Antibiotikaresistenz zu rechnen, was mit einem erhöhten Risiko einer inadäquaten empirischen Antibiotikatherapie mit einer erhöhten Rate an Therapieversagen und daher auch mit einer erhöhten Morbidität und Letalität verbunden ist.

Für die aus Atemwegsinfektionen hervorgehende Sepsis wird in zahlreichen Studien eine hohe, zum Teil überlegene klinische und bakteriologische Wirksamkeit von Moxifloxacin belegt. Auch bei der auf intraabdominellen Infektionen beruhenden Sepsis hat sich das Fluorochinolon wegen seines breiten Wirkspektrums inklusive Anaerobier und wegen seiner guten Penetrationsfähigkeit als wirksam erwiesen.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass *E. coli* und *B. fragilis* gerade bei der Peritonitis und der abdominalen Sepsis als Leitkeime anzusehen sind. Moxifloxacin ist wie oben dargestellt ein hochpotentes Antibiotikum gegen diese beiden Erreger und kommt zum klinischen Einsatz. Die Substanz gehört der Gruppe der Fluorochinolone an, von denen angenommen wird, dass sie wie die Carbapeneme geringe Mengen des wichtigen Sepsismediators, dem LPS, freisetzen. Daher scheint Moxifloxacin in Bezug auf die Endotoxin-Liberation gefahrlos einsetzbar zu sein, im Gegensatz zu dem Cephalosporin Ceftazidim, das durch die erhöhte LPS-Freisetzung eine gewisse Verschlimmerung des septischen Zustandes herbeiführen könnte. Weiter wird in Tiermodellen und in In-vitro-Studien ein immunmodulatorischer Effekt für Moxifloxacin beschrieben [35, 109].

Einige dieser In-vitro-Studien beschreiben einen signifikanten antiinflammatorischen Effekt von Moxifloxacin durch Inhibition der Produktion proinflammatorischer Zytokine in LPS-stimulierten menschlichen Neutrophilen und Monozyten [5, 137].

Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer Inhibition des nukleären Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und damit zu der Inhibition früher intrazellulärer Signalkaskaden der inflammatorischen Zellreaktion. Folglich kommt es zu Hemmung der proinflammatorischen Zytokinsynthese in Monozyten und anderen Neutrophilen [5, 137].

Aus diesem Hintergrund leitet sich die Fragestellung der vorliegenden Arbeit ab:

Wie ist die LPS -Freisetzung von Moxifloxacin im Vergleich zu Imipenem und Ceftazidim einzustufen und wie ist der biologische Effekt dieses LPS zu beurteilen, bzw. kann der beschriebene antiinflammatorische Effekt bestätigt werden.

So wurden verschiedene In-Vitro-Experimente mit *E. coli* Bort (O18:K1:H7) und *B. fragilis* (ATCC 23745) durchgeführt. Der *E. coli*- Stamm wurde verwendet, da von ihm bereits aus früheren Studien eine hohe LPS-Freisetzung bekannt war und monoklonale Antikörper zu Verfügung standen [21, 74, 76- 78].

*B. fragilis* wurde eingesetzt, um sowohl die Wirkung von Moxifloxacin auf anaerobe Keime zu zeigen, als auch zu prüfen, ob die durchzuführenden Versuche auf Anaerobier übertragbar sind.

Die beiden zellwandaktiven  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, die für die Untersuchungen zu *E. coli* eingesetzt wurden, waren Imipenem und Ceftazidim, die durch Inhibition verschiedener Enzyme der Bakterienmembran, niedrige bzw. hohe Mengen an Endotoxin, wie bereits oben beschrieben, freisetzen [59, 63, 68, 70, 104, 111, 119, 123, 124, 128].

Für *B. fragilis* wurde Ceftazidim gegen Cefoxitin ausgetauscht, da dieses im Gegensatz zu Ceftazidim auch eine Wirkung im anaeroben Keimspektrum aufweist, ansonsten aber in Bezug auf die LPS-Freisetzung die gleichen klassenspezifischen Eigenschaften besitzt.

Zunächst musste festgelegt werden, in welchen Konzentrationen die Antibiotika eingesetzt werden sollten. Dazu wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) im Bouillon-Mikro-Dilutionstest bestimmt. Es wurden drei Inokula,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  getestet, um den für  $\beta$ -Laktamasen beschriebenen Inokulum-Effekt ausschließen zu können. Alle ermittelten Werte lagen für die bekannten Präparate im vom Deutschen Institut für Normung e.V. angegebenen Toleranzbereich. Für

Moxifloxacin waren die MHKs für *E. coli* und für *B. fragilis* vergleichbar mit den Angaben zu den bereits bekannten Fluorochinolonen, wie z.B. Levofloxacin und Ciprofloxacin.

Während der anschließenden In-vitro-Inkubation der beiden Keime mit den jeweiligen Antibiotika in 2-, 10- und 50-facher MHK sowie einer antibiotikafreien Kontrolle, wurden in den Wachstumsversuchen die LPS-Proben gewonnen. Die mitgeführten Zellzahlkontrollen bei den Versuchen zu *E. coli* zeigten keine deutlichen Unterschiede. Bei allen 3 MHK-Stufen war die Erregerkonzentration nach 4 h Inkubationszeit um mehr als 3 log-Stufen abgefallen, ausgenommen von Ceftazidim bei 2 x MHK. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurde der Keim zu mindestens 99% (i.e. Keimreduktion um mehr als zwei Zehnerpotenzen) lysiert, wenig schwächer wirkte hier nur Ceftazidim bei 2 x MHK. Insgesamt war für Moxifloxacin zu allen Untersuchungszeitpunkten die stärkste bakterizide Wirkung zu verzeichnen. Für *B. fragilis* gestaltete sich das Wachstumsverhalten anders: bei zweifacher MHK konnte lediglich eine Konstanthaltung der Erregerkonzentration über einen Zeitraum von 8 h erzielt werden. Dann kam es unter Imipenem- und Cefoxitin-Einfluss jedoch zu einer Keimvermehrung von ca.  $10^1$  KBE, durch Moxifloxacin wurde die Keimzahl während des 24-stündigen Versuchsverlaufes um  $10^2$  KBE gesenkt. Erst bei zehnfacher MHK zeigte sich bei allen drei Antibiotika eine fast lineare Keimreduktion über einen 24-stündigen Inkubationszeitraum, wobei der Keim nach 24 h unter Moxifloxacin- und unter Cefoxitin-Einfluss um 3 log-Stufen reduziert wurde. Ein ähnliches Ergebnis konnte bei 50-facher MHK beobachtet werden, wobei hier schon nach 2 h eine Keimreduktion von  $10^2$  für alle Antibiotika verzeichnet wurde. Moxifloxacin war gegen *B. fragilis*, vergleichbar wie gegen *E. coli*, am stärksten wirksam. In den bei allen Inkubationsreihen mitgeführten Kontrollansätzen kam es zu einem Keimwachstum nach den typischen Gesetzmäßigkeiten der Bakterienvermehrung mit Anlaufphase, Beschleunigungsphase, exponentieller Phase, Verzögerungsphase und stationärer Phase.

In den beiden folgenden Versuchsteilen sollte nun das während der Wachstumsversuche freigesetzte Endotoxin gemessen werden. Dazu wurden zwei verschiedene Methoden, ein ELISA [25, 124, 125] sowie ein chromogener LAL-Test [26, 39, 70, 92, 102] angewandt. Grundlage des chromogenen LAL-Test ist die Abwehrreaktion des Pfeilschwanzkrebse *Limulus polyphemus* auf eine Infektion mit gramnegativen Bakterien. 1956 entdeckte F. Bang dass die Haemolymphe des

Limulus gerinnt, wenn diesen Tieren lebende oder tote gram-negative Bakterien injiziert werden [9]. 1964 fanden Levin und Bang heraus, dass die Amöbozyten, die einzige in der Haemolymphe enthaltene Zellart, für diese Gerinnungsreaktion verantwortlich sind, und die LPS-Fraktion in der Zellwand der gram-negativen Bakterien diese Reaktion auslöst [82]. In den Amöbozyten ist ein Enzymsystem lokalisiert, das nach seiner Aktivierung durch die bakteriellen Endotoxine das Protein Coagulogen spaltet. Die größeren Coagulogen-Bruchstücke verkleben miteinander zu einem Gel. Diese Reaktion ist mit der in Säugetieren vorkommenden Blutgerinnung vergleichbar. Berger et al. entwickelten 1988 diese Reaktion derart weiter, dass das aktivierte Enzymsystem ein chromogenes Substrat in p-Nitroanilin und Peptide umsetzt und hierdurch eine quantitative Messung des vorhandenen Endotoxin durch die Farbreaktion möglich wird [15]. Die enzymatische Reaktion dieses Tests wird durch die Kernregion des LPS getriggert, so dass speziell dieser Teil durch den chromogenen LAL-Test nachgewiesen wird. Er ist ein sehr empfindliches Meßsystem. Da schon geringste Mengen bioreaktiven Endotoxins detektiert werden, unabhängig von der bakteriellen Spezies, muss die Messung absolut kontaminationsfrei erfolgen. Weniger von äußeren Bedingungen beeinflussbar ist dagegen der ELISA. Da Serotyp-spezifische Antikörper eingesetzt werden, wird der Test nicht durch das Vorhandensein von Endotoxin anderer Spezies oder Serotypen beeinträchtigt. Der ELISA dieser Arbeit war nach dem Sandwich-Prinzip aufgebaut, d.h. das Endotoxin von *E. coli* wurde mittels zweier monoklonaler Antikörper spezifisch gebunden. Hier wurden die murinen Antikörper mAb 19 und mAb 141 verwendet, für die Kaufman et al. zeigten, dass sie an verschiedene Epitope der O-spezifischen Seitenketten binden, nicht aber an Lipoid A [74]. Mit dem ELISA lag also ein Meßsystem vor, das spezifisch den Seitenkettenanteil des LPS detektiert.

Mit Hilfe beider Tests wurden in den *E. coli*- Kontrollproben die mit Abstand höchsten LPS-Konzentrationen gemessen. Für Imipenem und Moxifloxacin wurde im ELISA bei 2-facher MHK über den gesamten Inkubationszeitraum eine vergleichbare, leichte LPS-Konzentrationszunahme von fast  $3 \times 10^2$  ng/ml LPS verzeichnet. In den Ansätzen zu 10-facher und 50-facher MHK wurden für Imipenem und Moxifloxacin im ELISA wiederum ähnlich geringe Endotoxin-Konzentrationen gemessen, wobei es während der 24-stündigen Bebrütung nicht einmal zu einem LPS-Konzentrationsanstieg um den Faktor 100 kam, was durch die stärkere KBE-

Reduktion im Inkubationszeitraum bei höherer Antibiotikakonzentration zu erklären war. In allen Ceftazidim behandelten Kulturüberständen konnte im ELISA ein signifikant höherer Endotoxingehalt gemessen werden als in den Imipenem- und Moxifloxacin-Inkubationsproben. Dabei waren die Werte bei 2- und 50-facher MHK für Ceftazidim ähnlich hoch mit einer maximalen LPS-Zunahme von  $5 \times 10^2$  ng/ml nach 24-stündiger Bebrütung. Bei 10-facher MHK konnten die höchsten LPS-Konzentrationen mit  $9 \times 10^2$  ng/ml nach 24 h Inkubationszeit ermittelt werden, da hier ein ideales Verhältnis von KBE und hoher Keimreduktion vorlag.

Insgesamt konnte mit Hilfe des ELISA in den antibiotikabehandelten Inkubationüberständen nach 6-stündiger Bebrütung der jeweilige Peak der Endotoxinausschüttung ermittelt und auch schon eine deutlich höhere Endotoxin-Liberation von Ceftazidim im Vergleich zu Imipenem und Moxifloxacin gemessen werden. Nach 24-stündiger Bebrütung war der Unterschied am größten. Die Erklärung dafür liegt, wie oben beschrieben, in den unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der Antibiotika, mit Bindung an PBP 2 bzw. 3, bzw. Hemmung der Nukleinsäuresynthese durch Interaktion mit der Gyrase. Moxifloxacin setzte mit Imipenem vergleichbar geringe Mengen LPS frei, wobei die Endotoxin-Konzentrationen für die Imipenem behandelten Inokula bei 10 und 50 x MHK um rund 40 ng/ml minimal geringer waren, als für die Moxifloxacin behandelten Inokula. Durch den chromogenen LAL-Test konnten die Ergebnisse des ELISA für *E. coli* bestätigt werden. Es kam bei 2-facher MHK unter dem Einfluss von Imipenem und Moxifloxacin zu weniger LPS-Liberation als unter dem von Ceftazidim, wobei der Peak der Endotoxinausschüttung von Moxifloxacin und Ceftazidim bereits nach 6 h erreicht wurde. Durch Imipenem hingegen wurde über den Inkubationszeitraum von 24 h eine kontinuierliche Zunahme der LPS-Freisetzung verzeichnet. Nach 24-stündiger Inkubation wurde für Moxifloxacin eine LPS-Konzentrationszunahme von nur  $2 \times 10^2$  ng/ml gemessen, für Imipenem lag diese mit  $3 \times 10^2$  ng/ml etwas höher. Der Ceftazidim-Einfluss führte sogar zu einer Konzentrationserhöhung um  $4 \times 10^2$  ng/ml. Für 10- und 50-fache MHK waren die im chromogenen LAL-Test gemessenen LPS-Konzentrationen in den Imipenem- und Moxifloxacin-Proben vergleichbar niedrig ohne Konzentrationsanstieg während des 24-stündigen Versuchsverlaufs und lagen unter den Werten zu 2 x MHK. Ceftazidim induzierte in diesen Konzentrationen eine deutlich höhere Endotoxinausschüttung, mit einem LPS-Anstieg von  $5 \times 10^2$  ng/ml für 10 x MHK und  $3,5 \times 10^2$  ng/ml für 50 x MHK. Wie auch im ELISA konnte durch den

chromogenen LAL-Test insgesamt gezeigt werden, dass bereits nach einem Inkubationszeitraum von 6 h große Unterschiede in der LPS-Freisetzung von Imipenem sowie Moxifloxacin mit niedrigen Werten zu Ceftazidim mit hohen Werten zu verzeichnen waren. Dieser Unterschied stieg mit zunehmender Inkubationszeit weiter an und war signifikant.

Die Proben aus den In-vitro-Inkubationen zu *B. fragilis* ließen sich wie oben beschrieben mit dem ELISA nicht untersuchen, da zu diesem anaeroben Keim keine Antikörper für den oben beschriebenen oder einen vergleichbaren ELISA-Test vorlagen. Doch auch mit dem chromogenen LAL-Test waren keine Aussagen zur LPS-Liberation aus *B. fragilis* zu treffen, da die gemessene optische Dichte in den eingesetzten Wachstumsversuchsproben der Kontrollgruppe von 0 und 8 h Inkubationszeit bei 10 x MHK keine Unterschiede aufzeigte, obwohl es im Wachstumsversuch zu einem KBE-Anstieg von einer Zehnerpotenz gekommen war und somit auch eine LPS-Zunahme stattgefunden haben musste.

Um nun die biologische Aktivität des Antibiotika induzierten *E. coli*-LPS, aber auch die des bisher nicht detektierten, doch potentiell vorhandenen *B. fragilis*-LPS zu untersuchen, sollte sowohl die  $\text{TNF}\alpha$ , als auch die  $\text{IL-1}\beta$ -Ausschüttung aus einer monozytären Zelllinie als Antwort auf die Stimulation der Zellen durch LPS gemessen werden.  $\text{TNF}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$  spielen in der Pathogenese des septischen Schocks eine Schlüsselrolle. Im Tierversuch konnten durch die parenterale Verabreichung von TNF verschiedene Schock-assoziierte Symptome wie Blutdruckabfall, Einschränkung der Myokardfunktion und Organversagen ausgelöst werden [133].

Zunächst wurde für das *E. coli*-LPS eine Kinetik der  $\text{TNF}\alpha$ -Liberation erstellt, um den Zeitpunkt der höchsten Ausschüttung dieses Zytokins zu ermitteln. Das stimulierende LPS stammte aus dem Wachstumsversuch von 10 x MHK nach einer Inkubationszeit von 6 h, da im ELISA und chromogenen LAL-Test hier der Peak in der LPS-Liberation der Proben gemessen wurde. Aus der  $\text{TNF}\alpha$ -Kinetik war zu entnehmen, dass nach einem Inkubationszeitraum von 6 bis 8 h die stärkste Ausschüttung dieses Zytokins aus der Mono Mac 6 -Zelllinie stattfand. Daher wurde in den weiteren Messungen die  $\text{TNF}\alpha$ -Liberation nach 6 und 8 h bestimmt. Als stimulierendes LPS wurden nun alle Proben des Wachstumsversuches nach einer 6-stündigen Inkubationszeit getestet. Die Kontrollproben induzierten in allen Messungen, wie erwartet die höchste  $\text{TNF}\alpha$ -Liberation. Bei 2 x MHK lagen die Werte für Imipenem entgegen den Erwartungen nach 6 h Inkubationszeit ähnlich hoch wie die von

Ceftazidim, nach 8 h entsprach dann die um 100 pg/ml geringere Zytokinfreisetzung unter Imipenem- als unter Ceftazidim-Einfluss jedoch wieder den Aussagen des ELISA und chromogenen LAL-Tests. Die Moxifloxacin-Proben setzten bei 2 x MHK um 200 pg/ml geringere TNF $\alpha$ -Mengen frei als die Ceftazidim-Proben. Bei 10 und 50 x MHK lagen die gemessenen TNF $\alpha$ -Konzentrationen in Korrelation zum ELISA und zum chromogenen LAL-Test für Imipenem und Moxifloxacin zu beiden Inkubationszeitpunkten gleich niedrig mit deutlichem Unterschied zu den bis zu 6 x höheren Werten der Ceftazidim-Proben.

Zur Messung von IL-1 $\beta$  wurde wie im Versuch zu TNF $\alpha$  zunächst die Kinetik der Zytokinausschüttung bestimmt, um wiederum den Peak der Zytokin-Expression festzustellen. Im Gegensatz zu TNF $\alpha$  wurde IL-1 $\beta$  erst sehr spät von den Zellen freigesetzt, so dass in den weiteren Versuchen zu IL-1 $\beta$  die Probenentnahme nach einer Inkubationszeit von 96 h stattfand. Die Stimulation der Monozyten erfolgte mit E. coli-LPS-Proben des Wachstumsversuches zu allen MHKs nach einer 6-stündigen Inkubation. Im Kontrollansatz wurden, wie in allen Versuchen zuvor, wiederum die höchsten Werte ermittelt. Die Imipenem-Proben induzierten bei 2-facher MHK, wie schon in den Messungen zu TNF $\alpha$ , eine nicht erwartete hohe Zytokinexpression. Hier lagen die Werte nun sogar über denen von Ceftazidim bei 2 x MHK. Möglicherweise war es bei der niedrigen MHK bezüglich der Imipenem-Proben zu einer partiellen Bakteriostase ohne Bakteriozidie im Wachstumsversuch gekommen, so dass der Keim während der Inkubation der Monozyten erneut proliferieren und weiteres LPS freisetzen konnte. Eine weitere, eher unwahrscheinliche Erklärung wäre die Verunreinigung der Proben. Von einer besonders starken LPS-Stimulation ist nicht auszugehen, denn die LPS-Konzentration lag im ELISA und chromogenen LAL-Test nach 6 h Inkubation bei allen 3 MHKs vergleichbar niedrig, wie die von Moxifloxacin. Auch eine besondere Stimulation durch den Einfluss des Antibiotikums ist nicht anzunehmen, da die Ergebnisse zu 10 und 50 x MHK wie erwartet ausfielen. Hier zeigte sich nämlich unter Inkubation mit Imipenem eine geringere Zytokinausschüttung, als unter der mit Ceftazidim. Die Moxifloxacin-Proben induzierten bei allen drei MHK-Stufen die geringste IL-1 $\beta$ -Ausschüttung. Insgesamt setzten die Monozyten unter dem Einfluss von Ceftazidim signifikant mehr Zytokine frei, als unter dem von Moxifloxacin; auch der Unterschied zu den Imipenem-Proben war deutlich. So konnte durch die Zytokinmessung gezeigt werden, dass sowohl in frühen, als auch späten Phasen der Sepsis-Reaktion die Stimulation der Monozyten

und das Ausmaß der TNF $\alpha$ - bzw. IL-1 $\beta$ -Freisetzung mit der vorhandenen E. coli-LPS-Konzentration korrelierten.

Zur Bestimmung der durch B. fragilis-LPS induzierten TNF $\alpha$ - bzw. IL-1 $\beta$ -Liberation sollte analog zu E. coli zunächst jeweils eine Kinetik erstellt werden. Dazu wurden die Ergebnisse der E. coli-Versuche zu Grunde gelegt, so dass Proben des Wachstumsversuchs bei 10 x MHK zu den Inkubationszeitpunkten 4, 6 und 8 h als Stimulation für die Monozyten dienten und eine Inkubation mit diesen Proben von 24 bzw. 96 h durchgeführt wurde. Hier kam es jedoch weder in der Kontrolle noch in den Antibiotika-induzierten LPS-Proben zu einem Anstieg der Zytokin-Konzentration über den Versuchszeitraum, noch war ein Unterschied zwischen den einzelnen Proben zu den jeweiligen Inkubationszeitpunkten zu verzeichnen. Folglich war mit diesen Zytokin-ELISAs die biologische Aktivität des vermutlich vorhandenen B. fragilis-LPS nicht nachzuweisen.

Zuletzt konnte mithilfe der Phasenkontrastdarstellung gezeigt werden, dass wie bereits oben beschrieben, die Gründe der unterschiedlichen Höhe der LPS-Liberation und der daraus resultierenden proinflammatorischen Wirkung in einer morphologischen Veränderung der Bakterien liegen. Unter Ceftazidim zeigte sich eine filamentöse Bakterienproliferation mit größerer Biomasse und damit verbunden mehr freigesetztem Endotoxin, wohingegen die Bakterien unter Imipenem und Moxifloxacin eine sphäroide bzw. kokkoide Form annahmen und daraus resultierend bei weniger Zelloberfläche auch weniger Endotoxin liberierten. Zusammenfassend ist aus den Ergebnissen, der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, zu entnehmen, dass das, unter Einfluss aller getesteten Antibiotika, aus der Zellmembran gram-negativer Keime freigesetzte Endotoxin bioreaktiv ist. Bereits veröffentlichte Daten, die für Imipenem eine geringe und für Ceftazidim eine hohe LPS-Freisetzung beschreiben, konnten bestätigt werden [21, 70, 71]. Das neu einzustufende Moxifloxacin, aus der Gruppe der Fluorochinolone, ist den wenig LPS-induzierenden Antibiotika zuzuordnen. Damit konnte die Aussage von Trautmann et al., die Untersuchungen an Ciprofloxacin durchgeführt hatten, bezüglich der Fluorochinolone erhärtet werden [123]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass unter Moxifloxacin-Einfluss von einer niedrigen proinflammatorischen Potenz, passend zu den Aussagen von Weber et al., auszugehen ist [135].

Welche klinische Relevanz die hier aufgeführten Befunde haben, muss in Anbetracht des Fehlens groß angelegter Vergleichsstudien offen bleiben. Mehrere bereits

durchgeführte klinische Studien haben jedoch erste Hinweise auf einen möglichen Vorteil einer reduzierten Endotoxin-Freisetzung erbracht [93, 103].

Insbesondere die Vergleichsstudie von Prins et al., in der zwei Gruppen von gut vergleichbaren Urosepsis-Patienten zum einen mit dem Carbapenem Imipenem und zum anderen mit dem Cephalosporin Ceftazidim behandelt wurden, erbrachten einen deutlichen klinischen Vorteil durch die Behandlung mit Imipenem. Während der Endotoxingehalt bei den mit Ceftazidim behandelten Patienten nach 4 h im Blut und Urin deutlich anstieg, war bei den mit Imipenem behandelten Patienten kein Anstieg von Endotoxin zu beobachten [103]. Klinisch entsprach diesen Befunden eine schnelle Entfieberung der Patienten.

Daher sollten in Zukunft einerseits weitere experimentelle sowie ausreichend große, kontrollierte, klinische Studien folgen, die die in der Sepsistherapie eingesetzten Antibiotika hinsichtlich ihrer LPS-Liberation untersuchen, andererseits sollte weiter der Einsatz adjunktiver Therapiestrategien, wie z.B. die Entwicklung von Antikörpern oder Antagonisten gegen wesentliche Sepsismediatoren, verfolgt werden.

## 5. Zusammenfassung

Die Sepsis gefährdet in vielen medizinischen Fachdisziplinen die Therapieerfolge der modernen Medizin. Ausgelöst durch Bakterien, Pilze, oder Parasiten bedroht die Sepsis die Menschheit seit Jahrtausenden. Seit fast 40 Jahren beschäftigt sich die Forschung intensiv damit, die Pathophysiologie der Sepsis besser zu verstehen und Ansätze für eine mögliche Behandlung zu definieren. Doch trotz aller Fortschritte versterben noch immer etwa 40% der betroffenen Patienten.

Im Vordergrund der Sepsistherapie stehen neben adjunktiven Therapieansätzen ganz klar die interventionelle, bzw. operative und die antimikrobielle Sanierung des Sepsisherdes durch Antibiotika. Durch den Einsatz der Antibiotika soll der die Sepsis unterhaltende Mikroorganismus eliminiert und der Makroorganismus gleichzeitig durch Nebenwirkungen möglichst wenig geschädigt werden. Eine ganz besonders gewichtige all dieser Nebenwirkungen stellt die antibiotikainduzierte Endotoxin-Freisetzung bei der Behandlung gram-negativer Bakterien dar. Endotoxin vermag im Makroorganismus über die Bindung an die Zellmembran von Makrophagen zahlreiche proinflammatorische Zytokine zu liberieren und damit eine Kaskade von pathologischen Reaktionen hervorzurufen, die letztendlich im septischen Schock oder Multiorganversagen enden können. Damit stellt es einen der wichtigsten Trigger in der Pathogenese des septischen Schocks als Folge gram-negativer Infektionen dar. Dieses Endotoxin, ein Lipopolysaccharid, kann spontan während der Vermehrung gram-negativer Bakterien oder aber besonders während des Zelluntergangs, ausgelöst durch die bakterizide Wirkung von Antibiotika, liberiert werden. Dabei wurde in der Vergangenheit beobachtet, dass die Menge des freigesetzten Endotoxins abhängig von dem Einsatz des jeweiligen Antibiotikums ist. Basierend auf diesem Hintergrund wurden verschiedene Studien mit dem Ziel, die Endotoxinfreisetzung unter dem Einfluss unterschiedlicher Antibiotikaklassen aufzuzeigen, durchgeführt. Dabei haben sich zum Teil signifikante Unterschiede im Ausmaß der Endotoxinliberation zwischen den einzelnen Klassen ergeben. So liberieren z.B. Carbapenem-Antibiotika nur geringe Mengen, Cephalosporine jedoch hohe Mengen an Lipopolysaccharid. Diese Unterschiede basieren auf den verschiedenen Wirkprinzipien der einzelnen Antibiotikaklassen.

Vor diesem Hintergrund sollte in der vorgelegten Arbeit die bakterizide Wirkung des neu entwickelten Antibiotikums Moxifloxacin auf die gram-negativen Keime

Escherichia coli und Bacteroides fragilis getestet und der Einfluss dieser Substanz auf die Endotoxinfreisetzung mit der anderer Antibiotika unterschiedlichen Wirkprofils verglichen werden. Für Escherichia coli wurden dazu mittels eines enzyme-linked immunosorbent assay-Testsystems sowie des chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Tests die freigesetzten Endotoxinmengen nach Inkubation des Keims mit den verschiedenen Antibiotika bestimmt. Für Bacteroides fragilis sollte nur der chromogene Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test eingesetzt werden. Es konnte gezeigt werden, dass alle Antibiotika die gram-negativen Keime rasch lysierten. Die ermittelten Werte hinsichtlich der Endotoxinfreisetzung zeigten für Escherichia coli signifikante Unterschiede, wobei das als Negativkontrolle mitgeführte Imipenem wenig und das als Positivkontrolle eingesetzte Ceftazidim viel Endotoxin liberierte. Das neu zu klassifizierende Moxifloxacin setzte mit Imipenem vergleichbar geringe Mengen an Endotoxin frei. Das Lipopolysaccharid von Bacteroides fragilis war mit dem chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test nicht zu detektieren.

Durch Stimulation einer Monozytenzelllinie mit den antibiotikahaltigen Kulturüberständen konnte die biologische Aktivität des liberierten Escherichia coli-Endotoxins aufgezeigt werden, indem die exprimierten Zytokine Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und Interleukin-1 $\beta$  quantitativ gemessen wurden. Außerdem bestätigte sich so das unterschiedliche Potential der drei Antibiotikaklassen zur Endotoxinfreisetzung. Das Bacteroides fragilis-Lipopolysaccharid hingegen zeigte keine Bioreaktivität.

Zuletzt wurden die morphologischen Veränderungen der proliferierenden Bakterienzellen vor der Zellyse unter Einfluss der verschiedenen Antibiotika mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie untersucht. Hierdurch konnte als morphologisches Korrelat zu den oben beschriebenen Versuchsergebnissen eine Sphäroplastenbildung unter Imipenem und Moxifloxacin sowohl für Escherichia coli, als auch für Bacteroides fragilis beobachtet werden. Im Gegensatz dazu kam es unter Ceftazidimeinfluss zu einem Längenwachstum beider Keime mit Filamentbildung und damit zu einer Oberflächenzunahme, was mit einem Mehrangebot an Lipopolysaccharid einhergeht.

Insgesamt mehren sich die Hinweise aus In-vitro-Studien, Tiermodellen und klinischen Untersuchungen, dass die antibiotikavermittelte Endotoxinfreisetzung einen ungünstigen Einfluss auf den Verlauf der Sepsis hat. Allerdings fehlen zur Zeit noch Ergebnisse aus großen randomisierten Studien mit hohen Fallzahlen, um sicher sagen zu können, welche Rolle dieser Endotoxinliberation tatsächlich zukommt.

## 6. Literatur

1. Abraham E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive Care Med* 25: 556-66 (1999).
2. Abraham E, Reinhart K, Opal S. Efficacy and safety of tifacogin (recombinant tissue factor pathway inhibitor) in severe sepsis: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* 290: 238-47 (2003).
3. Adam U, Herms S, Werner U. The penetration of ciprofloxacin into human pancreatic and peripancreatic necroses in acute necrotizing pancreatitis. *Infection* 29: 326-31 (2001).
4. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, out-come, and associated costs of care. *Crit Care Med* 29: 1303-10 (2001).
5. Araujo FG, Slifer TL, Remington JS. Effect of moxifloxacin on secretion of cytokines by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Clin Microbiol Infect* 8: 26-30 (2002).
6. Artenstein AW, Cross AS. Inhibition of endotoxin reactivity by aminoglycosides. *J Antimicrob Chemother* 24: 826-8 (1989).
7. Astiz ME, Rackow EC. Septic shock. *Lancet* 351: 1501-05 (1998).
8. Baldwin G, Alpert G, Caputo GL, Baskin M. Effect of polymyxin B on experimental shock from meningococcal and Escherichia coli endotoxins. *J Infect Dis* 164: 542-9 (1991).
9. Bang FB. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull Johns Hopkins Hospital* 98: 325 (1956).

10. Banks PA. Practice guidelines in the acute pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 92: 377-86 (1997).
11. Bassi C, Villatoro E, Larvin M. Antibiotic therapy for prophylaxis against infection of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 4: CD002941 (2003).
12. Baue AE. Multiple organ failure, multiple organ dysfunction syndrome, and systemic inflammatory response syndrome. Why not magic bullets? *Arch Surg* 132: 703-7 (1997).
13. Beger HG, Rau B, Isenmann R. Antibiotic prophylaxis in severe acute pancreatitis. *Pancreatology* 5: 10-9 (2005).
14. Bellomo R. The cytokine network in the critically ill. *Anaesth Intensive Care* 20: 283-02 (1992).
15. Berger D, Marzinzig E, Marzinzig M, Beger HG. Quantitative endotoxin determination in blood-chromogenic modification of the limulus amoebocyte lysate test. *Eur Surg Res* 20: 128-36 (1988).
16. Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 344: 699-709 (2001).
17. Bone RC, Fisher CJ Jr., Clemmer TP. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 317: 653-58 (1987).
18. Botta GA, Park JT. Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J Bacteriol* 145: 333-40 (1981).

19. Brock TD: The cellwall of Bacteria: Structure and Function. In: Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J (Hrsg.) *Biology of Microorganisms*, 8. Aufl, Prentice-Hall International, London, S. 58-64 (1997).
20. Brosius F: Korrelation und Regression. In: Brock F (Hrsg.) *SPSS-Programmierung: Effizientes Datenmanagement und Automatisierung mit SPSS-Syntax*. MITP, Bonn, S. 432-34 (2008).
21. Bucklin SE, Fujihara Y, Leeson MC, Morrison DC. Differential antibiotic-induced release of endotoxin from Gram-negative bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 43-51 (1994).
22. Büchler M, Malfertheiner P, Friess H. Human pancreatic tissue concentration of bactericidal antibiotics. *Gastroenterology* 103: 1902-8 (1992).
23. Bühl A: Korrelationskoeffizient nach Pearson. In: Bühl A (Hrsg.) *SPSS 12: Einführung in die moderne Datenanalyse unter Windows*. Pearson, München, S. 323-24 (2006).
24. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 119: 771-8 (1993).
25. Cohen J, Mc Connell JS. Observations on the measurement and evaluation of endotoxemia by a quantitative limulus lysate microassay. *J Infect Dis* 150: 916-24 (1984).
26. Cohen J, Mc Connell JS. Release of endotoxin from bacteria exposed to ciprofloxacin and its prevention with polymyxin B. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 5: 13-7 (1986).
27. Cohen J, Aslam M, Pusey CD, Ryan CJ. Protection from endotoxemia: a rat model of plasmapheresis and specific adsorption with polymyxin B. *J Infect Dis* 155: 690-5 (1987).

28. Cohen J. The detection and interpretation of endotoxemia. *Intensive Care Med* 26: 51-56 (2000).
29. Condon RE, Wittmann DH: Intraabdominal infections. In: Gorbach S, Blacklow N, Bartlett JG (Hrsg.) *Infectious Diseases*, 2. Aufl, Saunders, Philadelphia, S. 793-800 (1998).
30. Cooperstock MS. Inactivation of endotoxin by polymyxin B. *Antimicrob Agents Chemother* 6: 422-5 (1974).
31. Crosby HA, Bion JF, Penn CW, Elliott TS. Antibiotic-induced release of endotoxin from bacteria in vivo. *J Med Microbiol* 40: 23-30 (1994).
32. Cross AS, Opal SM. Endotoxin`s role in gram-negative bacterial infection. *Curr Opin Infect Dis* 8: 156-63 (1995).
33. Dalhoff A, Petersen U, Endermann R. In vitro activity of Bay 12-8039, a new 8-methoxy-quinolone. *Chemotherapy* 42: 410-25 (1996).
34. Dalhoff A. In vitro activities of quinolones. *Expert Opin Investig Drugs* 8: 123-37 (1999).
35. Dahlhoff A, Shalit I. Immunomodulatory effects of quinolones. *Lancet* 3: 359-71 (2003).
36. Dimopoulou I, Marathias K, Geroulanos S. What is proven in Therapeutic Measurements of Early Sepsis. *Infection* 2: 115-21 (1995).
37. Dofferhoff AS, Nijland JH, de Vries-Hospers HG. Effect of different types and combinations of antimicrobial agents on endotoxin release from gram-negative bacteria: an in-vitro and in-vivo study. *Scand J Infect Dis* 23: 745-54 (1991).
38. Drewelow B, Koch K, Hehl FM. Penetration of antibiotics into pancreatic juice and tissue. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 30: 494 (1992).

39. Eng RH, Smith SM, Fan-Harvard P, Ogbara T. Effect of antibiotics on endotoxin release from gram-negative bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 16: 185-9 (1993).
40. Evens ME, Pollack M. Effect of antibiotic class and concentration on the release of lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 167: 1336-43 (1993).
41. Foca A, Matera G, Iannello D, Berlinghieri MC. Aminoglycosides modify the in-vitro metachromatic reaction and murine generalized Shwartzman phenomenon induced by *Salmonella minnesota* R595 lipopolysaccharide. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2161-4 (1991).
42. Framer TW. Jarisch-Herxheimer reaction in early syphilis: treatment with crystalline penicillin G. *Journal of the American Medical Association* 138: 480-5 (1948).
43. Frieling JTM, Mulder JA, Hendriks T, Curfs JH, Van der Linden CJ, Sauerwein RW. Differential induction of pro- and antiinflammatory cytokines in whole blood by bacteria: effects of antibiotic treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1439-43 (1997).
44. Fung HB, Chang JY, Kuczynski S. A practical guide to the treatment of complicated skin and soft tissue infections. *Drugs* 63: 1459-80 (2003).
45. Galloway RE, Levin J, Butler T, Naff GB. Activation of protein mediators of inflammation and evidence for endotoxemia in *Borrelia recurrentis* infection. *Am J Med* 63: 933-8 (1977).
46. Gelfand JA, Elin RJ, Berry FW, Frank MM. Endotoxemia associated with the Jarisch-Herxheimer reaction. *N Engl J Med* 295: 211-13 (1976).

47. Gemeinsame Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie und der Deutschen Gesellschaft für Viszeralchirurgie. Therapie der akuten Pankreatitis. In: Grundlagen der Chirurgie G 93, Beilage zu: Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie 9 (4). <http://www.uni-duesseldorf.de/WWW/AWMF/II/021-010.htm> (7 July 2006, date last accessed) (2000).
48. Ginsburg I, Kohen R. Cell damage in inflammatory and infectious sites might involve a coordinated „cross-talk“ among oxidants, microbial hemolysins and amphiphiles, cationic proteins, phospholipases, proteinases and cytokines. *Free Radic Res* 22: 489-517 (1995).
49. Ginsburg I. Could synergistic interactions among reactive oxygen species, proteinases, membrane-perforating enzymes, hydrolases, microbial haemolysins and cytokines be the main cause of tissue damage in infectious and inflammatory conditions? *Med Hypotheses* 51: 337-46 (1998).
50. Ginsburg I. Multi-drug strategies are necessary to inhibit the synergistic mechanism causing tissue damage and organ failure. *Inflammopharmacology* 7: 207-17 (1999).
51. Ginsburg I, Ward PA, Verani J. Can we learn from pathogenetic strategies of group A hemolytic streptococci how tissue are injured and organs fail in post-infectious and inflammatory sequelae? *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 325-38 (1999).
52. Ginsburg I. Hypothesis: Is a failure to prevent bacteriolysis and the synergy among microbial and host-derived proinflammatory agonists the main contributory factors to the pathogenesis of post-infectious sequelae? *Inflammation* 25: 1-10 (2001).
53. Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet* 2: 171-9 (2002).

54. Gloor B, Müller CA, Worni M. Pancreatic infection on severe pancreatitis: the role of fungus and multiresistant organisms. *Arch Surg* 136: 592-6 (2001).
55. Goldstein EJ, Citron DM, Hudspeth M, Hunt Gerardo S, Meriam CV. In vitro activity of Bay 12-8039, a new 8-methoxyquinolone, compared to the activity of 11 other oral antimicrobial agents against 390 aerobic and anaerobic bacteria isolated from human and animal bite wound skin and soft tissue infections in humans. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1552-7 (1997).
56. Goldstein EJ. Intra-abdominal anaerobic infections: bacteriology and therapeutic potential of newer antimicrobial carbapenem, fluoroquinolone and desfluoroquinolone therapeutic agents. *Clin Infect Dis* 35: 106-11 (2002).
57. Golub R, Siddiqi F, Pohl D. Role of antibiotics in acute pancreatitis: a meta-analysis. *J Gastrointest Surg* 2: 496-503 (1998).
58. Goris RJ. Mediators of multiple organ failure. *Intensive Care Med* 16: 192-6 (1990).
59. Gould IM, Mac Kenzie FM. The response of Enterobacteriaceae to beta-lactam antibiotics - round forms, filaments and the reed of all evil. *J Antimicrob Chemother* 40: 495-9 (1997).
60. Hanberger H, Nilsson LE, Kihlstrom E, Maller R. Postantibiotic effect of beta-lactam antibiotics on *Escherichia coli* evaluated by bioluminescence assay of bacterial ATP. *Antimicrob Agents Chemother* 34: 102-6 (1990).
61. Hartung J: Die Korrelationsanalyse. In: Hartung J, Elpelt E (Hrsg.) *Multivariate Statistik*, 5. Aufl, München, Wien, Oldenbourg, S. 143-167 (1995).
62. Holzheimer RG. The significance of endotoxin release in experimental and clinical sepsis, in surgical patients-evidence for antibiotic-induced endotoxin release? *Infection* 26: 77-84 (1998).

63. Horii T, Kobayashi M, Sato K, Ichiyama S, Otha M. An in-vitro study of carbapenem-induced morphological changes and endotoxin release in clinical isolates of gram-negative bacilli. *J Antimicrob Chemother* 41: 435-42 (1998).
64. Horn DL, Opal SM, Lomastro E. Antibiotics, cytokines, and endotoxin, a complex and evolving relationship in Gram-negative sepsis. *Scand J Infect Dis* 101: 9-13 (1996).
65. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348: 138-50 (2003).
66. Hurley JC. Antibiotic-induced release of endotoxin: a reappraisal. *Clin Infect Dis* 15: 840-54 (1992).
67. Hurley JC. Reappraisal of the role of endotoxin in the sepsis syndrome. *Lancet* 341: 1133-5 (1993).
68. Hurley JC. Antibiotic-induced release of endotoxin. A therapeutic paradox. *Drug Saf* 12: 183-95 (1995).
69. Isenmann R, Rünzi M, Kron M. Prophylactic antibiotic treatment in patients with predicted severe acute pancreatitis: a placebo-controlled, double-blind trial. *Gastroenterology* 126: 997-1004 (2004).
70. Jackson JJ, Kropp H. Beta-Lactam antibiotic-induced release of free endotoxin: in vitro comparison of penicillin-binding protein (PBP) 2-specific imipenem and PBP 3-specific ceftazidime. *J Infect Dis* 165: 1033-41 (1992).
71. Jackson JJ, Kropp H. Differences in mode of action of beta-lactam antibiotics influence morphology, LPS release and in vivo antibiotic efficacy. *J Endotoxin Res* 3: 201-18 (1996).

72. Janssen J: Korrelation und Distanzen. In: Janssen J, Laatz W (Hrsg.) Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows, 6. Aufl, Springer, Berlin, Heidelberg, S. 397-414 (2005).
73. Jarisch A. Therapeutische Versuche bei Syphilis. Wien Med Wochenschr 45: 721-24 (1895).
74. Kaufman BM, Cross AS, Futrovsky SL, Sidberry HF, Sadoff JC. Monoclonal antibodies reactive with K1-encapsulated Escherichia coli lipopolysaccharide are opsonic and protected mice against lethal challenge. Infect Immun 52: 617-9 (1986).
75. Kayser FH: Morphologie und Feinstruktur der Bakterien. In: Kayser FH, Bienz KA, Eckert J, Zinkernagel RM (Hrsg.) Medizinische Mikrobiologie, 10. Aufl, Georg Thieme, Stuttgart, New York, S. 160- 61 (2001).
76. Kim KS, Cross AS, Zollinger W, Sadoff J. Prevention and therapy of experimental Escherichia coli infection with monoclonal antibodies. Infect Immun 50: 734-7 (1985).
77. Kim KS, Kang JH, Cross AS, Kaufmann B, Zollinger W, Sadoff J. Functional activities of monoclonal antibodies to the O side chain of Escherichia coli lipopolysaccharides in vitro and in vivo. J Infect Dis 157: 47-53 (1988).
78. Kim KS, Cross AS, Kaufmann B, Zollinger W, Sadoff J. Murine hybridoma antibodies enhance bactericidal activity of human cord against K1 Escherichia coli strains. Pediatr Res 28: 667-79 (1990).
79. Kirikae T, Nakano M, Morrison DC. Antibiotic-induced endotoxin release from bacteria and its clinical significance - Review. Microbiol Immunol 41: 285-94 (1997).
80. Knox WJ, Volk T, Knox SN, Volk HD. Immunomodulatory therapies in sepsis. Intensive Care Med 26: 124-28 (2000).

81. Leeson MC, Morrison DC. Induction of proinflammatory responses in human monocytes by particulate and soluble forms of lipopolysaccharide. *Shock* 2: 234-45 (1994).
82. Levin J, Bang FB. The role of endotoxin in the extra-cellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull Johns Hopkins Hospital* 115: 265 (1964).
83. Levison ME, Bush LM: Peritonitis and other intra-abdominal infections. In: Mandell D, Bennett JE, Dolin R (Hrsg.) *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5. Aufl, Churchill Livingstone, Philadelphia, S. 821-56 (2000).
84. Malangoni MA, Song J, Herrington J. Randomized controlled trial of moxifloxacin compared with piperacillin-tazobactam and amoxicillin-clavulanate for the treatment of complicated intra-abdominal infections. *Ann Surg* 44: 204-11 (2006).
85. Marshall JC. Clinical trial of mediator-directed therapy in sepsis: What have we learned. *Intensive Care Med* 26: 75-83 (2000).
86. Marshall JC. Inflammation, coagulopathy and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. *Crit Care Med* 29: 99-106 (2001).
87. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348: 1546-54 (2003).
88. Martin SJ, Zeigler DG. The use of fluoroquinolones in the treatment of skin infections. *Expert Opin Pharmacother* 5: 237-46 (2004).
89. Mattern T, Thanhauser A, Reiling N, Toellner KM. Endotoxin and lipid A stimulate proliferation of human T cells in the presence of autologous monocytes. *J Immunol* 153: 2996-3004 (1994).

90. Mattsson E, Verhage L, Rolof J, Fleer A. Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus epidermidis* stimulate human monocytes to release tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6. *FEMS Immunol Med Microbiol* 7: 281-7 (1993).
91. Mazuski JE, Sawyer RG, Nathens AB. The surgical Infection Society guidelines on antimicrobial therapy for intra-abdominal infections: evidence for the recommendations. *Surg Infect* 3: 175-233 (2002).
92. Mc Connell JS, Cohen J. Release of endotoxin from *Escherichia coli* by quinolones. *J Antimicrob Chemother* 18: 765-6 (1986).
93. Mock CN, Jurkovich GJ, Dries DJ, Maier RV. Clinical significance of antibiotic endotoxin-releasing properties in trauma patients. *Arch Surg* 130: 1234-41 (1995).
94. Naber KG, Adam D, unter Mitwirkung einer Expertengruppe der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.. Einteilung der Fluorchinolone. *Chemotherapie Journal* 7: 66-8 (1998).
95. Nathens AB, Rotstein OD. Antimicrobial therapy for intra-abdominal infection. *Am J Surg* 172: 1-6 (1996).
96. Neu HC. Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics of antibacterial activity. *Am J Med* 79: 2-13 (1985).
97. Nichols RL. Optimal treatment of complicated skin and skin structure infections. *J Antimicrob Chemother* 44: 19-23 (1999).
98. Opal SM, Yu RL. Antiendotoxin strategies for the prevention and treatment of septic shock. *Drugs* 55: 497-508 (1998).

99. Opal SM, Cohen J. Clinical Gram-positiv sepsis: Does it fundamentally differ from Gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* 27: 1608-18 (1999).
100. Periti P, Mazzei T. Antibiotic-induced release of bacterial cell wall components in the pathogenesis of sepsis and septic shock: a review. *J Chemother* 10: 427-48 (1998).
101. Petersen U, Bremm K-D, Dahlhoff A. The synthesis and in-vitro and in-vivo antibacterial activity of moxifloxacin (Bay 12-8039), a new 8-methoxy quinolone. *Moxifloxacin in Practise* 1: 13-26 (1999).
102. Prins JM, van Deventer SJ, Kuijper EJ, Speelman P. Clinical relevance of antibiotic-induced endotoxin release. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1211-8 (1994).
103. Prins JM, Kuijper EJ, Mevissen MLCM, Speelman P, van Deventer SJH. Release of tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 during antibiotic killing of *Escherichia coli* in whole blood: influence of antibiotic concentration and presence of septic serum. *Infect Immun* 63: 2236-42 (1995).
104. Prins JM, van Agtmael MA, Kuijper EJ, van Deventer SJ, Speelmann P. Antibiotic-induced endotoxin release in patients with gram-negative urosepsis: a double-blind study comparing imipenem and ceftazidime. *J Infect Dis* 172: 886-91 (1995).
105. Pucci MJ, Boice-Sowek J, Kessler RE, Dougherty TJ. Comparison of cefepime, cefpirome, and cefaclidine binding affinities for penicillin-binding proteins in *Escherichia coli* K-12 and *Pseudomonas aeruginosa* SC8329. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2312-7 (1991).
106. Ridemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 9: 517-24 (2003).

107. Rietschel ET, Brade H. Lipopolysaccharides, endotoxins and O-antigens of gram-negative bacteria: chemical structure, biologic effect and serologic properties. *Infection* 15: 133-41 (1987).
108. Sachs L. *Angewandte Statistik*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 315-19 (1978).
109. Sahlit I, Kletter Y, Halperin D. Immunologic effect of moxifloxacin in comparison to ciprofloxacin and G-CSF in a murine model of cyclophosphamide induced leukopenia. *Eur J Haematol* 66: 287-96 (2000).
110. Salton, MRJ: The bacterial cell wall structure and function. In: Hakenbeck R, Holtje JV, Labischinski H (Hrsg.) *The Target of Penicillin*. Walter de Gruyter, New York, S. 3-8 (1983).
111. Satta G, Cornaglia G, Mazzariol A, Golini G, Valisena S, Fontana R. Target for bacteriostatic and bactericidal activities of beta-lactam antibiotics against *Escherichia coli* resides in different penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 812-8 (1995).
112. Sharma VK, Howden CW. Prophylactic antibiotic administration reduces sepsis and mortality in acute necrotizing pancreatitis: a meta-analysis. *Pancreas* 22: 28-31 (2001).
113. Shenep JL, Barton RP, Mogan KA. Role of antibiotic class in the rate of liberation of endotoxin during therapy for experimental gram-negative bacterial sepsis. *J Infect Dis* 151: 1012-8 (1985).
114. Shenep JL. Antibiotic-induced bacteriolysis: a therapeutic dilemma. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 5: 1-12 (1986).
115. Shenep JL, Flynn PM, Barrett FF, Stidham GL. Serial quantitation of endotoxemia and bacteremia during therapy for gram-negative bacterial sepsis. *J Infect Dis* 157: 565-8 (1988).

116. Shockmann GD, Wicken AJ: Chemistry and Biology of Lipopolysaccharides. In: Shockmann GD, Wicken AJ (Hrsg.) Chemistry and biological activities of bacterial surface amphiphiles, Academic Press, New York, S.112-114 (1981).
117. Solomkin JS, Mazuski JE, Baron EJ. Guidelines for the selection of anti-infective agents for complicated intra-abdominal infections. Clin Infect Dis 37: 997-1005 (2003).
118. Spicak J, Martinek J, Zavada F. Penetration of antibiotics into the pancreas in rats: an effect of acute necrotizing pancreatitis. Scand J Gastroenterol 34: 92-7 (1999).
119. Spratt BG, Cromie KD. Penicillin-binding proteins of gram-negative bacteria. Rev Infect Dis 10: 699-711 (1988).
120. Strass H, Kubitza D. Interaction profile of moxifloxacin. Drugs 58: 235-36 (1999).
121. Tepick R, Rubin R. Therapy of sepsis: Why have we made such little progress? Crit Care Med 27: 1682-3 (1999).
122. Timmermann CP, Mattsson E, Martinez L, De Graaf L. Induction of release of tumor necrosis factor from human monocytes by staphylococci and staphylococcal peptidoglycans. Infect Immun 61: 4167-72 (1993):
123. Trautmann M, Heinemann M, Zick R, Möricke A, Seidelmann M, Berger D. Antibacterial activity of meropenem against *Pseudomonas aeruginosa*, including antibiotic-induced morphological changes and endotoxin-liberating effects. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 17: 754-60 (1998).
124. Trautmann M, Zick R, Rukavina T, Cross AS, Marre R. Antibiotic-induced release of endotoxin: in-vitro comparison of meropenem and other antibiotics. J Antimicrob Chemother 41: 163-9 (1998).

125. Trautmann M, Heinemann M, Mörnicke A, Seidelmann M, Lorenz I, Berger D, Steinbach G, Schneider M. Endotoxin release due to ciprofloxacin measured by three different methods. *J Chemother* 11: 248-54 (1999).
126. Uhl W, Warshaw A, Imrie C. IAP guidelines for the surgical management of acute pancreatitis. *Pancreatology* 2: 565-73 (2002).
127. Van den Berg C, de Neeling AJ, Schot CS, Hustinx WN. Delayed antibiotic-induced lysis of *Escherichia coli* in vitro is correlated with enhancement of LPS release. *Scand J Infect Dis* 24: 619-27 (1992):
128. Van Langevelde P, Kwappenberg KM, Groeneveld PH, Mattie H, van Dissel JT. Antibiotic-induced lipopolysaccharide (LPS) release from *Salmonella typhi*: delay between killing by ceftazidime and imipenem and release of LPS. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 163-9 (1998).
129. Verhoef J, Hustinx WMN, Frasa H, Hopelmann AIM. Issues in the adjunct therapy of sepsis. *J Antimicrob Chemother* 38: 167-82 (1996).
130. Vincent JL. Critical trials in sepsis, Where do we stand? *J Crit Care* 12: 3-6 (1997).
131. Vincent JL, Abraham E, Annane D. Reducing mortality in sepsis; new directions. *J Crit Care* 6: 1-18 (2002).
132. Vogel F, Bodemann KF. Expertenkommission der Paul-Ehrlich-Gesellschaft. Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen. *Chemotherapie Journal* 13: 46-105 (2004).
133. Waage A, Brandtzaeg P, Espevik T, Halstensen A. Current understanding of the pathogenesis of gram-negative shock. *Infect Dis Clinics of North America* 5: 781-91 (1991).

134. Warren BL, Eid A, Singer P. Caring for the critically ill patient. High-dose anti-thrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association* 286: 1869-78 (2001).
135. Weber S, Shalit I, Fabian I. Moxifloxacin inhibits cytokine-induced MAP kinase and NF-kappaB activation as well as nitric oxide synthesis in human respiratory epithelial cell line. *J Antimicrob Chemother* 55: 293-300 (2005).
136. Weidemann B, Schetter J, Dziarski R, Kusumoto S, Stelter F, Rietschel ET, Flad HD, Ulmer AJ. Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD 14 on human monocytes. *Infect Immun* 65: 858-64 (1997).
137. Williams AC, Galley HF, Webster NR. The effect of moxifloxacin on release of interleukin-8 from human neutrophils. *Br J Anaesth* 87: 671-2 (2001).
138. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD 14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249: 1431-3 (1990).
139. Yao YM, Redl H, Schlag G. The inflammatory basis of trauma/ shock-associated multiple organ failure. *Inflamm Res* 47: 201-10 (1998).
140. Young LS: Sepsis Syndrome. In: Mandall GL, Bennett JE, Dolin R (Hrsg.) *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, New York, S. 690-705 (1995).
141. Zabel P, Schade FU. Therapeutic strategies against mediators of septic shock. *Immunität und Infektion* 21: 45-50 (1993).
142. Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Fütterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmüller G. Establishment of human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of nature monocytes. *Int J Cancer* 41: 456-61 (1988).

- 
143. Zöfel P: Korrelation und Regression. In: Zöfel P (Hrsg.) Statistik für Psychologen, Pearson, München, S. 150-155 (2003).

## 7. Anhang

### 7.1 Anhang - Material

#### 7.1.1 Antibiotika

Ceftazidim	CH8HO1 H <sub>2</sub> O-löslich
Cefoxitin	MSD Zul.-Nr. 305.02.00 HN 19890
Imipenem	MSD No. 3540, lot. 3558J Puder unter 30°C lagern, Präparation bei -70°C und darunter lagern
Moxifloxacin	Bay. 12-8039 Nr. 502610 in 1N NaOH lösen, mit H <sub>2</sub> O verdünnen

#### 7.1.2 Bakterien

E. coli Bortolussi (Serotyp O18:K1:H7)  
B. fragilis DSM 1396 ATCC 23745/ NCTC 1058

#### 7.1.3 Bakterienanzucht

##### a) anaerobe Zusätze

Anaerobiertopf

Anaerokult

##### b) Nährlösungen

Müller-Hinton-Bouillon

- 21g
- A. dest. ad 1000ml  
autoklavieren
- 2,5 ml CaCl<sub>2</sub>      CaCl<sub>2</sub> X 2H<sub>2</sub>O    3,68g/100ml

- 1,25 ml  $\text{MgCl}_2$        $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  8,36g/100ml  
extra autoklaviert hinzufügen
- PH 7,4 kontrollieren

#### Thioglykolat-Bouillon

- 28g
- 0,1mg Hämin
- A. dest ad 1000ml  
autoklavieren
- 5 mg Vit. K1

#### c) Nährmedien - Agarplatten

Müller-Hinton-Blut-Platten

Müller-Hinton-Platten

Schädler-Platten

#### 7.1.4 Versuch: MHK-Bestimmung

#### Müller-Hinton-Bouillon

- 21g
- A. dest. ad 1000ml  
autoklavieren
- 2,5 ml  $\text{CaCl}_2$        $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  3,68g/100ml
- 1,25 ml  $\text{MgCl}_2$        $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  8,36g/100ml  
extra autoklaviert hinzufügen
- PH 7,4 kontrollieren

#### Thioglykolat-Bouillon

- 28g
- 0,1mg Hämin
- A. dest ad 1000ml  
autoklavieren
- 5 mg Vit. K1

Müller-Hinton-Platten

Schädler-Platten

Mc Farland-Standards

( bioMérieux, Nürtingen)

### 7.1.5 Versuch: Wachstumsversuch

Müller-Hinton-Bouillon

- 21g
  - A. dest. ad 1000ml
- autoklavieren
- 2,5 ml  $\text{CaCl}_2$        $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$     3,68g/100ml
  - 1,25 ml  $\text{MgCl}_2$        $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$     8,36g/100ml
- extra autoklaviert hinzufügen
- PH 7,4 kontrollieren

Thioglykolat-Bouillon

- 28g
  - 0,1mg Hämin
  - A. dest ad 1000ml
- autoklavieren
- 5 mg Vit. K1

Müller-Hinton-Platten

Schädler-Platten

### 7.1.6 Versuch: ELISA

Antikörper für ELISA

- mAb 19
- mAb 141 Maus IgM

7-Komponente-Phosphatpuffer (PBS)

- 8,0 g (137,0 g mmol)      NaCl      (Merck, Darmstadt)

- 0,2 g (2,7 mmol) KCl (Merck, Darmstadt)
- 1,15 g (8,1 mmol)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Fluka, Neu-Ulm)
- 0,2 g (1,5 mmol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Darmstadt)
- 0,1 g (0,9 mmol)  $\text{CaCl}_2$  (Fluka, Neu-Ulm)
- 0,1 g (0,5 mmol)  $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$  (Fluka, Neu-Ulm)
- 0,5 g (7,7 mmol)  $\text{NaN}_3$  (Fluka, Neu-Ulm)
- 1l Aqua VE Filtr.; Dosis  $\frac{1}{4}$

einstellen auf PH 7,4

#### Füllpuffer (Füller)

- 15 g BSA / 1l PBS (Serva, Heidelberg, lot 05952)
- 15 g Casein / 1l PBS (Merck, Darmstadt),  
mit 0,1 N NaOH unter leichtem Erwärmen lösen
- mit 0,2 N HCl (Merck, Darmstadt)  
auf pH 7,4 einstellen
- 1,5 g  $\text{NaN}_3$  (Fluka, Neu-Ulm)
- 100 mg Phenolrot als pH-Indikator (Fluka, Neu-Ulm)
- mit PBS auf 3l auffüllen

#### Wasch-PBS

- 256 mg  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Darmstadt)
- 1,19 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Fluka, Neu-Ulm)
- 8,77 g NaCl (Merck, Darmstadt)
- auffüllen mit Aqua bidest. auf 10L
- auf PH 7,5 einstellen, mit 10N NaOH

#### ELISA – Entwickler (Diethanolaminpuffer)

- 97 ml Diethanolamin (Sigma, Steinheim)
- 800 ml Aqua bidest.
- 200 mg  $\text{NaN}_3$  (Fluka, Neu-Ulm)
- 100 mg  $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$  (Fluka, Neu-Ulm)
- mit 1N (evetl. 10 N) HCL (Baker, Deventer, Holland)  
auf pH 9,8 einstellen

Vor UV –Strahlen geschützt bei 4°C lagern

$\alpha$ -mouse IgM/ alkalische Phosphatase

A9688,lot.70K9260

### 7.1.7 Versuch: chromogener LAL-Test

Control Standard Endotoxin (CSE)

- E. coli O55:B5 lyophilisiert (Bio Whittaker, Walkersville, Maryland, - lot. Nr.: ET 11372)

LIMULUS-Amöbozyten-Lysat:

- Empfindlichkeit: 0,03 EU/ml (Charles River Deutschland, Peter Schulz, Sulzfeld)
- mit 5,2ml Aqua oder Reagent water lösen

LAL-Puffer

- 98,5 ml Aqua dest.
- 1,7 ml Tris - 36,34% Elektolyt-Konzentration (Braun, Melsungen)
- mit 0,07 ml rauchender Salzsäure (Merck, Darmstadt) auf PH 9 auf pH=9,0 einstellen

LAL-Substrat

- CH<sub>36</sub>O<sub>2</sub>-D-CHA-Gly-Arg-pNA-AcOH (Pentapharm, Basel, Schweiz)
- in 6,6ml Aqua oder Reagent water lösen - BSN: 749-05/ 1-00
- 1:1 (50/50%) mit Puffer aufbereiten Art. Nr. 30 LPS  
P. Schulz (Labor tech.)

LAL reagent

- lot. Nr.: R 3531 CT

### 7.1.8 Versuch: Zellkultur und Zytokinbestimmung

Albumin-Lösung 5%

- Pyrogenfreies humanes Serumalbumin (DRK, Baden-Württemberg, lot 9210395303)

## 7-Komponente-Phosphatpuffer (PBS)

- 8,0 g (137,0 g mmol) NaCl (Merck, Darmstadt)
- 0,2 g (2,7 mmol) KCl (Merck, Darmstadt)
- 1,15 g (8,1 mmol) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Fluka, Neu-Ulm)
- 0,2 g (1,5 mmol) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)
- 0,1 g (0,9 mmol) CaCl<sub>2</sub> (Fluka, Neu-Ulm)
- 0,1 g (0,5 mmol) MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (Fluka, Neu-Ulm)
- 0,5 g (7,7 mmol) NaN<sub>3</sub> (Fluka, Neu-Ulm)
- 1l Aqua VE Filtr.; Dosis ¼

einstellen auf PH 7,4

## MM6-Medium

- 500 ml RPMI 1640 ohne L-Glutamin (Gibco, Grand Island, New York, USA)
- 5 ml (1%) Insulin (Gibco, Grand Island, New York, USA)
- 5 ml (1%) L-Glutamin (Gibco, Grand Island, New York, USA)
- 5 ml (1%) Oxalacetat (Sigma, Steinheim)
- 5 ml (1%) Na-Pyruvat (Gibco, Grand Island, New York, USA)
- 5 ml (1%) nicht essentielle Aminosäuren (Biochrom, Berlin)
- 50 ml (10%) Fetales Kälberserum (PAA, Coelbe)

Die für den TNF $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Sandwich-ELISA verwendeten Reagenzien waren in dem kommerziell erhältlichen TNF $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -ELISA-Kit (Immunotech, Marseille, Frankreich) enthalten und wurden wie vom Hersteller empfohlen verarbeitet.

## 7.2 Statistik

### ELISA

#### Allgemeines Lineares Modell

##### Innersubjektfaktoren

Maß: MASS\_1

messzeit	Abhängige Variable
1	t0
2	t2
3	t4
4	t6
5	t8
6	t24

##### Zwischensubjektfaktoren

	N
Wirkst. 1	9
2	9
3	9
MHK 2	9
10	9
50	9

##### Deskriptive Statistiken

	Wirkst.	MHK	Mittelwert	Standardabweichung	N
t0	1	2	4,21033	3,452002	3
		10	10,26667	9,209415	3
		50	6,00000	2,946184	3
		Gesamt	6,82567	5,797692	9
	2	2	4,21033	3,452002	3
		10	10,26667	9,209415	3
		50	6,00000	2,946184	3
		Gesamt	6,82567	5,797692	9
	3	2	4,21033	3,452002	3
		10	10,26667	9,209415	3
		50	6,00000	2,946184	3
		Gesamt	6,82567	5,797692	9
Gesamt	2	4,21033	2,989522	9	
	10	10,26667	7,975588	9	
	50	6,00000	2,551470	9	
	Gesamt	6,82567	5,570242	27	
t2	1	2	32,833	21,7332	3
		10	17,700	7,5027	3
		50	12,067	8,0829	3

		Gesamt	20,867	15,3294	9
	2	2	37,400	43,4774	3
		10	28,667	18,5831	3
		50	86,667	60,2107	3
		Gesamt	50,911	46,8900	9
	3	2	30,517	30,8022	3
		10	30,167	1,5275	3
		50	45,333	20,5020	3
		Gesamt	35,339	19,9768	9
	Gesamt	2	33,583	28,9318	9
		10	25,511	11,6504	9
		50	48,022	45,5553	9
		Gesamt	35,706	32,0610	27
t4	1	2	109,667	44,0577	3
		10	28,733	19,6431	3
		50	14,600	8,7430	3
		Gesamt	51,000	50,7375	9
	2	2	165,333	45,0037	3
		10	318,000	223,2219	3
		50	245,333	238,5484	3
		Gesamt	242,889	177,6601	9
	3	2	105,500	60,1893	3
		10	62,500	24,2951	3
		50	51,833	29,5987	3
		Gesamt	73,278	43,3317	9
	Gesamt	2	126,833	52,2907	9
		10	136,411	177,3781	9
		50	103,922	161,1607	9
		Gesamt	122,389	136,7728	27
t6	1	2	115,67	28,746	3
		10	35,17	9,359	3
		50	15,70	5,203	3
		Gesamt	55,51	48,392	9
	2	2	300,00	160,935	3
		10	590,00	387,911	3
		50	393,33	313,462	3
		Gesamt	427,78	291,710	9
	3	2	141,67	88,551	3
		10	73,00	25,239	3
		50	59,00	25,120	3
		Gesamt	91,22	61,200	9
	Gesamt	2	185,78	126,915	9
		10	232,72	331,466	9
		50	156,01	238,247	9
		Gesamt	191,50	239,297	27
t8	1	2	124,67	24,007	3
		10	48,67	23,714	3
		50	16,60	5,769	3
		Gesamt	63,31	51,023	9
	2	2	278,33	127,508	3
		10	718,33	362,365	3
		50	370,00	264,244	3

		Gesamt	455,56	307,840	9
	3	2	149,33	65,432	3
		10	70,33	32,316	3
		50	56,67	26,690	3
		Gesamt	92,11	58,192	9
	Gesamt	2	184,11	101,916	9
		10	279,11	376,606	9
		50	147,76	213,839	9
		Gesamt	203,66	253,162	27
t24	1	2	291,33	131,607	3
		10	59,83	17,849	3
		50	23,67	9,815	3
		Gesamt	124,94	142,310	9
	2	2	505,00	147,309	3
		10	906,67	406,335	3
		50	546,67	260,064	3
		Gesamt	652,78	316,535	9
	3	2	273,33	153,239	3
		10	94,00	39,000	3
		50	72,00	34,044	3
		Gesamt	146,44	125,252	9
	Gesamt	2	356,56	167,575	9
		10	353,50	462,685	9
		50	214,11	282,611	9
		Gesamt	308,06	321,977	27

## Post-Hoc-Tests

### Mehrfachvergleiche

Maß: MASS\_1  
Tukey-HSD

(I) Wirkst.	(J) Wirkst.	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
1	2	-252,37963(*)	47,702100	,000	-374,12317	-130,63609
	3	-20,46019	47,702100	,904	-142,20373	101,28336
2	1	252,37963(*)	47,702100	,000	130,63609	374,12317
	3	231,91944(*)	47,702100	,000	110,17590	353,66299
3	1	20,46019	47,702100	,904	-101,28336	142,20373
	2	-231,91944(*)	47,702100	,000	-353,66299	-110,17590

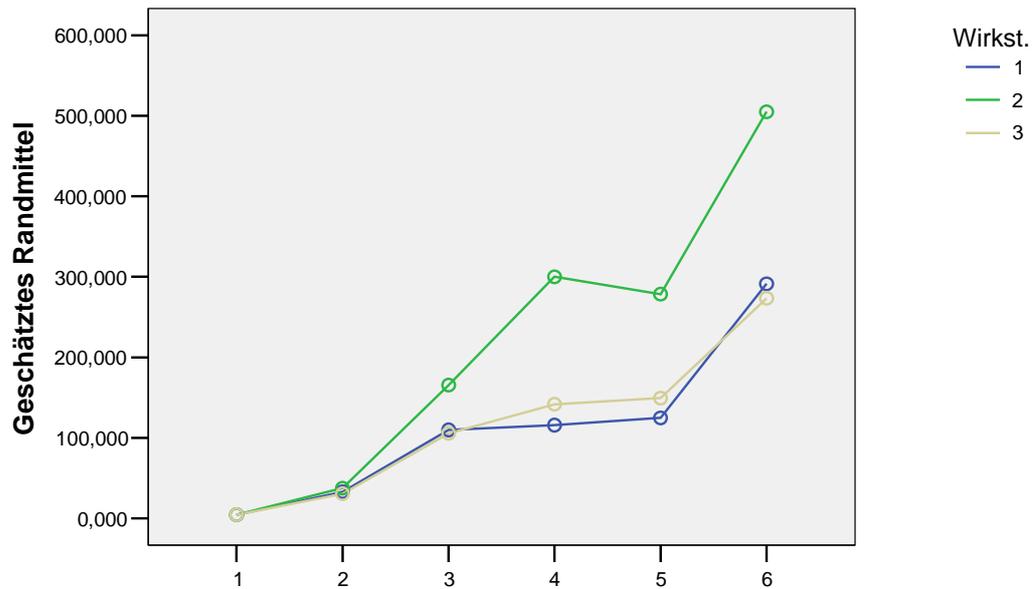
Basiert auf beobachteten Mittelwerten.

\* Die mittlere Differenz ist auf der Stufe ,05 signifikant.

## Profildiagramm

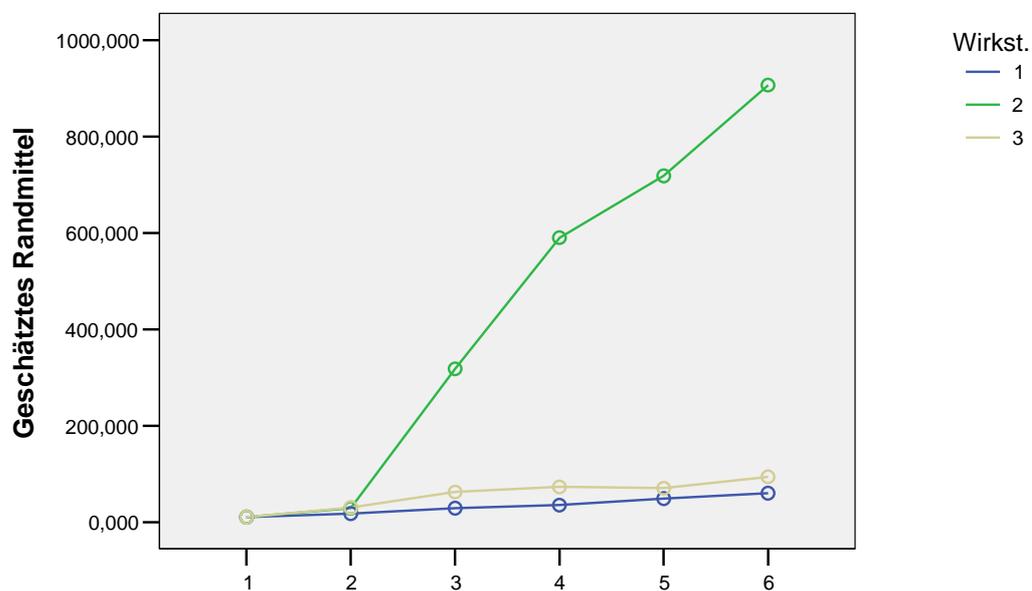
## Geschätztes Randmittel von MEASURE\_1

bei MHK = 2



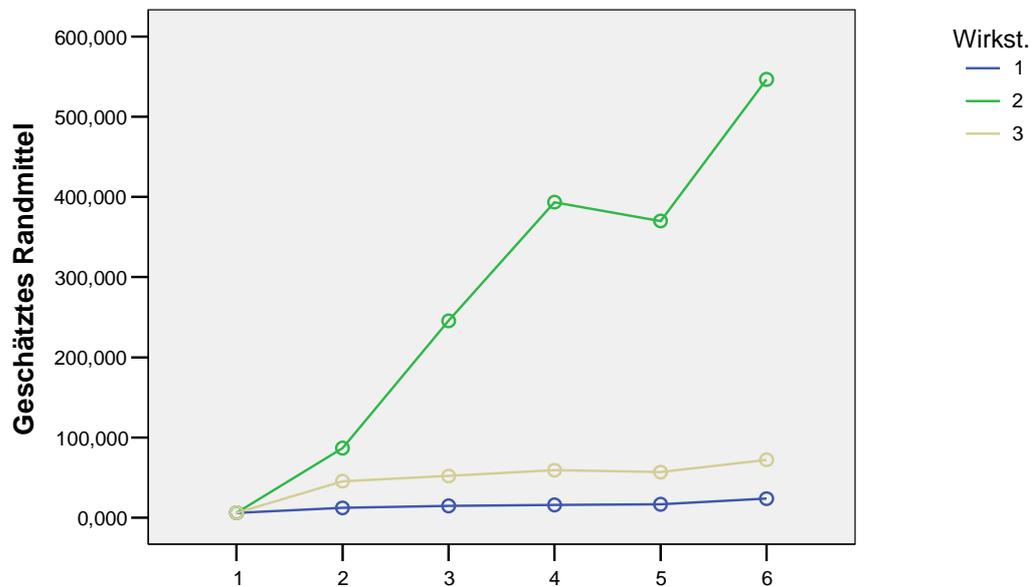
## Geschätztes Randmittel von MEASURE\_1

bei MHK = 10



## Geschätztes Randmittel von MEASURE\_1

bei MHK = 50

**chromogener LAL-Test**

Allgemeines Lineares Modell

**Innersubjektfaktoren**

Maß: MASS\_1

messzeit	Abhängige Variable
1	t0
2	t2
3	t4
4	t6
5	t8
6	t24

**Zwischensubjektfaktoren**

		N
Wirkst.	1	9
	2	9
	3	9
MHK	2	9
	10	9
	50	9

## Deskriptive Statistiken

	Wirkst.	MHK	Mittelwert	Standardabweichung	N
t0	1	2	2,74792	,195889	3
		10	2,96250	,555196	3
		50	2,80833	,171201	3
		Gesamt	2,83958	,321192	9
	2	2	2,74792	,195889	3
		10	2,96250	,555196	3
		50	2,80833	,171201	3
		Gesamt	2,83958	,321192	9
	3	2	2,74792	,195889	3
		10	2,96250	,555196	3
		50	2,80833	,171201	3
		Gesamt	2,83958	,321192	9
	Gesamt	2	2,74792	,169645	9
		10	2,96250	,480814	9
		50	2,80833	,148265	9
Gesamt		2,83958	,308591	27	
t2	1	2	53,4583	13,85321	3
		10	36,5417	13,03621	3
		50	9,9833	1,78682	3
		Gesamt	33,3278	21,24761	9
	2	2	27,9792	4,73779	3
		10	23,0625	11,11534	3
		50	35,1667	14,68754	3
		Gesamt	28,7361	10,87306	9
	3	2	31,7708	1,78353	3
		10	23,7083	10,22144	3
		50	23,5208	4,00455	3
		Gesamt	26,3333	6,89649	9
	Gesamt	2	37,7361	14,00442	9
		10	27,7708	11,95168	9
		50	22,8903	13,33696	9
Gesamt		29,4657	14,09488	27	
t4	1	2	62,5833	21,19748	3
		10	32,5417	2,09289	3
		50	18,5833	2,72885	3
		Gesamt	37,9028	22,23639	9
	2	2	273,9583	82,46764	3
		10	226,8750	82,61356	3
		50	170,2083	37,96757	3
		Gesamt	223,6806	76,09772	9
	3	2	58,7083	5,88607	3
		10	31,6250	9,09413	3
		50	26,3125	2,85249	3
		Gesamt	38,8819	16,05534	9
	Gesamt	2	131,7500	114,88948	9
		10	97,0139	105,89677	9
		50	71,7014	76,37910	9
Gesamt		100,1551	99,68014	27	

t6	1	2	67,67	23,625	3
		10	51,25	19,446	3
		50	19,69	2,139	3
		Gesamt	46,20	26,099	9
	2	2	279,17	40,381	3
		10	335,00	147,007	3
		50	188,96	75,108	3
		Gesamt	267,71	106,271	9
	3	2	120,83	11,983	3
		10	40,50	18,626	3
		50	39,38	4,986	3
		Gesamt	66,90	42,013	9
	Gesamt	2	155,89	98,294	9
		10	142,25	162,800	9
		50	82,67	88,570	9
Gesamt		126,94	120,794	27	
t8	1	2	71,75	27,394	3
		10	47,75	13,546	3
		50	20,83	3,719	3
		Gesamt	46,78	26,899	9
	2	2	445,83	150,921	3
		10	320,83	88,188	3
		50	278,33	121,014	3
		Gesamt	348,33	130,329	9
	3	2	117,08	38,575	3
		10	56,50	10,404	3
		50	36,17	7,577	3
		Gesamt	69,92	41,741	9
	Gesamt	2	211,56	193,682	9
		10	141,69	141,713	9
		50	111,78	139,022	9
Gesamt		155,01	159,636	27	
t24	1	2	326,2500	32,42780	3
		10	54,0833	15,21427	3
		50	19,4583	4,30540	3
		Gesamt	133,2639	146,62787	9
	2	2	427,5000	142,06073	3
		10	527,5000	194,56683	3
		50	356,6667	82,70177	3
		Gesamt	437,2222	147,45998	9
	3	2	165,4167	46,27252	3
		10	60,3333	16,52712	3
		50	34,5833	7,33179	3
		Gesamt	86,7778	64,96059	9
	Gesamt	2	306,3889	137,63835	9
		10	213,9722	254,73732	9
		50	136,9028	170,11013	9
Gesamt		219,0880	199,21010	27	

## Post-Hoc-Tests

## Mehrfachvergleiche

Maß: MASS\_1  
Tukey-HSD

(I) Wirkst.	(J) Wirkst.	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
1	2	-168,03449(*)	9,060261	,000	-191,15776	-144,91123
	3	1,44352	9,060261	,986	-21,67975	24,56678
2	1	168,03449(*)	9,060261	,000	144,91123	191,15776
	3	169,47801(*)	9,060261	,000	146,35474	192,60127
3	1	-1,44352	9,060261	,986	-24,56678	21,67975
	2	-169,47801(*)	9,060261	,000	-192,60127	-146,35474

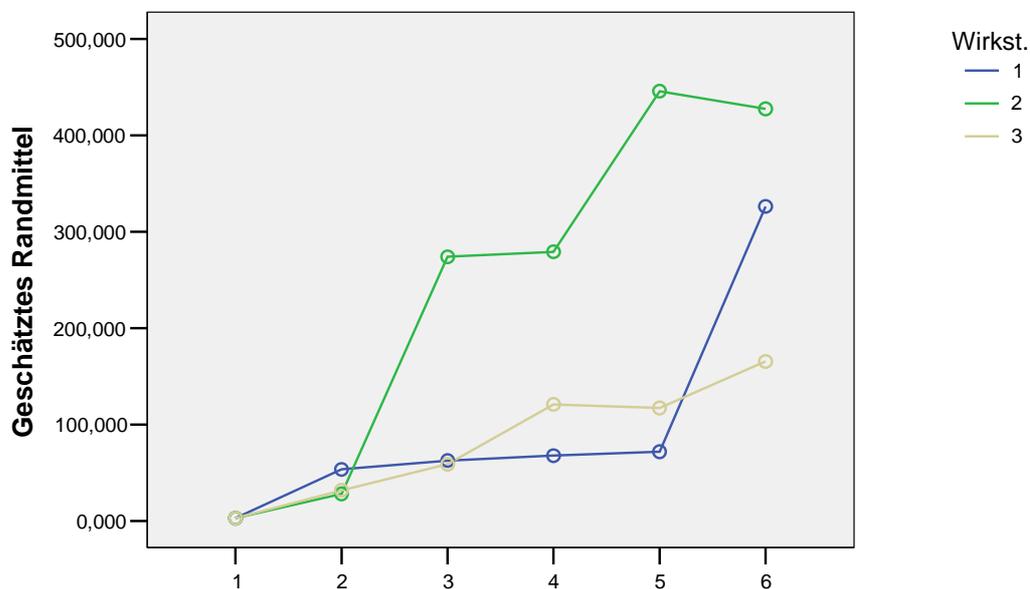
Basiert auf beobachteten Mittelwerten.

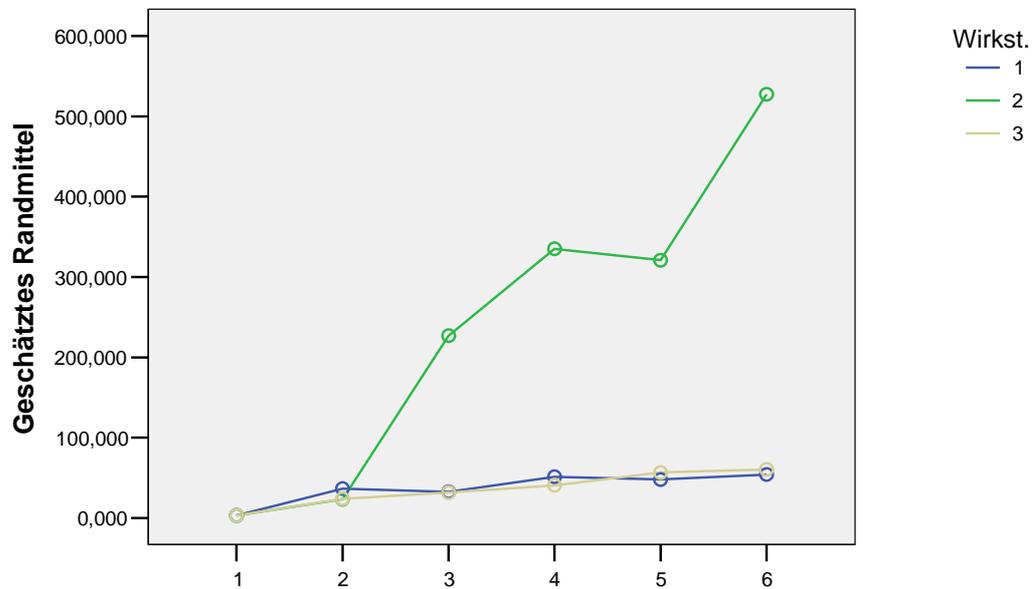
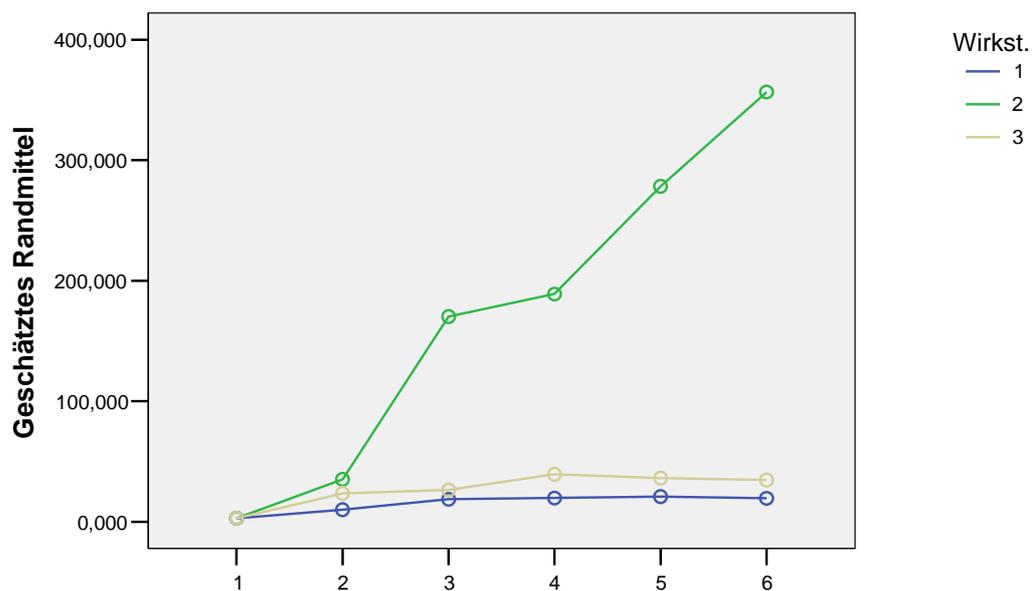
\* Die mittlere Differenz ist auf der Stufe ,05 signifikant.

## Profildiagramm

## Geschätztes Randmittel von MEASURE\_1

bei MHK = 2



**Geschätztes Randmittel von MEASURE\_1****bei MHK = 10****Geschätztes Randmittel von MEASURE\_1****bei MHK = 50**

**TNF $\alpha$** **Allgemeines Lineares Modell****Innersubjektfaktoren**

Maß: MASS\_1

messzeit	Abhängige Variable
1	t6
2	t8

**Zwischensubjektfaktoren**

		N
Wirkstoff	1	12
	2	12
	3	12
MHK	2	9
	10	18
	50	9

**Deskriptive Statistiken**

	Wirkstoff	MHK	Mittelwert	Standardabweichung	N
t6	1	2	308,000	115,8836	3
		10	39,450	5,2061	6
		50	37,333	2,5794	3
		Gesamt	106,058	131,4733	12
	2	2	325,667	66,3425	3
		10	222,000	133,4601	6
		50	155,700	150,0249	3
		Gesamt	231,342	130,4732	12
	3	2	89,833	15,7748	3
		10	45,100	5,6537	6
		50	50,767	9,3190	3
		Gesamt	57,700	21,3746	12
Gesamt	2	241,167	132,1384	9	
	10	102,183	113,4106	18	
	50	81,267	93,8110	9	
	Gesamt	131,700	128,1921	36	
t8	1	2	200,667	54,1972	3
		10	40,383	6,2974	6
		50	40,267	7,6788	3
		Gesamt	80,425	76,2908	12
	2	2	303,333	108,0386	3
		10	202,000	123,6236	6
		50	358,667	110,5094	3
		Gesamt	266,500	127,4573	12
	3	2	98,767	14,9286	3
		10	47,000	8,1386	6

	50	60,333	10,4333	3
	Gesamt	63,275	24,0998	12
Gesamt	2	200,922	107,4922	9
	10	96,461	102,1305	18
	50	153,089	164,1433	9
	Gesamt	136,733	125,8099	36

## Post-Hoc-Tests

### Mehrfachvergleiche

Maß: MASS\_1

Tukey-HSD

(I) Wirkst.	(J) Wirkst.	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
1	2	-155,679(*)	28,3989	,000	-226,092	-85,266
	3	32,754	28,3989	,491	-37,659	103,167
2	1	155,679(*)	28,3989	,000	85,266	226,092
	3	188,433(*)	28,3989	,000	118,020	258,846
3	1	-32,754	28,3989	,491	-103,167	37,659
	2	-188,433(*)	28,3989	,000	-258,846	-118,020

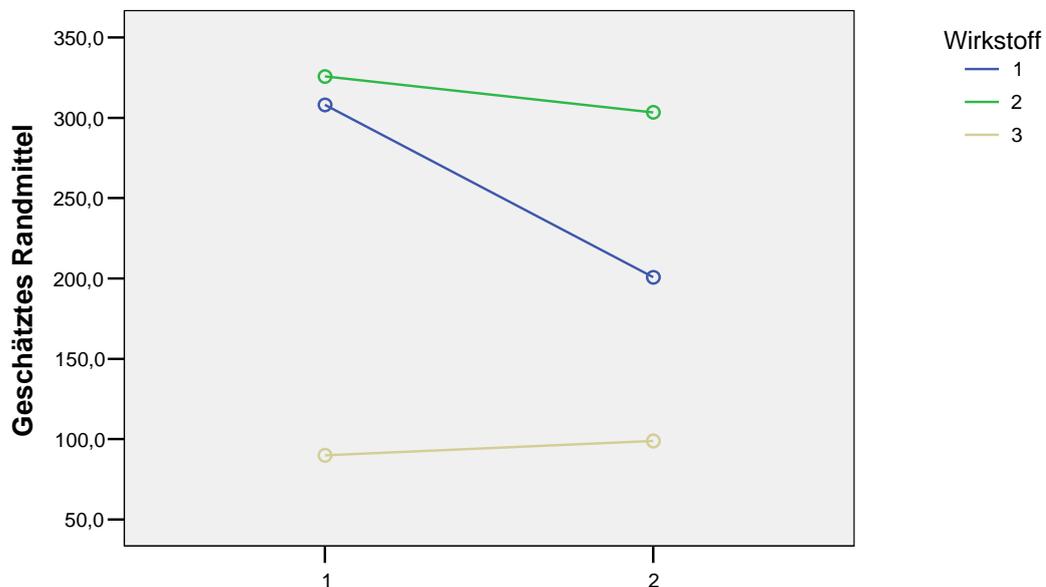
Basiert auf beobachteten Mittelwerten.

\* Die mittlere Differenz ist auf der Stufe ,05 signifikant.

## Profildigramm

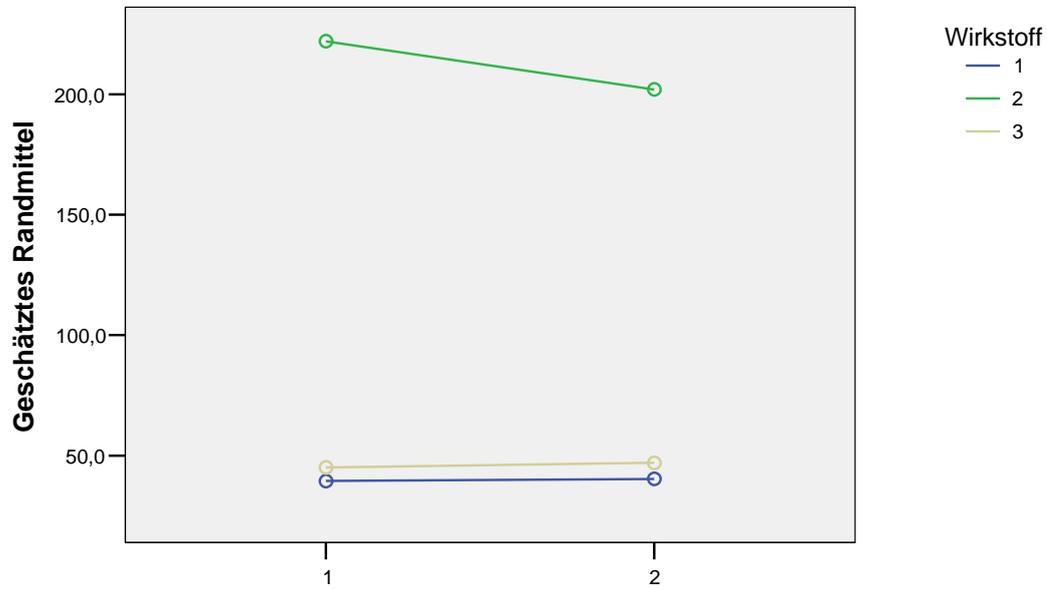
### Geschätztes Randmittel von MEASURE\_1

bei MHK = 2



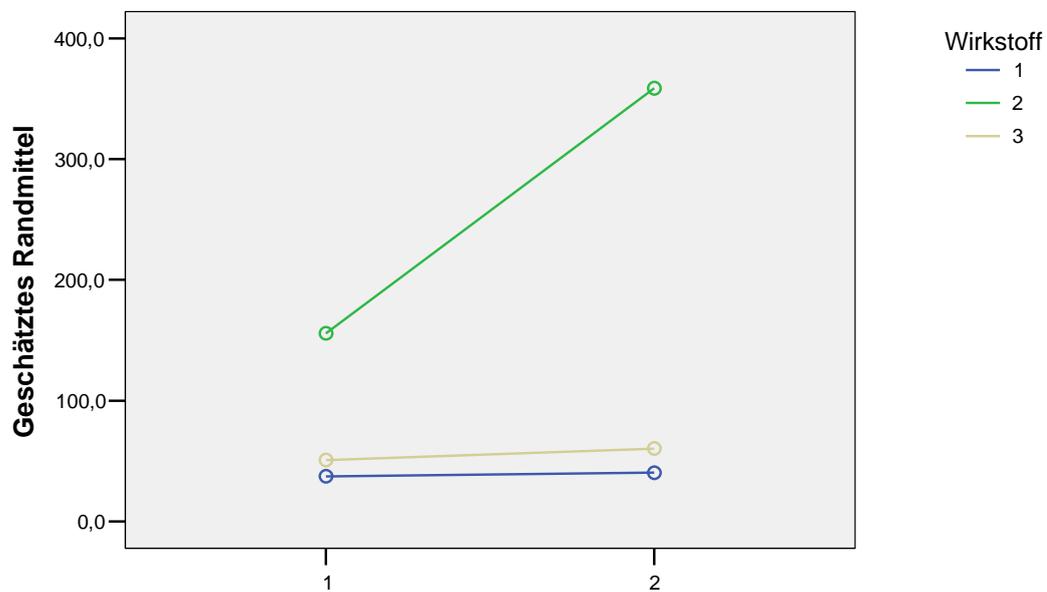
## Geschätztes Randmittel von MEASURE\_1

bei MHK = 10



## Geschätztes Randmittel von MEASURE\_1

bei MHK = 50



**IL-1 $\beta$** **Univariate Varianzanalyse****Zwischensubjektfaktoren**

		N
Wirkstoff	1	11
	2	11
	3	11
MHK	2	9
	10	15
	50	9

**Deskriptive Statistiken**

Abhängige Variable: t96

Wirkstoff	MHK	Mittelwert	Standardabweichung	N
1	2	25,167	3,9627	3
	10	11,500	2,6907	5
	50	9,967	2,8885	3
	Gesamt	14,809	7,2387	11
2	2	17,900	6,7668	3
	10	18,840	9,0218	5
	50	13,200	3,1607	3
	Gesamt	17,045	7,0696	11
3	2	10,733	3,7608	3
	10	11,120	2,0376	5
	50	9,033	2,4007	3
	Gesamt	10,445	2,5481	11
Gesamt	2	17,933	7,6138	9
	10	13,820	6,3274	15
	50	10,733	3,1000	9
	Gesamt	14,100	6,4628	33

**Post-Hoc-Tests****Mehrfachvergleiche**Abhängige Variable: t96  
Tukey-HSD

(I) Wirkst.	(J) Wirkst.	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95% Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
1	2	-2,236	2,3539	,614	-8,061	3,588
	3	4,364	2,3539	,171	-1,461	10,188
2	1	2,236	2,3539	,614	-3,588	8,061
	3	6,600(*)	2,3539	,024	,776	12,424
3	1	-4,364	2,3539	,171	-10,188	1,461
	2	-6,600(*)	2,3539	,024	-12,424	-,776

Basiert auf beobachteten Mittelwerten.

\* Die mittlere Differenz ist auf der Stufe 0,05 signifikant.

## 8. Danksagung

An dieser Stelle – last but not least – bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Trautmann, der mir das Thema der Dissertation überlassen hat sowie bei Durchführung und Fertigstellung der Arbeit wohlwollend zur Seite stand.

Allen Doktoranden und Mitarbeitern der Abteilung danke ich für das gute Arbeitsklima und die Unterstützung bei der Durchführung des experimentellen Teils.

Vor allem erwähnen möchte ich dabei Frau A. Mörcke, die mich in die Versuchstechniken eingearbeitet hat und mir bei zahlreichen Fragen immer gerne behilflich war.

## 9. Lebenslauf

**Cordula Scheibe**

**geboren am 11.07.1976**

**in Essen-Werden**

<b>Schule</b>	1983 – 1987	Grundschule an der Jakobsalle in Essen-Heidhausen
	1987 – 1996	Gymnasium Goetheschule in Essen-Bredeney
	Juni 1996	Abitur
<b>Studium</b>	Oktober 1996	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Ulm
	September 1998	Ärztliche Vorprüfung
	August 1999	1. Staatsexamen
	März 2002	2. Staatsexamen
	Juni 2003	3. Staatsexamen
<b>Praktika</b>	Juli/ August 1996	Krankenpflegepraktikum Chirurgie
	März 1999	Famulatur Chirurgie
	September 1999	Famulatur Gynäkologie
	März 2000	Famulatur Plastische- und Handchirurgie
	April 2000	Famulatur Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie
	April 2002 – März 2003	Praktisches Jahr an der Universität Ulm

---

<b>Beruf</b>	März 2004 - Oktober 2004	Ärztin im Praktikum, Klinikum Eilbek, Hamburg, Abteilung für Allgemein-, Viszeral und Gefäßchirurgie
	Oktober 2004 - Juni 2007	Ärztin, Klinikum Eilbek, Hamburg, Abteilung für Allgemein-, Viszeral und Gefäßchirurgie
	Juli 2007 - Juni 2008	Ärztin, Klinikum Eilbek, Hamburg, Abteilung für Unfallchirurgie
	seit Juli 2008	Ärztin, Klinikum Eilbek, Hamburg, Abteilung für Allgemein-, Viszeral und Gefäßchirurgie
	Juli 2009	Ablegen der Facharztprüfung für Allgemeinchirurgie nach der Weiterbildungsordnung vom 01.04.1996 i.d.F. v. 07.05.2001