

Aus der Klinischen Abteilung für Allgemeinchirurgie der Universitätsklinik für Chirurgie, Wien

Liposomen-mediierter Gentransfer – die zukünftige Therapieform bei Sepsis und intraabdomineller Infektion?

M. A. Rogy, B. G. Beinbauer und M. Fang

Schlüsselwörter: Septischer Schock – Gentransfer – Liposomen – pro-inflammatorische Antwort – antiinflammatorische Antwort.

Keywords: Septic shock – gene transfer – liposomes – pro-inflammatory response – anti-inflammatory response.

Zusammenfassung: Grundlagen: Das klinische Zustandsbild des septischen Schocks wird ursächlich durch eine übersteigerte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-1 β) von Entzündungszellen des Körpers hervorgerufen. Der Einsatz von monoklonalen Antikörpern (anti-TNF- α), Rezeptor-Antagonisten (IL-1 α) und anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10) in einer Reihe klinischer Studien führte großteils nicht zur erwarteten Steigerung der Überlebensrate bei septischen Patienten. Dies ist einerseits auf die geringe Halbwertszeit dieser Antagonisten bzw. Inhibitoren zurückzuführen, andererseits kann eine übersteigerte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine zwar zu Pathologien in einem Kompartiment des Körpers beitragen, während dieselben Mediatoren jedoch auch kurative Eigenschaften in anderen Kompartimenten besitzen können. Die systemische Verabreichung, die in ausreichend hoher Konzentration erfolgen muß, kann somit auch die positiven Effekte einer pro-inflammatorischen Immunantwort unterdrücken.

Methodik: Die eigenen tierexperimentellen Ergebnisse zum Liposomen-medierten Gentransfer werden vorgestellt.

Ergebnisse: Die Möglichkeit, Inhibitoren oder Antagonisten pro-inflammatorischer Zytokine in hoher Dosis ausschließlich lokal an den Ort einer Entzündung zu transportieren, läßt den Liposomen-medierten Gentransfer als eine vielversprechende und risikoarme Alternative zur konservativen systemischen anti-inflammatorischen Therapie der Sepsis erscheinen.

Schlußfolgerungen: Der pathophysiologische Mechanismus der Sepsis und des septischen Schocks ist in der Zwischenzeit gut erforscht und akzeptiert. Das Konzept der Intervention in diesem pathophysiologischen Ablauf im Sinne einer Mediatorblockade kann in Zukunft nur auf lokaler Gewebs- und Kompartimentebene im Bereich der überschießenden delitären Mediatorproduktion erfolgreich sein.

(Acta Chir. Austriaca 2000; 32: 179–184)

Liposome Mediated Gene Transfer – the Future Therapy for Sepsis and Intraabdominal Infection?

Summary: Background: It is now generally accepted that overproduction of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β) produced by inflammatory cells contributes to the pathological consequences of septic shock. Neutralizing this exaggerated immune response by monoclonal antibodies (anti-TNF- α), receptor antagonists (IL-1 α) and anti-inflammatory cytokines (IL-10) did not result in a better outcome in septic patients. Firstly, this is due to the short biological half-lives of these natural antagonists or inhibitors of pro-inflammatory cytokines. Secondly,

exaggerated pro-inflammatory cytokine production may contribute to pathology in one body compartment while, simultaneously, the same mediators may have beneficial effects in another compartment. Thus, systemic administration of cytokine inhibitors at levels sufficient to neutralize exaggerated cytokine production in one organ may also block the presumably beneficial aspects of cytokine production in another.

Methods: Our own results of animal experiments of the liposome mediated gene transfer are presented.

Results: Liposome mediated gene transfer seems to be a promising low-risk alternative to systemic anti-inflammatory therapies as it ensures the local delivery of high doses of cytokine inhibitors and antagonists over a prolonged period of time.

Conclusions: The pathophysiological mechanism of sepsis and septic shock are well established. The concept of local intervention or compartmental blockade of overwhelming mediator production by gene transfer will be a new challenge in the future.

Einleitung

Während der letzten zehn Jahre fanden viele Anti-Zytokin-Therapien zur Behandlung des septischen Schocks, ARDS (adult respiratory distress syndrome) sowie SIRS (systemic inflammatory response syndrome), Einzug in den klinischen Alltag. Die pathologischen Konsequenzen des septischen Schocks sind maßgeblich auf die vermehrte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine von Entzündungszellen des Körper zurückzuführen (9, 28). Blockiert man jedoch die gesteigerte Produktion und Wirkung von endogenem Tumor-Necrosis-Faktor α (TNF- α) mittels anti-TNF- α -Antikörper (34, 59), löslichen TNF- α -Rezeptor-Immunadhasinen (40, 62) oder indirekt durch prophylaktische Verabreichung des potenten anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-10 (IL-10) (30, 35), so steigt die Überlebensrate bei ursprünglich letaler Endotoxinämie rapid an. Zur Zeit werden sowohl monoklonale anti-TNF- α -Antikörper wie auch TNF- α -Rezeptor-Immunadhasine bei Patienten mit Sepsis-Syndrom im Rahmen klinischer Studien erprobt (22). Versuche, eine erhöhte Interleukin-1 (IL-1)-Produktion primär unter Verwendung von IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1 α) einzudämmen, führten in präklinischen (23, 45) und klinischen (24) Untersuchungen zu unterschiedlichsten Ergebnissen.

Viele innovative Therapieansätze erscheinen zwar inhaltlich vernünftig und erfolgsversprechend, erwiesen sich jedoch in der Praxis als ineffizient. Die natürlichen Antagonisten oder Inhibitoren pro-inflammatorischer Zytokine zeichnen sich durch eine kurze biologische Halbwertszeit aus, die innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden liegt (23, 25, 62). Darüber hinaus ist die Konzentration an pro-inflammatorischen Zytokinen in entzündlichem Gewebe oftmals bedeutend höher als im Plasma (31, 58). Die systemische Verabreichung von Zytokin-Inhibitoren erfordert somit große Dosen derselben, um alle Gewebe-Pools zu erreichen und abzusättigen. Manche Inhibitoren werden zusätzlich fast ausschließlich im Plasma-Kompartiment angereichert (3) und erreichen somit kaum interstitielle Bereiche. Eine erhöhte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine mag zwar pathologische Folgen in einem Kompartiment des Körpers hervorrufen, kann jedoch gleichzeitig positive Wirkung in einem anderen Kompartiment zeigen. Die systemische Gabe von Zytokin-Inhibitoren in ausreichender Konzentration für eine Neutralisation der vermehrten Zytokinproduktion in einem bestimmten Organ kann somit die notwendigen und förderlichen Aspekte dieser Zytokinproduktion in anderen Organen hemmen.

Korrespondenzanschrift: Prof. Dr. M. A. Rogy, Klinische Abteilung für Allgemeinchirurgie, Universitätsklinik für Chirurgie, Währinger Gürtel 18-20, A-1090 Wien.

Fax: ++43/1/40400-5447

E-mail: michael.rogy@akh-wien.ac.at

Es galt nun, alternative Ansätze für Anti-Zytokin-Therapien im Rahmen einer akuten Entzündung zu entwickeln. Die Methode des Gentransfers oder die Verwendung katalytischer Ribozyme, die gegen die mRNA pro-inflammatorischer Zytokine gerichtet sind, wurden als neue Therapiewege entdeckt. Obwohl der Einsatz des somatischen Gentransfers bei erblichen sowie chronischen Erkrankungen stark forciert wird (2, 43, 44), findet er als akute therapeutische Maßnahme bei Sepsis, MSOF (multi-system organ failure) sowie diversen Entzündungen kaum Anklang (49). Doch gerade die Möglichkeit, Zytokin-Inhibitoren oder Antagonisten direkt und ausschließlich lokal an den Ort einer Entzündung zu transportieren, läßt den transienten Gentransfer als eine vielversprechenden Alternative zur systemischen anti-inflammatorischen Therapie erscheinen.

Rolle der pro-inflammatorischen Zytokine für die Pathogenese der Sepsis und MSOF

Die Mortalitätsrate des septischen Schocks liegt zwischen 25 und 50 %. Trotz deutlicher Verbesserungen der antimikrobiellen Therapien sowie massiver pulmonaler und vaskulärer Unterstützung konnte die Häufigkeit des septischen Schocks sowie die damit verbundene hohe Letalität kaum herabgesetzt werden. Vielmehr führt die Zunahme an immunsupprimierenden Erkrankungen wie AIDS und der permanente Anstieg der durchschnittlichen Lebenserwartung der Bevölkerung zu einer wachsenden Prädisposition für Sepsis und septischen Schock.

Beutler et al. konnten bereits 1986/87 zeigen, daß eine vermehrte Produktion des potenten pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α den Beginn einer Sepsis begleitet (5, 11, 60, 61). Anfängliche Studien ergaben, daß die im Rahmen einer letalen Endotoxemia oder gramnegativen Bakteriämie auftretenden Immunantworten durch Verabreichung von rekombinatem TNF- α an gesunden Tieren nachgestellt werden können. Wie die Autoren in nachfolgenden Untersuchungen an Mäusen und Pavianen zeigten, kann die überschießende Produktion von endogenem TNF- α mittels mono- und polyklonaler anti-TNF- α -Antikörper inhibiert werden. Die vollständige Blockade von endogenem TNF- α führt jedoch zu einer erhöhten Mortalität im Rahmen dieser Erkrankungen (59). Seit den ersten Studien 1987 belegen mittlerweile unzählige Arbeiten die zentrale Rolle von TNF- α bei akuter gramnegativer Bakteriämie und Endotoxemia (10).

Waage et al. (65) sowie Schreiber et al. (53) berichteten 1988 unabhängig voneinander, daß die Toxizität von TNF- α durch gleichzeitige Verabreichung von IL-1 oder Lipopolysaccharid (LPS) verstärkt wird. Wie im Jahr darauf von Fong et al. (29) gezeigt werden konnte, führt die Inhibierung der endogenen TNF- α -Antwort mittels monoklonaler Antikörper bei gramnegativem septischem Schock zu einer verminderten IL-1- und IL-6-Antwort. Wenig später ergaben Studien von Ohlssen et al. (45), Dinarello et al. (66), Norton et al. (1) sowie der Gruppe um Fisher (23), daß die Blockade von endogenem IL-1 mittels IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) ebenfalls zu einer Erhöhung der Überlebensrate sowie einer Verringerung der Gewebeschädigung in Zusammenhang mit gramnegativer Bakteriämie führt.

Innerhalb der letzten Jahre kam es zu einer rasanten Steigerung des Wissensstandes über die Mechanismen und Wirkungsweisen von pro-inflammatorischen Zytokinen im Rahmen ihrer Beteiligung an Schock, Schädigung des Gewebes und Sepsis-Syndrom. Neben TNF- α und IL-1 β sind auch Interferon- γ (IFN- γ), LIF/Factor D, IL-6 und IL-12 maßgeblich an der Pathogenese gramnegativer Infektionen und Endotoxemia beteiligt (1, 6, 8). TNF- α und IL-1 β werden sehr früh bei einem septischen Geschehen produziert und stehen somit am Beginn einer nachfolgenden Kaskade von pro-inflammatorischen Zytokinen. Die Synthese und Freisetzung der beiden potenten pro-inflammatorischen Mediatoren TNF- α und IL-1 β führt innerhalb weniger Minuten zur Aktivierung von Makrophagen (26, 32). Blockiert man TNF- α oder IL-1 β mittels Antikörper oder Rezeptor-Antagonisten, so wird auch die Synthese wichtiger Komponenten der inflammatorischen Immunantwort gehemmt (11, 26).

Die Immunantwort des Körpers gegenüber Infektionen ist jedoch weitaus komplexer und hängt keineswegs nur von den absoluten Konzentrationen an IL-1 und TNF- α ab, sondern basiert auch auf der Synthese von Zytokin-Inhibitoren und anti-inflammatorischen Mediatoren. Die katastrophale Reaktion des Organismus auf massive bakterielle Infektionen beruht auf einem Ungleichgewicht zwischen pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 und ihren natürlich vorkommenden Inhibitoren. Die bei letaler Bakteriämie und Endotoxemia gemessenen Plasmaspiegel an TNF- α und IL-1 β übersteigen um ein Vielfaches jene Konzentrationen, die von den endogenen Levels an freigesetzten TNF- α -Rezeptoren (TNF α R) p55 und p75 oder IL-1ra-Rezeptor-Antagonisten (IL-1 β ra) neutralisiert werden können (26, 62). Ein ähnliches Bild bietet sich auch bei hospitalisierten Patienten mit SIRS (systemic inflammatory response syndrome) oder Sepsis-Syndrom. Jene Mechanismen, die letztlich für die Verminderung der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine verantwortlich sind, erweisen sich als ineffektiv, da es zu einer kontinuierlichen externen Stimulation durch permanent ablaufende infektiöse oder inflammatorische Prozesse kommt. Die dadurch persistierende Synthese pro-inflammatorischer Zytokine trägt in entscheidendem Maß zu hämodynamischer Instabilität, Koagulopathie sowie Multiorganversagen bei. Sowohl im septischen Schock wie auch bei SIRS werden die positiven Aspekte der pro-inflammatorischen Zytokine (u. a. Stimulation der unspezifischen Immunantwort, erhöhte antigenspezifische T-Zell-Proliferation sowie gesteigerte Phagozytosekapazität von Makrophagen und NK-Zellen) durch die negativen Konsequenzen einer permanenten Exposition gegenüber erhöhten TNF- α - und IL-1 β -Levels überdeckt.

Bisweilen zielten Anti-Zytokin-Therapieansätze zur Behandlung des septischen Schocks und des Sepsis-Syndroms entweder auf eine Unterdrückung der pro-inflammatorischen Immunantwort mittels Gabe von IL-10 oder TGF β (transforming growth factor β) ab oder auf eine Blockade der TNF- α - und IL-1 β -Aktivität mit Hilfe entsprechender Antikörper, oder aber auf eine pharmakologische Erhöhung der Konzentration an Zytokin-Inhibitoren wie rekombinante IL-1 Rezeptor-Antagonisten und lösliche TNF-Rezeptoren. Präklinische Studien an Nagetieren sowie nachfolgend an Primaten belegten den erfolgreichen Einsatz von Antikörpern (anti-TNF- α mAb) und Zytokin-Inhibitoren (IL-1ra und lösliche TNFR) bei letaler Endotoxemia bzw. gramnegativer Bakteriämie und führten so zu ersten klinischen Studien bei Patienten mit Sepsis-Syndrom und Schock. Die anfänglichen vielversprechenden Ergebnisse der Behandlung von Patienten mit IL-1ra im Rahmen einer Phase-II-Studie (24) konnten jedoch letztlich nur in einer kleinen Subgruppe von Patienten in der nachfolgenden Phase-III-Studie bestätigt werden (27). Retrospektive Analysen von Phase-II- und Phase-III-Studien bei Einsatz von monoklonalen anti-TNF- α -Antikörpern ergaben ein ähnliches Bild.

Während stets nur eine kleine, selektive Patientengruppe von der Anwendung der Anti-Zytokin-Therapien in Form von anti-TNF- α -Antikörpern oder IL-1-Inhibitoren profitierte, führte dieselbe Therapie zu einer Erhöhung der Mortalitätsrate in der verbleibenden Patientenpopulation (22, 24). Anti-TNF- α - und anti-IL-1-Therapien erwiesen sich vornehmlich in Schock-Patienten mit Organversagen als erfolgreich, während sie für potentiell Schock-gefährdete Patienten ein nicht unbedeutendes Risiko darstellten. Keine der Vielzahl an klinischen Studien konnte nachweislich die Effizienz des neuen Anti-Zytokin-Therapiekonzepts belegen. Dieser Umstand läßt sich jedoch weniger auf einen konzeptionellen Fehler als auf Fehler in der Anwendung zurückführen. Zieht man zudem die Tatsache in Betracht, daß Zytokine sowohl positive wie auch negative Wirkung ausüben können, erscheinen derartige Ergebnisse nicht unverständlich. So konnten Echtenacher et al. zeigen, daß eine Blockade der endogenen TNF- α -Produktion in einem non-letalen Peritonitis-Modell zu hoher Letalität führte (16, 33, 37). Wie auch Studien von van der Meer et al. sowie Czynprinski et al. belegen, führt die Verabreichung von IL-1 bei einer Mehrheit von

gramnegativen Infektionen zu einer Verbesserung der Immunabwehr, während die Blockade von IL-1 eine Inhibierung antimikrobieller Prozesse zur Folge hat (13, 39, 42, 46, 51, 63, 64). Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß eine Immunantwort in Form der Synthese endogener pro-inflammatorischer Zytokine auch positive Wirkungsmechanismen besitzt und andererseits der Versuch, eine endogene TNF- α - oder IL-1-Produktion zu unterdrücken, eine Reihe unerwünschter Nebenwirkungen mit sich bringen kann.

Wir glauben, daß selbst eine nähere Charakterisierung der optimalen Patientenpopulation nur teilweise zur Lösung der diskutierten Probleme in Zusammenhang mit Anti-Zytokintherapien führen kann. Eine der Hauptschwierigkeiten bei der systemischen Verabreichung von IL-1- oder TNF- α -Inhibitoren (IL-1 α und monoklonale anti-TNF- α -Antikörper bzw. lösliche TNFR) bzw. von anti-inflammatorischen Mediatoren wie Glukokortikoide, IL-4, TGF β , IL-10 oder IL-13 liegt in der Fehlerhaftigkeit dieser Methode, individuelle Kompartimente des Körpers mit einer vermehrten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine gezielt und ausschließlich zu erreichen.

Die systemische Verabreichung von Zytokininhibitoren erweist sich zudem als problematisch, da natürliche Antagonisten von TNF- α und IL-1 meist eine kurze biologische Halbwertszeit besitzen, die innerhalb weniger Minuten bis maximal einiger Stunden rangiert (23, 62). So berichten Fisher et al., daß die biologische Halbwertszeit von IL-1 α bei septischen Primaten durchschnittlich 21 Minuten beträgt (23). Um nun konstante therapeutische Plasmakonzentrationen von 10 bis 15 mg/ml an IL-1 α und löslichen TNF-Rezeptoren aufrecht halten zu können, müssen diese anti-inflammatorischen Mediatoren in einer Konzentration von 1,5 bis 2 mg/kg BW/h bzw. in einer Menge von 2,5g/Tag während der gesamten septischen Phase des Patienten verabreicht werden. Dieser Therapieansatz erweist sich daher als äußerst kostenintensiv bei gleichzeitig geringer Effizienz.

Letztlich kann eine übersteigerte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine zu Pathologien in einem Kompartiment des Körpers beitragen, während dieselben Mediatoren kurative Eigenschaften in anderen Kompartimenten besitzen können. Die systemische Verabreichung von Zytokininhibitoren, die aus bereits erwähnten Gründen in ausreichend hoher Konzentration erfolgen muß, kann somit auch erwünschte positive Effekte einer pro-inflammatorischen Immunantwort unterdrücken. Diese Tatsache erklärt möglicherweise experimentelle Beobachtungen, denenzufolge eine Blockade der TNF- α -Produktion zu einer ungünstigeren Prognose führte.

Bereits im Jahr 1986 charakterisierten Beutler und Cerami (7) die Eigenschaften von TNF- α als die zwei Seiten einer Münze. Schon zu dieser Zeit war hinlänglich bekannt, daß die biologischen Eigenschaften von TNF- α primär positive Wirkung im menschlichen Organismus ausüben. Eine Vielzahl von experimentellen Studien belegte die essentielle Rolle von endogenem TNF- α und IL-1 in der normalen, unspezifischen Immunantwort sowie deren Beteiligung an einer Verminderung der Gewebeschädigung und dem Auftreten sekundärer bakterieller Infektionen. Zudem trägt die Produktion von endogenem TNF- α und IL-1 in großem Ausmaß zur Abwehr intrazellulärer Pathogene wie Listerien und Pneumocystis bei (52) sowie zur Bekämpfung gramnegativer bakterieller Infektionen (33, 41). Dinarello et al. konnten jedoch anhand eines Rattenmodells zeigen, daß eine übersteigerte wie auch eine inadäquate IL-1-Produktion zu letalen Auswirkungen im Rahmen gramnegativer Infektionen führt (41). Infiziert man zwei Tage alte Ratten mit Klebsiella, so lassen sich eine 100%ige Mortalitätsrate sowie ein hohes Level an IL-1-Produktion feststellen. Blockiert man die überschüssige Menge an IL-1 mit geringen Dosen von IL-1 α , so sinkt die Mortalitätsrate auf einen Wert unter 20 % ab. Werden jedoch hohe Dosen an IL-1 α verabreicht, die zu einer vollständigen Blockade der biologischen Funktion von IL-1 führen, so läßt sich erneut ein Ansteigen der Mortalitätsrate auf beinahe 100 % beobachten. Diese Ergebnisse belegen somit die Notwendigkeit

der Produktion von Interleukin-1 im Rahmen einer antimikrobiellen Immunantwort, zeigen jedoch gleichzeitig, daß zu geringe bzw. zu große Mengen an Interleukin-1 zu einer Reihe von unerwünschten Effekten führen.

Aufgrund all dieser Ergebnisse erscheint uns nun die Verabreichung von anti-inflammatorischen Zytokinen bzw. Zytokininhibitoren mittels Gentransfers wesentlich effektiver in der kompartimentspezifischen Blockade pro-inflammatorischer Zytokine als eine systemische Verabreichung derselben Mediatoren.

Gentransfer als direktes Transportmittel von Anti-Zytokin-Therapien zu Organen und Geweben

Während der letzten Jahre kam es zu einem rasanten Fortschritt in der Entwicklung der Genterapie, so daß uns heute eine Vielzahl von verschiedensten Technologien zur Verfügung steht (2, 43, 44). Primäres Ziel der Genterapie war über lange Zeit ausschließlich die Korrektur genetischer Abnormalitäten in der Keimbahn, wie sie beispielsweise im Rahmen von zystischer Fibrose oder Duchenne-Muskeldystrophie auftreten (18, 19). Diese Versuche zielen somit auf den Ersatz des mutierten Gens oder die Veränderung des Zell-Phänotyps ab.

Die Methode des Gentransfers bietet sich in unseren Augen jedoch auch als eine innovative Form der Verabreichung von Wirkstoffen an, um eine inflammatorische Antwort des Immunsystems vorübergehend in individuellen Geweben und Organen abzuschwächen. Wir glauben, daß der Einsatz von Gentransfer-Technologien bei chirurgischen Interventionen letztlich eine einzigartige Möglichkeit darstellt, post-chirurgische und inflammatorische Immunantworten in gewünschter Form zu modulieren.

Die spezifische Zielsetzung der Genterapie bei Sepsis und akuter Inflammation unterscheidet sich daher in mancherlei Hinsicht von den Aufgaben jener Genterapie, die die Korrektur von Mutationen in der Keimbahn anstrebt. Während die Behandlung von Erkrankungen der Keimbahn wie z. B. ADAD (adenosine deaminase deficiency), SCID (induced severe combined immune deficiency) oder CF (Cystische Fibrose) eine stabile Integration des gesunden Gens in das Genom der Zellen des Zielgewebes erfordert (12, 15, 17, 38, 48, 54, 55), liegt das Ziel eines Gentransfers bei Sepsis oder akuter Entzündung in einer transienten, non-stabilen Transfektion, die in einer maximalen Genexpression für den Zeitraum von Tagen bis wenigen Wochen resultiert. Eine stabile, viral medierte Integration eines Gens, das für anti-inflammatorische Zytokine oder Zytokin-Inhibitoren kodiert, würde zu langfristigen Schäden durch permanente Immunsuppression und mögliche Onkogenese führen und ist daher nicht erwünscht. Wir haben uns daher für einen non-viralen Gentransfer unter Verwendung von Liposomen entschieden.

Basierend auf In-vitro-Studien schrieb man dem Liposomenvermittelten Gentransfer im Vergleich zu viralen Vektorsystemen auch in vivo eine äußerst geringe sowie kaum erfolgreiche Transfektionseffizienz zu (18, 19). Fehlende Qualitätskontrollen der Liposomen-Präparationen sowie deren rasche Peroxidation führten zu schlecht reproduzierbaren Ergebnissen, die zudem auch noch von einer direkten toxischen Wirkung der Liposomen auf bestimmte Zellpopulationen zeugten.

Der endgültige In-vivo-Einsatz von Liposomen im Rahmen eines Gentransfers fand erst nach einem Bericht von Felgner et al. (18) statt, der die Verwendung von Liposomen als eine einfache, billige, reproduzierbare und effiziente Technik beschreibt. Im Laufe der Zeit kam es zudem stets zu Verbesserungen in der chemischen Zusammensetzung der Liposomen, so daß heute die Effizienz der Transfektion bei beinahe 75 % liegt und somit mit viralen Gentransfersystemen durchaus vergleichbar ist (21). Philip et al. konnten darüber hinaus zeigen, daß mittels Variation der chemischen Komponenten der Liposomen selbst ein gewisser Grad an gewebsspezifischer transgener Expression erreicht werden kann (14, 47, 57). Im allgemeinen bilden diese positiv geladenen Lipidpartikel spontan multilamellare Vesikel, die über die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA an diese

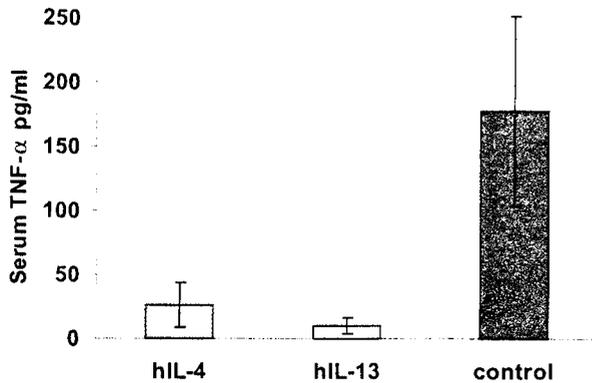


Abb. 1. TNF- α -Immunoaktivität im Serum 90 min nach Induktion des letalen septischen Schocks. Die Mäuse wurden 2 Tage zuvor intraperitoneal mit 200 μ g pcD/hIL-4 plasmid DNA, 200 μ g pJFE/hIL-13 plasmid DNA oder 200 μ g pMP6 control DNA im Komplex mit 100 nmol Liposomen transfiziert. Tiere, die mit hIL-4 oder hIL-13 behandelt wurden, zeigen eine signifikante Reduktion der TNF- α -Produktion nach Verabreichung einer letalen Dosis von LPS-D-GalN ($p < 0,05$). Eur. J. Immunol. 1998.

binden und stabile Lipid-DNA-Komplexe formen (21). Jene positiv geladenen Lipide der Liposomen interagieren jedoch nicht nur mit der negativ geladenen DNA, sondern auch mit den ebenso negativ geladenen Zellmembranen. Liposomen führen dabei eine Membranfusion oder transiente Destabilisierung der Membran mit dem Plasmalemma oder Endosom herbei, um die Aufnahme der DNA in das Zytoplasma bei gleichzeitigem Schutz vor lysosomalem Abbau derselben zu erzielen. Da es sich um einen Rezeptor-unabhängigen Prozeß handelt, kann er in den meisten Zelltypen ablaufen. Sobald die DNA im Zytoplasma angelangt ist, wandert sie in den Zellkern und wird dort in Abhängigkeit vom Vorhandensein von **cis-acting elements** wie z. B. retroviralen LTRs (long terminal repeats) entweder in das Genom integriert oder in episomaler Weise von der zelleigenen Maschinerie transkribiert (44).

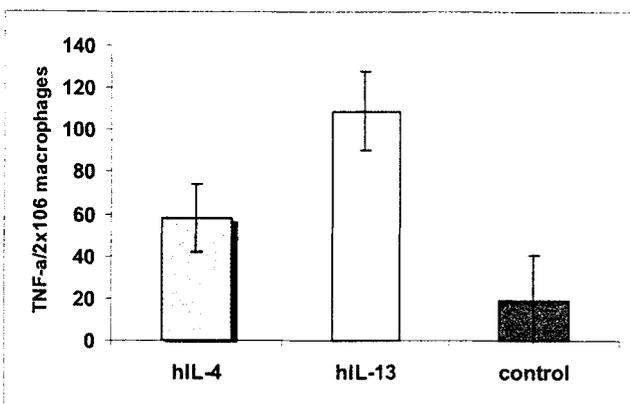


Abb. 3. TNF- α -Produktion von peritonealen Makrophagen 48 h nach Induktion des letalen septischen Schocks. Die Mäuse wurden 2 Tage zuvor intraperitoneal mit 200 μ g pcD/hIL-4 plasmid DNA, 200 μ g pJFE/hIL-13 plasmid DNA oder 200 μ g pMP6 control DNA im Komplex mit 100 nmol Liposomen transfiziert. 48 h nach Induktion des septischen Schocks wurden die peritonealen Makrophagen der überlebenden Tiere isoliert und je 2 x 10⁶ Zellen in Kultur mit 1 μ g LPS stimuliert. 18 h später wurde in den Zellüberständen die TNF- α -Immunoaktivität mittels ELISA ermittelt. Überlebende Tiere, die mit IL-4 und IL-13 behandelt wurden, zeigen eine signifikant höhere TNF- α -Produktion als Kontrolltiere ($p < 0,05$). Eur. J. Immunol. 1998.

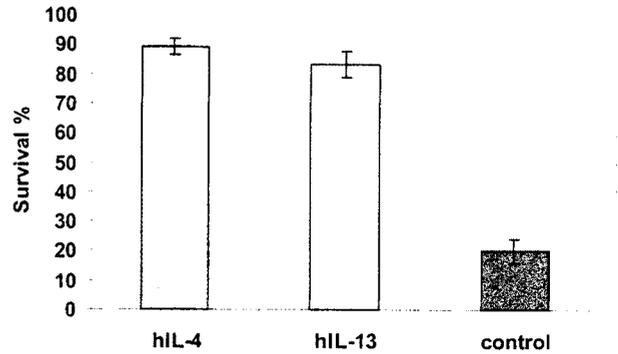


Abb. 2. 48-h-Überlebensrate nach Induktion des letalen septischen Schocks. Die Mäuse wurden 2 Tage zuvor intraperitoneal mit 200 μ g pcD/hIL-4 plasmid DNA, 200 μ g pJFE/hIL-13 plasmid DNA oder 200 μ g pMP6 control DNA im Komplex mit 100 nmol Liposomen transfiziert. Tiere, die mit hIL-4 oder hIL-13 behandelt wurden, zeigen ein signifikantes Ansteigen der Überlebensrate im Vergleich zu Kontrolltieren ($p < 0,001$). Eur. J. Immunol. 1998.

Ob nun die Aufnahme der DNA in die Zelle mittels viraler Vektoren und somit über spezifische zelluläre Rezeptoren erfolgt oder mittels Endozytose und Interaktionen der Plasmamembran wie im Falle der Liposomen, ändert nichts an den nun folgenden Abläufen. Sobald die DNA in die Zelle inkorporiert ist, wird die transgene Expression mittels zusätzlicher cis-acting regulatory sequences wie transkriptioneller Promotoren und Enhancers sowie trans-acting zelleigenen RNA-Polymerasen und Transkriptionsfaktoren initiiert. Zu den am häufigsten in Expressionsvektoren für Mammalia verwendeten transkriptionellen Promotoren zählt der Cytomegalovirus (CMV) immediate-early Promoter und Enhancer (14, 36, 47, 57).

Der CMV-Promoter wird von der RNA-Polymerase II transkribiert und führt zu einer hohen Expressionsrate in einer Vielzahl von Geweben wie Lunge, Niere und vasculäres Endothel (56). CMV-Promoter-Vektoren, die mit einem Reportergen wie z. B. Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) ausgestattet sind, wurden in einer Vielzahl von Studien vergleichsweise intravenös, intraperitoneal bzw. mittels Inhalation an gesunde Tiere verabreicht (14, 36, 47, 57).

Im Falle der intravenösen Applikation der CMV-CAT-Expressionsvektoren konnte über einen Zeitraum von bis zu 63 Tagen nach Verabreichung eine CAT-Expression und CAT-Aktivität primär in Lunge, Milz, Leber, Herz, Niere, Lymphknoten sowie Thymus, Uterus, Ovarien, Skelettmuskulatur und Intestinaltrakt der transfizierten Tiere nachgewiesen werden. Bei Administration der Liposomen-CMV-CAT-Vektoren-Komplexe via Inhalation fanden sich in den nachfolgenden 21 Tagen ausschließlich in der Lunge hohe Levels an CAT-Expression (57).

Wir beschäftigten uns während der letzten Jahre intensiv mit Gentherapie im Rahmen des septischen Schocks und der akuten Inflammation. So konnten wir anhand eines murinen letalen Schockmodells zeigen, daß der prophylaktische intraperitoneale Gentransfer des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-10 bzw. des TNF- α -Rezeptors p55 zu einer signifikanten Verringerung der Mortalitätsrate führte (50). Diese Ergebnisse ermutigten uns, auch die Wirkung des Gentransfers der anti-inflammatorischen Zytokine Interleukin-4 und Interleukin-13 in diesem Schockmodell zu untersuchen (4). Die intraperitoneale Verabreichung von IL-4 führte zu einer Reduktion des Serum TNF- α -Spiegels um 85 % von 177,6 pg/ml in mock-transfizierten Tieren zu 26,3 pg/ml ($p < 0,05$), während der Gentransfer von IL-13 die Serum-TNF- α -Spiegel um 95% von 177,6 pg/ml auf 10,1 pg/ml ($p < 0,05$) verringerte (Abb. 1). Im Gegenzug verbesserte sich die Überlebensrate von 20 % bei mock-transfizierten

Tieren auf über 83 % in beiden behandelten Gruppen ($p < 0,001$) (Abb. 2). Zudem konnten wir eine signifikante Steigerung der Immunkompetenz peritonealer Makrophagen in der IL-4- wie auch der IL-13-behandelten Gruppe feststellen, wobei IL-13 eine stärkere Modulation aufweist ($p < 0,05$) (Abb. 3).

Unsere Ergebnisse unterstreichen deutlich die Vorteile der Verwendung des Gentransfers im Rahmen der Therapie von Sepsis und anderen akuten inflammatorischen Prozessen. Diese innovative Methode ermöglicht uns nicht nur eine organspezifischere Verabreichung diverser Mediatoren, sondern zudem auch deren kontinuierliche Expression über einen Zeitraum von Tagen bis einigen Wochen. Während konservative anti-inflammatorische Therapien stets den Nachteil einer systemischen Immunsuppression verbunden mit einem erhöhten Risiko sekundärer Infektionen mit sich bringen, bietet uns der Gentransfer eine lokale, kompartimentspezifische und äußerst effektive Waffe im Kampf gegen entzündliche Erkrankungen und septische Komplikationen.

Literatur

- Alexander HR, Doherty GM, Venzon DJ, Merino MJ, Fraker DL, Norton JA: Recombinant interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra): effective therapy against gram-negative sepsis in rats. *Surgery* 1992; 112: 188-193.
- Anderson WF: Human gene therapy. *Science* 1992; 256: 808-813.
- Ashkenazi A, Marsters SA, Capon DJ, Chamow SM, Figari IS, Pennica D, Goeddel DV, Palladino MA, Smith DH: Protection against endotoxin shock by a tumor necrosis factor receptor immunoadhesin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 10535-10539.
- Baumhofer JM, Beinbauer BG, Wang JE, Brandmeier H, Geissler K, Losert UM, Philip R, Aversa G, Rogy MA: Gene transfer with IL-4 and IL-13 improves survival in lethal endotoxemia in the mouse and ameliorates peritoneal macrophage immune competence. *Eur J Immunol* 1998; 28: 610-615.
- Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A: Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 1986; 232: 977-980.
- Beutler BA, Milsark IW, Cerami A: Cachectin/tumor necrosis factor: production, distribution and metabolic fate *in vivo*. *J Immunol* 1985; 135: 3972-3977.
- Beutler B, Cerami A: Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature* 1986; 320: 584-588.
- Block ML, Berg M, McNamara MJ, Norton JA, Fraker DJ, Alexander HR: Passive immunization of mice against D factor blocks lethality and cytokine release during endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 178: 1085-1099.
- Bone RC: The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 1991; 115: 457-469.
- Bone RC: Monoclonal antibodies to tumor necrosis factor in sepsis: help or harm? *Crit Care Med* 1993; 21: 311-312.
- Cerami A: Tumor necrosis factor as a mediator of shock, cachexia and inflammation. *Blood Purif* 1993; 11: 108-117.
- Cournoyer D, Caskey CT: Gene therapy of the immune system. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 297-329.
- Czuprynski CJ, Haak Frensch M, Maroushek N, Brown JF: Effects of recombinant human interleukin-6 alone and in combination with recombinant interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor alpha on antibacterial resistance in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 68-70.
- Debs R, Pian M, Gaensler K, Clements J, Friend DS, Dobbs L: Prolonged transgene expression in resident lung cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7: 406-413.
- Donahue RE, Kessler SW, Bodine D, McDonagh K, Dunbar C, Goodman S, Agricola B, Byrne E, Raffeld M, Moen R: Helper virus induced T cell lymphoma in non-human primates after retroviral mediated gene transfer. *J Exp Med* 1992; 176: 1125-1135.
- Echtenacher B, Falk W, Mannel DN, Krammer PH: Requirement of endogenous tumor necrosis factor/cachectin for recovery from experimental peritonitis. *J Immunol* 1990; 145: 3762-3766.
- Ellison V, Abrams H, Roe T, Lifson J, Brown P: Human immunodeficiency virus integration in a cell-free system. *J Virol* 1990; 64: 2711-2715.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielson M: Lipofectin: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 7413-7417.
- Felgner PL, Ringold GM: Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 1989; 337: 387-388.
- Felgner PL, Rhodes G: Gene therapeutics. *Nature* 1991; 349: 351-352.
- Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL: Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem* 1994; 269: 2550-2561.
- Fisher CJ Jr, Opal SM, Dhainaut JF, Stephens S, Zimmerman JL, Nightingale P, Harris SJ, Schein RM, Panacek EA, Vincent JL et al: Influence on an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. The CB0006 Sepsis Syndrome Study Group. *Crit Care Med* 1993; 21: 318-327.
- Fischer E, Marano MA, Van Zee KJ, Rock CS, Hawes AS, Thompson WA, DeForge L, Kenney JS, Remick DG, Bloedow DC et al: Interleukin-1 receptor blockade improves survival and hemodynamic performance in *Escherichia coli* septic shock but fails to alter host responses to sublethal endotoxemia. *J Clin Invest* 1992; 89: 1551-1557.
- Fisher CJ Jr, Slotman GJ, Opal SM, Pribble JP, Bone RC, Emmanuel G, Ng D, Bloedow DC, Catalano MC et al: IL-1ra Sepsis Syndrome Study Group Initial evaluation of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of sepsis syndrome. A randomized open-label, placebo-controlled multicenter trial. *Crit Care Med* 1994; 22: 12-21.
- Fischer E, Marano MA, Barber AE, Hudson A, Lee K, Rock CS, Hawes AS, Anderson TD, Benjamin WR, Lowry SF, Moldawer LL: Comparison between effects of interleukin-1 alpha administration and sublethal endotoxemia in primates. *Am J Physiol* 1991; 261: R442-452.
- Fischer E, Van Zee KJ, Marano MA, Rock CS, Kenney JS, Poutsiaika DD, Dinarello CA, Lowry SF, Moldawer LL: Interleukin-1 receptor antagonist circulates in experimental inflammation and in human disease. *Blood* 1992; 79: 2196-2200.
- Fisher CJ Jr, Dhainaut J-FA, Opal SM, Pribble JP, Balk RA, Slotman GJ, Iberti TJ, Rackow EC, Shapiro MJ, Greenman RL, Reines HD, Shelly MP, Thompson BW, LaBrecque JF, Catalano MA, Knaus WA, Sadoff JC: Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of patients with sepsis syndrome: Results from a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *JAMA* 1994; 271: 1836-1843.
- Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, Lowry SF: The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 170: 363-378.
- Fong Y, Tracey KJ, Moldawer LL, Hesse DG, Manogue KB, Kenney JS, Lee AT, Kuo GC, Allison AC, Lowry SF, et al: Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin-1 beta and interleukin-6 appearance during lethal bacteremia. *J Exp Med* 1989; 170: 1627-1633.
- Gerard C, Bruyns C, Marchant A, Abramowicz D, Vandebeele P, Delvaux A, Fiers W, Goldman M, Velu T: Interleukin-10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177: 547-550.
- Ginsberg HS, Moldawer LL, Sehgal PB, Redington M, Kilian PL, Chanock RM, Prince GA: A mouse model for investigating the molecular pathogenesis of adenovirus pneumonia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1651-1655.
- Granowitz EV, Vannier E, Poutsiaika DD, Dinarello CA: Effect of interleukin-1 (IL-1) blockade on cytokine synthesis: II IL-1 receptor antagonist inhibits lipopolysaccharide-induced cytokine synthesis by human monocytes. *Blood* 1992; 79: 2364-2369.
- Haak Frensch M, Kurtz RS, Czuprynski CJ: rIL-1 alpha enhances adoptive transfer of resistance to *Listeria monocytogenes* infection. *Microb Pathog* 1991; 10: 385-392.
- Hinshaw LB, Tekamp Olson P, Chang AC, Lee PA, Taylor FB Jr, Murray CK, Peer GT, Emerson TE Jr, Passey RB, Kuo GC: Survival of primates in LD100 septic shock following therapy with antibody to tumor necrosis factor (TNF alpha). *Circ Shock* 1990; 30: 279-292.
- Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S: Interleukin-10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177: 1205-1208.
- Kaneda Y, Kunimitsu I, Uchida T: Increased expression of DNA coinduced with Nuclear Protein in Adult Rat Liver. *Science* 1989; 243: 375-378.
- Kenefick KB, Adams JL, Steinberg H, Czuprynski CJ: *In vivo* administration of a monoclonal antibody against the type I IL-1 receptor inhibits the ability of mice to eliminate *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Leukocyte Biol* 1994; 55: 719-722.
- Kotin RM, Siniscalco M, Samulski RJ, Zhu XD, Hunter L, Laughlin CA, McLaughlin S, Muzyczka N, Rocchi M, Berns KI: Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 2211-2215.
- Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD: A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 1988; 53: 45-53.
- Lesslauer W, Tabuchi H, Gentz R, Brockhaus M, Schlaeger EJ, Grau G, Piguet PF, Pointaire P, Vassalli P, Loetscher H: Recombinant soluble tumor necrosis factor receptor proteins protect mice from lipopolysaccharide-induced lethality. *Eur J Immunol* 1991; 21: 2883-2886.
- Mancilla J, Garcia P, Dinarello CA: The interleukin-1 receptor antagonist can either reduce or enhance the lethality of *Klebsiella pneumoniae* sepsis in newborn rats. *Infect Immun* 1993; 61: 926-932.
- Mathison JC, Wolfson E, Ulevitch RJ: Participation of tumor necrosis factor in the mediation of gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J Clin Invest* 1988; 81: 1925-1937.
- Morsy MA, Mitani K, Clemens P, Caskey T: Progress toward human gene therapy. *JAMA* 1993; 270: 2338-2345.
- Mulligan RC: The basic science of gene therapy. *Science* 1991; 260: 926-932.
- Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC: Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature* 1990; 348: 550-552.
- Perez C, Albert I, DeFay K, Zachariades N, Godding L, Kriegler M: A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* 1990; 63: 251-258.
- Philip R, Liggitt D, Philip M, Dazin P, Debs R: *In vivo* gene delivery efficient transfection of T lymphocytes in adult mice. *J Biol Chem* 1993; 268: 16087-16090.
- Roe T, Reynolds TC, Yu G, Brown PO: Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J* 1993; 12: 2099-2108.
- Rogy MA, Lutge B, Epat NJ, Copeland EM, Moldawer LL: Human TNF receptor and interleukin-10 gene transfer in the mouse reduces mortality to lethal endotoxemia. *Surgical Forum* 1994; XLV: 21-23.
- Rogy MA, Auffenberg T, Epat NJ, Philip R, Remick D, Wollenberg GK, Copeland EM, Moldawer LL: Human tumor necrosis factor receptor p55 and IL-10 gene transfer in the mouse reduces mortality to lethal endotoxemia and also attenuates local inflammatory responses. *J Exp Med* 1995; 181: 2289-2293.
- Roll JT, Young KM, Kurtz RS, Czuprynski CJ: Human rTNF alpha augments anti-bacterial resistance in mice: potentiation of ist effects by recombinant human rIL-1 alpha. *Immunology* 1990; 69: 316-322.
- Rothe J, Lesslauer W, Lutschner H, Lang Y, Koebel P, Kontgen F, Althage A, Zinkernagel R, Steinmetz M, Bluethmann H: Mice lacking the tumor necrosis factor receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by *Listeria monocytogenes*. *Nature* 1993; 364: 798-802.
- Rothstein JL, Schreiber H: Synergy between tumor necrosis factor and bacterial products causes hemorrhagic necrosis and lethal shock in normal mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 607-611.

- (54) Rosenfeld MA, Siegfried W, Yoshimura K, Yoneyama K, Fukayama M, Stier LE, Paakko PK, Gilardi P, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, Jallat S, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG: Adenovirus-Mediated Transfer of a Recombinant 1-Antitrypsin Gene to the Lung Epithelium in vivo. *Science* 1991; 252: 431–434.
- (55) Salmos B, Gunzburg WH: Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 129–141.
- (56) Schmidt E, Christoph G, Zeller R, Leder P: Cytomegalovirus enhancer: a pan-active control element in transgenic mice. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 4406–4411.
- (57) Stribling R, Brunette E, Liggitt D, Gaensler K, Debs R: Aerosol gene delivery in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 11277–11281.
- (58) Suter PM, Suter S, Girardin E, Roux Lombard P, Grau GE, Dayer JM: High bronchoalveolar levels of tumor necrosis factor and its inhibitors interleukin-1, interferon and elastase, in patients with adult respiratory distress syndrome after trauma, shock, or sepsis. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145: 1016–1022.
- (59) Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, Manogue KR, Lee AT, Kuo GC, Lowry SF, Cerami A: Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature* 1987; 330: 662–664.
- (60) Tracey KJ, Wei H, Manogue KR, Fong Y, Hesse DG, Nguyen HAT, Kuo GC, Beutler B, Cotran RS, Cerami A, et al: Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia and inflammation. *J Exp Med* 1988; 167: 1211–1227.
- (61) Tracey KJ, Lowry SF, Fahey TJ, Albert JD, Fong Y, Hesse DG, Beutler B, Manogue KR, Calvano S, Wei H, et al: Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone response in the dog. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 164: 415–422.
- (62) Van Zee KJ, Kohno T, Fischer E, Rock CS, Moldawer LL, Lowry SF: Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4845–4849.
- (63) Van der Meer JW, Vogels M, Curfs JH, Eling WM: Interleukin-1 as a possible agent for treatment of infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1993; 12 (Suppl 1): S73–S77.
- (64) Van der Meer JW, Helle M, Aarden L: Comparison of the effects of recombinant interleukin-6 and recombinant interleukin-1 on nonspecific resistance to infection. *Eur J Immunol* 1989; 19: 413–416.
- (65) Waage A, Espervik T: Interleukin-1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor alpha/cachectin in mice. *J Exp Med* 1988; 167: 1987–1992.
- (66) Wakabayashi G, Gelfand JA, Burke JF, Thompson RC, Dinarello CA: A specific receptor antagonist for interleukin-1 prevents Escherichia coli-induced shock in rabbits. *FASEB J* 1991; 5: 338–343.

Kongreßankündigungen / Congress Announcements

2nd International Symposium on Distraction Osteogenesis in Cranio-Maxillofacial Surgery

- Venue:** Marienhospital, Stuttgart, Germany
- Date:** October 19-21, 2000
- Main Topics:** Live operations – virtual distraction campus – continuous online education
- Chairman:** K. Wangerin, Department of Plastic and Maxillofacial Surgery, Marienhospital, Boenheimstraße 37, D-70199 Stuttgart, Germany
- Information, Organisation and Registration:** Ms. Elfi Zieschang-Buck, Marienhospital, Boenheimstraße 37, D-70199 Stuttgart, Germany. Tel.: ++49/711/6489-2530, Fax: ++49/711/6489-2529, E-mail: Kwangerin@aol.com, Internet: www.marienhospital-stuttgart.de

Symposium: “Haemostasis and Transfusion – Management in Elderly Patients”

- Venue:** Congresszentrum Graz
- Date:** October 27-28, 2000
- Organisation:** Department of Anaesthesiology, University of Munich, and Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, University of Graz
- Information:** H. Gombotz, Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, University of Graz, Auenbruggerplatz 29, A-8036 Graz. Tel.: ++43/316/385-3027, Fax: ++43/316/385-4664, E-mail: haemostasis@kfunigraz.ac.at

Symposium „Endoprothetik in der Unfallchirurgie“ mit praktischen Übungen

- Ort:** Anatomisches Institut der Universität Graz, Harrachgasse
- Termin:** 21. bis 23. September 2000
- Veranstalter:** Universitätsklinik für Unfallchirurgie Graz (Vorstand: Prof. Dr. R. Szyzkowitz), Anatomisches Institut der Universität Graz (Vorstand: Prof. Dr. F. Anderhuber), Gesellschaft zur wissenschaftlichen Aus- und Weiterbildung in der Unfallchirurgie, unter der Patronanz der Österreichischen Gesellschaft für Unfallchirurgie
- Praktische Übungen:** Hemi- und Totalprothese Hüftgelenk – Endoprothese am Kniegelenk, Schultergelenk, Sprunggelenk, Radiohumeralgelenk, Ulnokarpalgelenk
- Kursorganisation:** Prof. Dr. W. Grechenig
- Kursgebühr:** ATS 6.000,-
- Kurssekretariat:** Frau Evelyne Greiner (Mo.–Fr. von 8:00 bis 12:00 Uhr), Tel.: ++43/316/385-3547, Fax: ++43/316/385-3582, E-mail: evelyne.greiner@klinikum-graz.at