

Aus der Klinik für Anästhesie, Intensiv-, Notfall- und Schmerzmedizin  
(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Klaus Hahnenkamp)  
der Universitätsmedizin der Universität Greifswald

**Wirkung des HMG-CoA-Reduktase Hemmers Simvastatin auf die Mikrozirkulation und  
Leukozytenadhärenz unter Endotoxinämie bei Ratten**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

Greifswald

2022

vorgelegt von:

Sebastian Haußmann-Vopel

geboren am 03.04.1984

in Tübingen

Dekan: Prof. Dr. med. Karlhans Endlich

1. Gutachter: Prof. Dr. Taras Usichenko

2. Gutachter: PD Dr. Jürgen Birnbaum

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum auf Station D2 Raum-Nr. L-02.22

Tag der Disputation: 13.07.2023

# Inhaltsverzeichnis

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen.....</b>	<b>2</b>
2.1	Sepsis-Geschichte .....	2
2.2	Epidemiologie.....	4
2.3	Definitionen .....	5
2.4	Pathophysiologie .....	10
2.4.1	Endotoxin .....	11
2.4.2	Leukozyten-Endothelinteraktionen.....	13
2.4.3	Kapillarperfusion.....	15
2.5	Sepsismodell.....	16
2.6	Statine und Sepsis .....	19
2.6.1	Simvastatin.....	19
2.6.2	Struktur der HMG-CoA-Reduktase .....	20
2.6.3	Cholesterinstoffwechsel.....	21
2.6.4	Statinhaupteffekte.....	23
2.6.5	Pleiotrope Wirkungen .....	23
<b>3</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>26</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>27</b>
4.1	Versuchstiere .....	27
4.2	Allgemeiner Versuchsablauf .....	27
4.3	Anästhesie und operativer Ablauf.....	28
4.4	Intravitalmikroskopie.....	33
4.5	Auswertung der Intravitalmikroskopie .....	35
4.6	Blutgasanalyse .....	38
4.7	Zytokindiagnostik.....	38
4.8	Statistik .....	39
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
5.1	Vitalparameter .....	40
5.1.1	Mittlerer arterieller Blutdruck .....	40
5.1.2	Herzfrequenz.....	41
5.2	Intravitalmikroskopie.....	43
5.2.1	Funktionelle Kapillardichte .....	43

# Inhaltsverzeichnis

---

5.2.2	Temporär adhärenente Leukozyten in V1“Roller“ .....	45
5.2.3	Permanent adhärenente Leukozyten in V1“Sticker“ .....	46
5.2.4	Temporäre adhärenente Leukozyten in V3 “Roller“ .....	47
5.2.5	Permanent adhärenente Leukozyten in V3 “Sticker“ .....	48
5.3	Blutgasanalyse .....	49
5.3.1	Sauerstoffpartialdruck.....	49
5.3.2	Kohlendioxidpartialdruck.....	50
5.3.3	Hydrogencarbonat .....	51
5.3.4	pH-Wert.....	52
5.3.5	Laktat .....	53
5.4	Zytokine.....	54
5.4.1	GM-CSF .....	54
5.4.2	TNF- $\alpha$ .....	55
5.4.3	IL-1 $\alpha$ .....	56
<b>6</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>57</b>
6.1	Allgemein.....	57
6.2	Hämodynamik .....	58
6.3	Funktionelle Kapillardichte.....	59
6.4	Leukozytenadhäsion .....	62
6.5	Blutgasanalyse .....	65
6.6	Zytokine.....	67
6.6.1	GM-CSF .....	67
6.6.2	TNF- $\alpha$ .....	68
6.6.3	IL-1 $\alpha$ .....	70
6.7	Limitierung.....	70
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>74</b>
<b>9</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>88</b>

# Abbildungsverzeichnis

---

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Roger C. Bone (Quelle: Homepage Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V.)
- Abbildung 2: Operationalization of Clinical Criteria Identifying Patients with Sepsis and Septic Shock
- Abbildung 3: Schematische Struktur eines Lipopolysaccharids (Salmonella)
- Abbildung 4: Temporär adhärenente Leukozyten-Endothelinteraktion (Leukozytenrolling)
- Abbildung 5: Permanent adhärenente Endothel-Interaktion (Leukozytensticking)
- Abbildung 6: Strukturformel von Simvastatin (C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub>)
- Abbildung 7: Struktur der HMG-CoA-Reduktase
- Abbildung 8: Pleiotrope Effekte der Statine auf Gefäße
- Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus
- Abbildung 10: Darstellung des Arbeitsplatzes am Intravitalmikroskop nach dem Prinzip des „Hanging Drop“ nach Pavlovic (a-c)
- Abbildung 11: Schema des Darmwandaufbaus
- Abbildung 12: Darstellung der postkapillären Venole dritter Ordnung in der Submukosa eines Endotoxintieres
- Abbildung 13: Darstellung der Kapillaren in der Lamina muscularis circularis eines Kontrolltieres, markiert mit FITC-Albumin
- Abbildung 14: Darstellung der Kapillaren in der Lamina muscularis longitudinalis eines Kontrolltieres, markiert mit FITC-Albumin
- Abbildung 15: Darstellung der Kapillaren in der Lamina mucosa eines Kontrolltieres, markiert mit FITC-Albumin
- Abbildung 16: Darstellung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAB, in mmHg)
- Abbildung 17: Darstellung der Herzfrequenz (HF) in 1/min
- Abbildung 18: Darstellung der funktionellen Kapillardichte (FCD) in der Lamina muscularis longitudinalis in cm/cm<sup>2</sup>
- Abbildung 19: Darstellung der funktionellen Kapillardichte (FCD) in der Lamina muscularis circularis in cm/cm<sup>2</sup>

## Abbildungsverzeichnis

---

- Abbildung 20: Darstellung der funktionellen Kapillardichte (FCD) in der Mukosa in  $\text{cm}/\text{cm}^2$
- Abbildung 21: Darstellung der Anzahl an temporär adhärenenten Leukozyten (Roller) [n/min] der einzelnen Gruppen am Endothel in den Venolen der ersten Ordnung (V1);
- Abbildung 22: Anzahl der permanent adhärenenten Leukozyten (Sticker) [n/mm<sup>2</sup>] in den Venolen der ersten Ordnung (V1) [ n/mm<sup>2</sup>] aller Gruppen
- Abbildung 23: Darstellung der temporär adhärenenten Leukozyten (Roller) [n/min] der einzelnen Versuchsgruppen in den Venolen der dritten Ordnung (V3);
- Abbildung 24: permanent adhärenente Leukozyten (Sticker) [n/mm<sup>2</sup>] der einzelnen Versuchsgruppen in den Venolen dritter Ordnung (V3);
- Abbildung 25: Darstellung des Sauerstoffpartialdruckes (pO<sub>2</sub>) [mmHg];
- Abbildung 26: Darstellung des Kohlendioxidpartialdruckes (pCO<sub>2</sub>) [mmHg] bei zwei Blutentnahmen
- Abbildung 27: Darstellung des Hydrogencarbonates (HCO<sub>3</sub>) [mmol/L] bei zwei Blutentnahmen
- Abbildung 28: Darstellung des pH-Wertes (pH) bei zwei Blutentnahmen
- Abbildung 29: Darstellung des Laktatwertes [mmol/L] bei zwei Blutentnahmen
- Abbildung 30: Darstellung des ``Granolucyte macrophage colony stimulating factor`` GM-CSF [pg/ml] bei zwei Blutentnahmen
- Abbildung 31: TNF- $\alpha$  Konzentration [pg/ml] bei zwei Blutentnahmen
- Abbildung 32: IL-1 $\alpha$  Konzentration [pg/ml] bei zwei Blutentnahmen

## Abkürzungsverzeichnis

---

### Abkürzungsverzeichnis

2VM:	mukosale Venolen zweiter Ordnung
Abb.	Abbildung
A1-A5	Arteriolen 1-5
BE1	Blutentnahme 1
BE2	Blutentnahme 2
CASP	<i>Colon-Ascendens-Stent-Peritonitis</i>
CC	Kapillaren der zirkulären Muskulatur
CD14	<i>Cluster of Differentiation</i> , immunphänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen
CLP	<i>Cecum Ligation and Puncture</i>
CRP	C-reaktives Protein
CSE-Hemmer	Cholesterin-Synthese-Enzym-Hemmer
CV	Villussammelvenole
DCD	<i>Dysfunctional Capillary Density</i>
ELAM-1	<i>E-Selektin (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule)</i>
EPIC	<i>Extended Prevalence of Infection in Intensive Care</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FCD	<i>Functional Capillary Density</i>
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstofffraktion
FPP	Farnesylpyrophosphat
GBD	<i>Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study</i>
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein

## Abkürzungsverzeichnis

---

GPI	Phosphatidyl-Inositol-Anker
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	High Density Lipoprotein
HF	Herzfrequenz
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym-A
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IDL	<i>Intermediate Density Lipoproteins</i>
IFN-γ	Interferon-γ
IκB	<i>Inhibitory Protein κB</i>
IL-1	Interleukin-1
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-12	Interleukin-12
IL-13	Interleukin-13
IL-18	Interleukin-18
IVM	Intravitalmikroskopie
FITC	<i>Fluoresceinisothiocyanate</i>
KG	Körpergewicht
KCl	Kaliumchlorid
LALLF	Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei, Mecklenburg-Vorpommern
LC	Kapillaren der longitudinalen Muskulatur
LBP	<i>LPS-Binding Protein</i>
LECAM-1	L-Selektin, ( <i>Lectin Adhesion Molecule</i> )



## Abkürzungsverzeichnis

---

LDL	<i>Low-Density-Lipoprotein</i>
LDL-C	<i>Low-Density-Lipoprotein containing cholesterol</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-Associated Antigen-1</i>
LODS	<i>Logistic Organ Dysfunction System</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MAB	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAP	<i>Mean Arterial Pressure</i>
MC	Mukosakapillaren
MD2	Lymphozyten-Antigen-96-Bindungsprotein
MODS	<i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i>
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NADP	<i>Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat</i>
NCD	<i>Nonfunctional Capillary Density</i>
NF-κB	Nukleärer Transkriptionsfaktor kappa B
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OH	Hydroxyl-Radikal
PaO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PC	präkapilläre Sphinktere
PAGDEM	<i>Platelet Activation Dependent Granule External Membrane Protein</i>
q SOFA	<i>quick Sequential Organ Failure Assessment Score</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

## Abkürzungsverzeichnis

---

sCD14	<i>Soluble CD 14</i>
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SepNet	Kompetenz Netzwerk Sepsis
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SOFA	<i>Sequential (Sepsis-related) Organ Failure Assessment</i>
SREBP	<i>Sterol Response Element Binding Protein</i>
SREBP1	<i>Sterol Response Element Binding Protein 1</i>
SREBP2	<i>Sterol Response Element Binding Protein 2</i>
SRE-1	<i>Sterol Responsive Element</i>
STAT	Statine
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TLR 4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
V1-V4	Venolen 1-4
VLDL	<i>Very Low Density Lipoproteins</i>
VCAM-1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score
Tabelle 2	Lipoproteine

## 1 Einleitung

Der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Simvastatin wird zur Therapie von Fettstoffwechselstörungen eingesetzt und zählte im letzten Jahrzehnt zu den umsatzstärksten Medikamenten weltweit. Laut der *American Heart Association* leiden mehr als 30 Millionen Amerikaner an erhöhten Cholesterolverwerten, vermutet werden aber deutlich mehr [1]. Eine Studie aus Schweden zeigte schon 1994, dass es durch das Senken der Cholesterolverwerte zu einer Reduktion des kardialen Risikos kommt. Durch eine Langzeiteinnahme von Statinen konnte die Mortalität um bis zu 30% gesenkt werden [2].

Die koronare Herzerkrankung (KHK) ist nach wie vor die Nummer eins der Todesursachen in den USA. Statine sind dabei ein wesentlicher Bestandteil der KHK-Therapie [3]. Eine medikamentöse Therapie ist bei Hypercholesterinämie indiziert, wenn in Anbetracht des kardiovaskulären Risikoprofils eine Diät beziehungsweise körperliche Aktivität nicht mehr ausreichend ist [4]. Eine Studie von Lindgren et al. in Schweden zeigte, dass 68.000 Menschen auf 1.000.000 Einwohner hochgerechnet, in diesem Zusammenhang Simvastatin nehmen. Dies entspricht ungefähr einem Anteil von 80 % an den verschriebenen lipidsenkenden Medikamenten [5].

Es ist jedoch schon länger bekannt, dass Statine nicht nur den Cholesterinstoffwechsel beeinflussen, sondern es wird auch postuliert, dass ein möglicher Zusammenhang zwischen einer medikamentösen Fettstoffwechseltherapie und einer geringeren Mortalität bei einer Sepsis besteht. Hackam et al. fasste die Ergebnisse einer Kohortenstudie [6] zusammen, bei der zwischen 1997 und 2002 über 141.000 Patienten eingeschlossen wurden. Er kam zu dem Ergebnis, dass Patienten unter laufender Statintherapie seltener an einer Sepsis erkranken als ohne eine solche Therapie. In der Literatur gab es im Bereich der Grundlagenforschung mehrere ermutigende Ergebnisse, die die Hoffnung wecken mit Statinen den Sepsisverlauf günstig zu beeinflussen [7–10]. Ziel sollte es sein diesen Zusammenhang aufzugreifen und zu versuchen in den klinischen Alltag zu integrieren.

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Sepsis-Geschichte

Das Krankheitsbild der Sepsis kann auf eine sehr lange Geschichte zurückblicken. Hippokrates beschrieb bereits vor über 2000 Jahren einen Krankheitsverlauf mit potenziell fatalem Ausgang: „Wenn der Körper innerlich heiß und außen kalt ist, dann verläuft die Erkrankung tödlich.“ Diese vage Darstellung konnte sich bis zum Anfang des 20. Jahrhunderts halten, als der Deutsche Hugo Schottmüller (1867-1936) 1914 den Grundstein für eine moderne Sepsisdefinition legte. Seiner Aussage: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“, gingen jedoch einige unabhängige Entdeckungen voraus. Ignaz Semmelweis (1818-1865) beobachtete, dass auf der gynäkologischen Station kleine Leichenteile, die versehentlich bei Untersuchungen auf die entbundenen Frauen übertragen wurden, die Ursache für das Kindbettfieber waren [11]. Durch eine Händedesinfektion konnte er die Sterblichkeit drastisch vermindern. Nach der Entdeckung Pasteurs (1822-1895), dass Bakterien für den Zustand der Fäulnis im Körper verantwortlich sind, war es Joseph Lister (1827-1912), der diese Erkenntnisse in seiner chirurgischen Abteilung zur Etablierung eines antiseptischen Verfahrens nutzte [12, 13].

Es dauerte weitere 75 Jahre bis Roger C. Bone (Abb.1) eine noch genauere Definition bezüglich der Ätiologie und der Pathogenese der Sepsis veröffentlichte. 1989 beschrieb er die Sepsis mit den Worten:

„Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“.



Abb.1: Roger C. Bone (Quelle: Homepage Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V.)

Um die Krankheit frühzeitig zu erkennen und eine optimale Therapie durchführen zu können, mussten erst einheitliche Definitionen der Sepsis und der mit ihr verbundenen Spät komplikationen festgelegt werden. Dies geschah unter dem Vorsitz von Bone im Rahmen einer Konsensuskonferenz des *American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine* [11].

Trotz dieses langen historischen Verlaufs und einigen bahnbrechenden Entdeckungen handelt es sich weiterhin um ein schwerwiegendes Krankheitsbild, welches nach wie vor eine große Rolle auf den Intensivstationen spielt.

### 2.2 Epidemiologie

Im Jahr 2005 wurden die Ergebnisse einer Untersuchung des Kompetenz Netzwerkes Sepsis (SepNet), bezüglich der Prävalenz einer schweren Sepsis, sowie eines septischen Schocks in Deutschland vorgestellt. Die Daten wurden an Hand von Stichproben auf verschiedenen Intensivstationen, stellvertretend für alle Krankenhäuser in Deutschland ermittelt. Dabei kam man zu dem Ergebnis, dass die Sepsis mittlerweile die dritthäufigste Todesursache in Deutschland ist. Die Inzidenz für eine Sepsis wurde mit ca. 79.000 Fällen (116 auf 100.000 Einwohner) und die einer schweren Sepsis, sowie des septischen Schocks mit 75.000 Fällen (110 auf 100.000 Einwohner) angegeben. Pro Jahr werden 60.000 Todesfälle registriert [14–17].

Betrachtet man die aktuelle Altersstruktur der Bevölkerung, zeigt sich ein zunehmender Anteil älterer Menschen. Die steigende Lebenserwartung bringt auch eine größere Zahl an Begleiterkrankungen mit sich. Durch diese zwei Faktoren wird eine steigende Inzidenz der Sepsis mitbedingt [18]. Der medizinische Fortschritt erlaubt heutzutage wesentlich größere operative Eingriffe im hohen Alter mit dem Risiko postoperativer Komplikationen.

Durch die Sepsis werden jährlich enorme Therapiekosten verursacht. Eine Arbeit von Moerer et al. aus dem Jahr 2002 konnte zeigen, dass die intensivmedizinische Therapie eines Patienten mit schwerer Sepsis in Deutschland ca. 25.000 Euro kostet. Bei einer durchschnittlichen Liegezeit von 16,6 Tagen sind das über 1000 Euro pro Tag und somit ein wesentlich höherer Betrag, als der Tagessatz von 851 Euro, den die Krankenkassen den Kliniken bezahlen [19]. Dabei machen Personalkosten ungefähr 1/3 aus. Auch eine neuere Arbeit der Gruppe um Moerer et al. aus dem Jahr 2009 stellte dar, dass die Kosten weiterhin bei septischen Patienten deutlich höher liegen, als bei Patienten ohne septisches Geschehen ( $1076 \pm 421$  vs.  $744 \pm 255$  Euro). Wird das Ganze auf das Jahr hochgerechnet, verursacht die Sepsis direkte Kosten von ca. 1,1–2,45 Milliarden Euro. Das entspricht ca. 1/3 des Budgets, welches den Intensivstationen in Deutschland zur Verfügung steht. Im Anschluss daran folgen noch Kosten für Rehabilitation, Arbeitsausfall und Frühberentung. Zusammen ergibt das eine Summe von ca. 2,5–3,5 Milliarden Euro [20].

Um diese enormen Kosten in den Griff zu bekommen, ist es wichtig, effektivere Therapien zu entwickeln.

## Theoretische Grundlagen

---

Die aktuellste Studie in Bezug auf die Sepsisdaten in deutschen Krankenhäusern zeigte, dass es unter den in der Studie einbezogenen 3.877 Patienten auf Intensivstationen eine Prävalenz für eine Sepsis von 12,4 % und für eine schwere Sepsis mit septischem Schock von 11,0 % gab. Dabei konnte wieder eine hohe Mortalitätsrate von bis zu 55,2 % bestätigt werden. Die meisten Infektionen manifestierten sich im Respirationstrakt (62,9 %). An zweiter Stelle folgte das Abdomen mit 25,3 %. Auch hier lag die Mortalitätsrate bei 40-56 % [15].

### 2.3 Definitionen

Es sind exakte Krankheitsdefinitionen notwendig, um auf dem Gebiet der Sepsis klinisch forschen zu können und Therapien vergleichbar zu machen. Es wurden die Begriffe "*systemic inflammatory response syndrome*" (SIRS), Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock sowie das "*multiple organ dysfunction syndrome*" (MODS) festgelegt.

Ein SIRS ist eine allgemeine Entzündungsreaktion von systemischem Ausmaß. Von einem SIRS spricht man, wenn mindestens zwei der nachfolgenden vier Kriterien erfüllt sind:

- a) die Körpertemperatur liegt bei  $> 38^{\circ}\text{C}$  (Fieber) oder  $< 36^{\circ}\text{C}$  (Hypothermie)
- b) die Herzfrequenz ist  $> 90$  Schläge pro Minute (Tachykardie)
- c) die Atemfrequenz liegt bei  $> 20$  pro Minute (Tachypnoe) oder der  $\text{PaCO}_2$  ist  $< 32$  mmHg (Hyperventilation)
- d) die Anzahl der weißen Blutzellen beträgt  $> 12.000 /\text{mm}^3$ , (Leukozytose) bzw.  $< 4000 /\text{mm}^3$ , (Leukopenie) oder es liegen mehr als 10 % unreife neutrophile Zellen im Blutbild vor.

Liegen die Kriterien für ein SIRS vor und wird zusätzlich eine Infektion im Körper mikrobiologisch gesichert bzw. klinisch diagnostiziert, spricht man von einer Sepsis. Diese Definitionen wurden durch das Internationale Sepsis-Forum im Jahre 2001



## Theoretische Grundlagen

---

bestätigt. Wird ein weiteres der folgenden Kriterien nachgewiesen, spricht man von einer schweren Sepsis [21, 22]:

- a) Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium
- b) Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30 % innerhalb von 24 h oder Thrombozytenzahl  $\leq 100.000 /\text{mm}^3$ . Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein.
- c) Arterielle Hypoxämie: Sauerstoffpartialdruck ( $\text{paO}_2$ )  $\leq 10 \text{ kPa}$  ( $\leq 75 \text{ mmHg}$ ) unter Raumluft oder ein  $\text{paO}_2 / \text{FiO}_2$ -Verhältnis von  $\leq 33 \text{ kPa}$  ( $\leq 250 \text{ mmHg}$ ) unter Sauerstoffgabe. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein.
- d) Renale Dysfunktion: Diurese  $\leq 0,5 \text{ ml/kg/h}$  für wenigstens 2 h trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins  $> 2$ -fach oberhalb des lokal üblichen Referenzbereichs
- e) Metabolische Azidose: "base excess"  $\leq -5 \text{ mmol/l}$  oder Laktatkonzentration  $> 1,5$ -fach oberhalb des lokal üblichen Referenzbereichs

Besteht bei dem Patienten trotz adäquater Volumentherapie eine Hypotension, die Vasopressoreinsatz erfordert und keine andere Ursache hat, spricht man von einem septischen Schock. Kommt es bei mehreren Organen gleichzeitig zu einer Organdysfunktion, spricht man von einem "multiple organ dysfunction syndrome" (MODS). Ein MODS wird bei ca. 30 % der Sepsis-Patienten beobachtet [23].

Da dieses Thema weiterhin eine große Rolle spielt wurde im Januar 2014 eine Task-Force aus Intensivmedizinern, Infektiologen, Chirurgen und Pulmonologen gebildet, um die bisher geltenden Definitionen zu reevaluieren. Aus Sicht der beiden führenden Fachgesellschaften (der *European Society of Intensive Care Medicine* sowie der *Society of Critical Care Medicine*) war eine Überarbeitung der Sepsisdefinition dringend notwendig geworden, da die Kriterien teilweise zu unspezifisch waren. Das Ergebnis wurde schließlich im Jahr 2016 auf dem Jahreskongress der *Society of Critical Care Medicine* in Orlando vorgestellt.

## Theoretische Grundlagen

---

Vor allem die SIRS-Kriterien konnten zum einen durch nicht infektiöse Trigger erfüllt werden bzw. bei kritisch kranken Patienten komplett fehlen. Eine Studie um die Gruppe von Kaukonen et al. hatte retrospektiv die Daten von über 1.000.000 Patienten untersucht und darauf geschaut ob bei Patienten mit einer Infektion und einem Organversagen auch die SIRS Kriterien erfüllt waren und somit eine schwere Sepsis per definitionem vorlag oder nicht.

Dabei stellten sie fest, dass einer von acht Patienten mit bestätigter Infektion und Organversagen nicht die zwei der verlangten SIRS Kriterien erfüllte. Diese SIRS negativen Patienten wiesen eine ähnliche Mortalität auf wie Patienten mit positiven SIRS Zeichen [24].

Eine Gruppe um Vincent et al. publizierte 2013, dass nahezu 90 % aller Patienten auf einer Intensivstation die Kriterien eines SIRS erfüllen. Diese Kriterien konnten auch durch Trauma, Verbrennungen und Pankreatitis entstehen. Somit mussten diese überarbeitet werden [25]. In drei Etappen sollte nun eine Reevaluation der bisherigen Definitionen erfolgen. An erster Stelle stand eine Metaanalyse bisheriger Studien zum Thema septischer Schock. Als Zweites kam es zu einer Delphi-Studie an Hand der Ergebnisse der Metanalyse und zum Schluss erfolgte noch eine Kohortenstudie mit mehr als 1,3 Millionen elektronischer Patientendaten [26].

Letztendlich entschloss sich die Kommission diese Definition zu streichen. Eine Vorhersage für eine lebensbedrohliche Lage durch die veralteten Kriterien war nicht mehr gegeben. Durch zusätzliche Erkenntnisse der Pathophysiologie einer Sepsis wurde auch ein Update der Sepsis und des septischen Schocks notwendig um eine Differenzierung zu einer reinen Infektion zu ermöglichen. Durch die Aufnahme des SOFA (*Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment Score*) und LODS (*Logistic Organ Dysfunction System*) Score`s war im Vergleich zu den SIRS Kriterien eine bessere Vorhersage möglich [26].

Dieser so genannte SOFA-Score ermöglicht es an Hand von mehreren Parametern ein mögliches Organversagen zu detektieren. Genau diese Form der Erkrankung die im Körper als Reaktion auf eine Infektion auftreten kann, sollte frühzeitig erkannt werden um dementsprechend handeln zu können. Da der SOFA Score weit verbreitet ist, entschloss man sich diesen als Prädiktor einer

## Theoretische Grundlagen

Organdysfunktion zu nehmen (Tab.1). Bei Patienten ohne eine vorbekannte Organdysfunktion, kann von einem Score von null ausgegangen werden. Patienten mit einem Wert über zwei haben ein um 10 % erhöhtes Mortalitätsrisiko bei vermuteter Infektion. Im Vergleich dazu steigt die Mortalitätsrate bei ST-Strecken-Elevation nur um 8,1 % [27].

Tabelle 1: *Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score* [28]

	0	1	Score		3	4
			2			
<b>Respiration System</b>						
PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> , mm Hg (kPa)	>400 (53.3)	<400 (53.3)	<300 (40)	<200 (26.7) with respiratory support	<100 (13.3) with respiratory support	
<b>Coagulation</b>						
Platelets, ×10 <sup>3</sup> /μL	≥150	<150	<100	<50	<20	
<b>Liver</b>						
Billirubin,mg/dl, (μmol/L)	<1.2 (20)	1.2–1.9 (20–32)	2.0–5.9 (33–101)	6.0–11.9 (102–204)	>12.0 (204)	
<b>Cardiovascular</b>	MAP ≥70 mm Hg	MAP <70 mm Hg	Dopamine <5 or  Dobutamine (any dose)	Dopamine 5.1–15	Dopamine >15 or Epinephrine >0.1 or Norepinephrine >0.1 <sup>a</sup>	
<b>Central nervous system</b>						
Glasgow Coma Scale Score <sup>b</sup>	15	13–14	10–12	6–9	<6	
<b>Renal</b>						
Creatinine, mg/dL (μmol/L)	<1.2 (110)	1.2–1.9 (110–170)	2.0–3.4 (171–299)	3.5–4.9 (300–440)	>5.0 (440)	
Urine output, mL/d				<500	<200	

<sup>a</sup>Catecholamine doses are given as μg/kg/min for at least 1 hour.

<sup>b</sup>Glasgow Coma Scale scores range from 3–15; higher score indicates better neurological function.

## Theoretische Grundlagen

---

Somit war es möglich durch Erfassung der Parameter aller Organsysteme, die durch eine Sepsis betroffen sein können, die Schwere und eine mögliche erhöhte Sterblichkeit zu detektieren.

Um auch außerhalb einer Intensivstation: in einer Notaufnahme, auf peripheren Stationen bzw. auch im prähospitalen Bereich handeln und eine bedrohliche Infektion erkennen zu können, wurde der q SOFA eingeführt. Dabei war es wichtig ohne große technische Hilfsmittel und ohne Laborparameter, eine schnelle Einschätzung, abgeben zu können um frühzeitig mit einer Therapie beginnen bzw. diese erweitern zu können. Auch eine mögliche Intensivierung der Überwachungsmaßnahmen kann somit frühzeitig umgesetzt werden. Hierfür müssen drei Parameter erhoben werden.

- Atemfrequenz  $\geq 22$  /min
- Verändertes Bewusstsein (GCS)  $< 15$
- Systolischer Blutdruck  $< 100$  mmHg

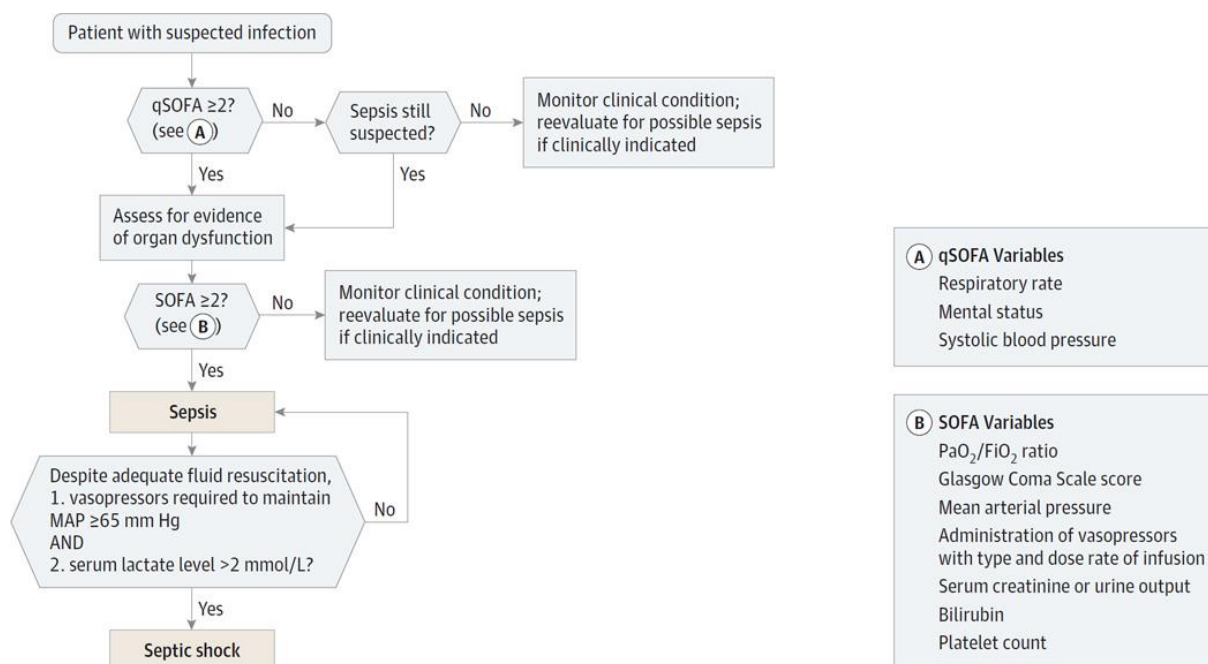
Jeder zutreffende Parameter wird mit einem Punkt bewertet. Ab einer Punktzahl von zwei ist die Sterblichkeit dreifach und ab einer Punktzahl von drei, 14fach erhöht. Als Definition einer Sepsis werden nun die bestätigte oder vermutete Infektion sowie ein Anstieg des SOFA Scores auf mehr als zwei Punkte-eingeführt. Für den septischen Schock gilt weiterhin die Sepsisdefinition sowie die nachfolgenden Punkte.

- Vasopressorgabe um bei persistierender Hypotonie einen mittleren arteriellen Druck  $> 65$  mmHg aufrecht zu erhalten
- Einen Serumlaktatspiegel  $> 2$  mmol/l ( $> 18$  mg/dl) trotz adäquater Volumensubstitution

Bei dieser vorliegenden zirkulatorischen, zellulären/metabolischen Störung steigt die Krankenhaussterblichkeit auf über 40 % [28].

Die nachfolgende Grafik (Abb.3). zeigt wie die einzelnen Kriterien in einander greifen. Daraus ist auch zu entnehmen, dass weder der qSOFA noch der SOFA Score alleine als Definition einer Sepsis zählen.

# Theoretische Grundlagen



MAP, Mittlerer arterieller Druck

Abb.2: Operationalization of Clinical Criteria Identifying Patients with Sepsis and Septic Shock [28]

Ein Vergleich konnte zeigen, dass bei Patienten auf einer Intensivstation eine Vorhersage an Hand des SOFA- oder LODS-Scores den SIRS-Kriterien bzw. dem qSOFA-Score überlegen ist. Bei Patienten außerhalb einer Intensivstation war die prädiktive Aussagekraft des qSOFA-Scores statistisch größer als die des SOFA-Scores bzw. die der SIRS-Kriterien [26].

## 2.4 Pathophysiologie

Die Sepsis ist definiert als die systemische Reaktion auf eine Infektion. Ursache einer Infektion sind pathogene Keime. Dabei lösen z.B. Endotoxine (gramnegative Bakterien), Peptidoglykane (gramnegative und grampositive Bakterien), Lipoteichonsäuren (grampositive Bakterien) und Mannane (Pilze) die systemisch-entzündliche Reaktion (SIRS) des Körpers aus. Die EPIC II (*Extended Prevalence of Infection in Intensive Care*) Studie konnte an Hand von mehr als 13.000

## Theoretische Grundlagen

Patientendaten die unterschiedlichsten Erreger für eine Sepsiserkrankung nachweisen. Bei 70 % der Patienten mit einer Infektion konnten auch mikrobiologische Erreger nachgewiesen werden. Dabei waren 47 % der Erreger grampositiv, 62 % gramnegativ, und 19 % Pilze. Bei den Patienten mit Erregernachweis waren der häufigste grampositive Keim *Staphylococcus aureus* (20 %); bei den gramnegativen Bakterien waren es *Pseudomonas species* (20 %) und *Escherichia coli* (16 %) [29].

### 2.4.1 Endotoxin

Endotoxine bilden zusammen mit Phospholipiden und Proteinen die äußerste Membran gramnegativer Bakterien. Der Aufbau der Endotoxine beinhaltet zwei Teile. Einen variablen Teil, einen Polysaccharidteil mit einer Kernregion (Core) und einer O-spezifischen Kette, sowie einen hydrophoben Anteil, das Lipid A (Abb.3). Hierin ist die toxische Wirkung des Endotoxins enthalten. Chemisch gesehen sind Lipopolysaccharide (LPS) die Ursache für deren immunstimulatorische Wirkung. Zu Beginn einer Infektion kommt es zu Fieber, einer veränderten Leukozytenzahl und einem verringerten Blutdruck. Je länger sich das Endotoxin im Körper befindet, können diese anfänglichen Symptome zu einem Schockzustand mit Organversagen führen.

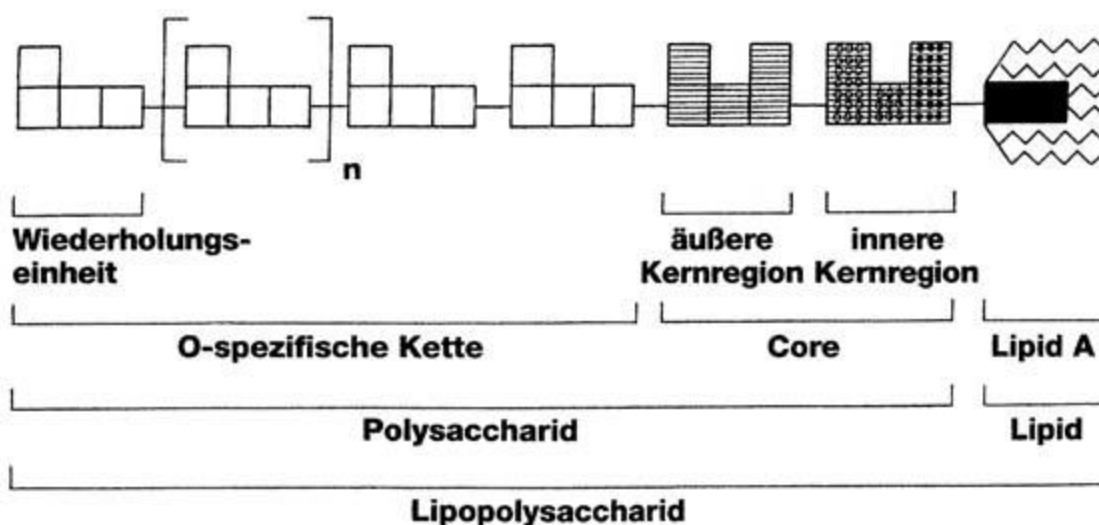


Abb.3: Schematische Struktur eines Lipopolysaccharids (Salmonella) [30]

## Theoretische Grundlagen

---

Gelangt LPS in den Blutkreislauf, kommt es zu einer Bindung an das LPS-Binding Protein (LBP) und an das lösliche CD14 (sCD14) Molekül. Dabei ist sCD14 in der Lage, eine Aktivierung CD 14 positiver Zellen zu verhindern. Das LBP sorgt zum einen für den Transport zu den CD14-Rezeptoren und zum anderen aber auch für eine entgiftende Wirkung durch den Transport zum High Density Lipoprotein (HDL) [31]. CD14-Rezeptoren sind auf der Membran der reifen myeloischen Zellen mit Hilfe von Glycosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) verankert. Das Endotoxin wird hierbei über das Lipid A an den Rezeptor gebunden. Da CD14 kein Transmembranprotein ist, benötigt es weitere Co-Rezeptoren, das MD2 und den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR 4). Lipid A bindet an diesen Komplex, um eine Signaltransduktion zu ermöglichen [32, 33].

Nach der Aktivierung der Oberflächenrezeptoren wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, an deren Ende die inhibitorische Untereinheit I $\kappa$ B (Inhibitory protein  $\kappa$ B) des nukleären Transkriptionsfaktors kappa B (NF- $\kappa$ B) steht. Wird diese Untereinheit im Rahmen einer Entzündung phosphoryliert, wird die Genexpression der inflammatorischen Zytokine und Chemokine durch NF- $\kappa$ B aktiviert [34, 35].

Bei dem Ablauf der Inflammationskaskade werden verschiedene Mediatorsubstanzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlicher Reihenfolge freigesetzt. Zu den proinflammatorischen Zytokinen gehören der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 (IL-1), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), IL-12, IL-18, IL-8, IL-6 und der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF). Dabei rufen diese Mediatoren durch ihre Einwirkung auf neutrophile Granulozyten, Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Thrombozyten die inflammatorische Reaktion hervor. Diese Aktivierung führt zu einer Mobilisierung von Thrombozyten, Komplement-, Gerinnungs- und des Kinin-Bradykininsystem. Zeitgleich werden auch antiinflammatorische Reaktionskaskaden angestoßen mit der Freisetzung von "transforming growth factor  $\beta$ " TGF- $\beta$ , IL-4, IL-10, IL-13 [36].

### 2.4.2 Leukozyten-Endothelinteraktionen

Während einer Entzündungsreaktion kommt es zur Margination von Leukozyten aus dem schnell fließenden zentralen Blutstrom in den langsam strömenden Randbereich. Im Anschluss daran folgen Interaktionen mit dem Endothel.

Eine wichtige Funktion spielen dabei die Selektine. Ihr Aufbau besteht aus drei Teilen, wobei die transmembranöse sowie die zytoplasmatische Domäne bei jedem Selektintyp gleich ist. Eine Unterscheidung erfolgt nur an Hand des unterschiedlich langen extrazellulären Abschnittes [37].

Das P-Selektin (*Platelet Activation Dependent Granule External Membrane Protein - PAGDEM*) wird dauerhaft auf dem Endothel exprimiert und zuvor in den Weibel-Palade-Körpern gebildet. Es besitzt den längsten extrazellulären Anteil und ist somit auch das größte Molekül. Im Gegensatz dazu ist das L-Selektin, (*Lectin Adhesion Molecule - LECAM-1*), welches auf Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, das kleinste Molekül. Bevor sich das E-Selektin (*Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule - ELAM-1*), auf den endothelialen Zellen ausbildet, muss zuvor erst eine Aktivierung durch Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 erfolgen. Dabei erreicht E-Selektin etwa vier Stunden nach einer Stimulation durch LPS seine maximale Konzentration. Die Selektine treten mit entsprechenden Liganden in Wechselwirkung und führen zu kurzfristigen Bindungen, wodurch das Phänomen des Leukozytenrollings am Endothel entsteht (Abb.4).



## Theoretische Grundlagen

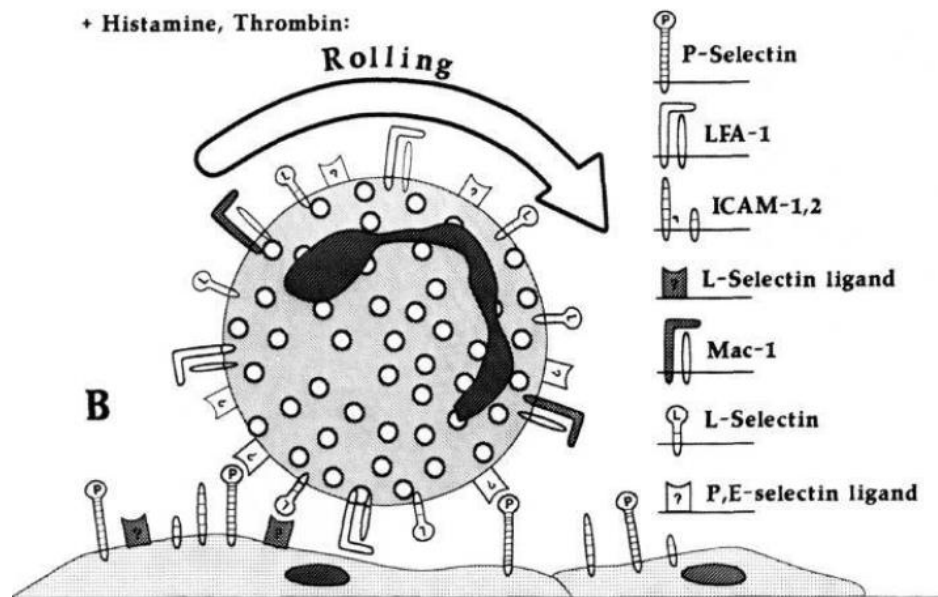


Abb.4: Temporär adhärenente Leukozyten-Endothelinteraktion (Leukozytenrolling) [38]

Erst durch eine Entzündungsreaktion werden die endothelialen Zellen aktiviert, um vermehrt Adhäsionsmoleküle und Chemokine an der Oberfläche zu exprimieren, damit sich zirkulierende Leukozyten an die Gefäßwände binden [39]. Durch die temporäre Interaktion mit dem Endothel kommen die Leukozyten mit chemotaktischen Faktoren in Berührung, die dafür sorgen, dass die inaktive Konformation sogenannter Integrine in eine bindungsfähige Konformation umgewandelt wird. Dadurch kommt es zu einer festen Bindung mit den endothelialen Adhäsionsmolekülen. Das chemotaktische Signal wird dabei G-Protein gekoppelt auf die Leukozyten übertragen [40]. Bei den Integrinen handelt es sich um Transmembranproteine. Die Expression der Integrine ist abhängig von einer Stimulation durch  $\text{TNF-}\alpha$  und einer vorherigen Adhäsion an E-Selektin [38, 41, 42]. Für eine permanent adhärenente Endothelinteraktion, das Leukozytensticking, (Abb.5) sind endotheliale Adhäsionsmoleküle wie das *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1), und das *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1) von Bedeutung [43].

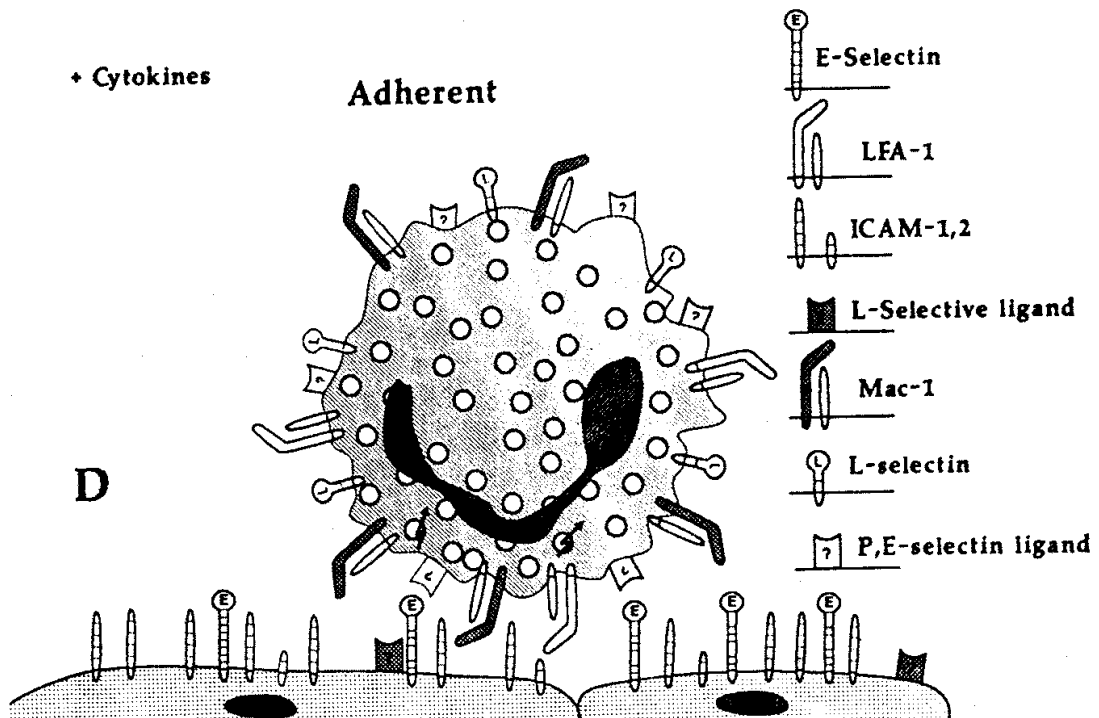


Abb.5: Permanent adhärenente Endothelinteraktion (Leukozytensticking) [38]

Nun folgt der aktive Auswanderungsprozess, die sogenannte Leukozytendiapedese. Es kommt zur Abflachung der weißen Blutkörperchen auf dem Endothel, die schließlich zwischen kontrahierenden Endothelzellen hindurchwandern und somit aktiv ins Gewebe einwandern können. Dort angekommen begibt sich der Leukozyt zum Ort der Schädigung. Hierbei folgt er dem Ort der höchsten Konzentration von Chemokinen (Chemotaxis).

### 2.4.3 Kapillarperfusion

Aufgrund des hohen Anteils an glatter Gefäßwandmuskulatur sind die Arteriolen in der Lage ihren Durchmesser durch Kontraktion zu verändern. Somit kann die Durchblutung der Kapillaren dem Nährstoffbedarf des Körpers angepasst werden. Je größer der Bedarf, desto größer die Anzahl der perfundierten Kapillaren [44]. Um den verschiedenen Aufgaben gerecht zu werden, stellt die Endothelzelle im menschlichen

Körper eine selektive Barriere dar. Eine Glykokalyx aus Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen hilft dabei das Blut vom Gewebe zu trennen. Sie befindet sich am vaskulären Endothel. Das Endothel ist in der Lage, auf viele Abläufe Einfluss zu nehmen. Dazu gehört der Hämatokrit, die Fließgeschwindigkeit, der Sauerstofftransport bzw. das Sauerstoffangebot, die Gerinnung, der Abtransport von Stoffwechselendprodukten, Wärmetransport sowie die Regulation der Leukozytenadhäsion und –migration. Kommt es nun zu einer Entzündung, wird das Endothel durch proinflammatorische Zytokine, Scherkräfte bzw. starke Schwankungen des  $paO_2$  Wertes aktiviert. Durch eine Endothelschädigung kann es zu Ödemen mit intravasalem Flüssigkeitsmangel, Thrombosen und erhöhter Viskosität kommen. Außerdem verlieren die glatten Muskelzellen ihren Tonus und reagieren nicht mehr auf Adrenalin. Dies führt zu einer permanenten Vasodilatation und folglich zu einem Stopp der Durchblutung. Somit spielt das Endothel eine entscheidende Rolle im Ablauf einer Entzündungsreaktion [45].

### 2.5 Sepsismodell

Bei der Untersuchung neuer Therapieansätze ist es wichtig die pathophysiologischen Mechanismen der Sepsis zu verstehen. Um den Zustand einer Sepsis zu initiieren wurden spezielle Tiermodelle entwickelt. Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse aus experimentellen Versuchen nur bedingt auf die Klinik beim Menschen übertragen werden können [46]. Grund dafür ist die Schwierigkeit den pathophysiologischen Verlauf einer Sepsis nachahmen zu können. Auch gibt es unterschiedliche Reaktionen auf eine Infektion zwischen Mensch und Tier [47]. Um dieses Problem so gut es geht lösen zu können wurden verschiedene Ansätze entworfen. Die Wirkung der einzelnen Modelle ist unterschiedlich und wird in der Literatur heftig diskutiert. Alle Modelle haben Vor- und Nachteile [48, 46].

Es gibt die Möglichkeit der exogenen Applikation von Toxinen oder eine Veränderung der Kolonpermeabilität des Tieres zu verursachen, was eine bakterielle Translokation ermöglicht.

## Theoretische Grundlagen

---

Bei einer Sepsis kann die Dosis, das Toxin und auch der Ausbreitungsweg variieren. Die sogenannten Peritonitismodelle gelten als polymikrobielles Sepsismodell [49]. Eine Übertragung auf die Klinik ist hierbei eher möglich, da sich die Sepsis über einen längeren Zeitraum entwickelt und es zu einer ähnlichen Entwicklung von hämodynamischen und metabolischen Veränderungen, im Rahmen der unterschiedlichen Entzündungsphasen, kommt. Das Ausmaß der Darmleckage ist allerdings schwer zu kontrollieren und somit kann die Schwere der induzierten Sepsis sehr unterschiedlich ausfallen.

Es gibt das *Cecum Ligation and Puncture* (CLP)-induzierte Sepsismodell sowie das *Colon-Ascendens-Stent-Peritonitis* (CASP)-induzierte Sepsismodell [49]. Bei beiden Peritonitis Modellen kommt es durch die Freisetzung von Fäkalien in die Bauchhöhle zur Ausbildung einer akuten Entzündungsreaktion.

Bei dem CLP handelt es sich für viele Forscher um den entscheidenden präklinischen Test für neue Therapieansätze der Sepsis. Die Technik umfasst die Mittellinienlaparotomie, eine Mobilisation und Ligatur des Caecums distal der Ileozökalklappe und die Punktion des ligierten Caecums [47, 50–52]. Dadurch nähert man sich der Komplexität der Erkrankung am besten an, da es zu einem Gewebetrauma, Bildung von Nekrose durch den chirurgischen Eingriff sowie Infektion durch den Austritt der peritonealen mikrobiellen Flora kommt. Die Perforation des Caecums führt zu einer polymikrobiellen Peritonitis, gefolgt von einer Translokation von Bakterien in das Blut. Die Bakteriämie löst eine Entzündungsreaktion aus, die zu hämodynamischer Instabilität, septischem Schock, Multiorganversagen und schließlich zum Tod führt [53]. Es lässt sich am ehesten mit einer intraabdominellen Abszessformation vergleichen.

Das zweite Modell, die CASP, ist vergleichbar mit einer Darmperforation bzw. Anastomoseninsuffizienz. Dabei wird ein Stent in das Colon ascendens implantiert, um eine Verbindung zwischen Intestinum und Bauchhöhle zu schaffen. Folge ist ein kontinuierlicher Übertritt von Bakterien der natürlichen Darmflora ins umliegende Gewebe und die Induktion einer diffusen Peritonitis [47]. Durch die eingelegte Stentgröße soll eine ähnliche Menge abgegeben werden um ein vergleichbares

## Theoretische Grundlagen

---

Ergebnis zu erzielen. Die Schwere einer Sepsis kann durch die Größe des Durchmessers des eingelegten Stents beeinflusst werden [49, 50]. Bei den polymikrobiellen Peritonitismodellen kommt es im Gegensatz zu einem LPS Modell zu einem verzögerten Anstieg der Bakteriämie.

Bei der Applikation eines Endotoxins wird ein Lipopolysaccharid (LPS) in das Blut oder Peritoneum verabreicht. Dabei handelt es sich um Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien. Diese werden als einmaliger Bolus injiziert. Vorhandene Daten legen nahe, dass LPS verwendet werden kann, um pathophysiologische Prozesse der Endotoxinämie des SIRS bzw. des endotoxischen Schocks untersuchen zu können [54, 55, 50]. Die Toxingabe induziert eine schnelle starke Entzündungsreaktion, die die Aktivierung des angeborenen Immunsystems beeinflusst [56].

Das LPS-Modell der systemischen Entzündung erweist sich als geeignet, da dieses Verfahren technisch einfach durchzuführen ist und eine hohe Reproduzierbarkeit ermöglicht. Durch die genaue quantitative Bestimmung der Dosis lässt sich eine gute zeitliche Vorhersage der Entzündungsreaktion erzielen. Mithilfe unterschiedlicher Toxindosen können verschieden starke Infektionen auftreten. Dadurch lässt sich ein gewisser Versuchsstandard etablieren. Aus diesem Grund entschieden wir uns für das LPS Modell.

Im Bereich der Sepsisforschung ist dieses Modell in der Literatur häufig beschrieben. Frühzeitig konnte eine Gruppe um Fink et al. Ergebnisse mit Nagetieren zusammenfassen [57]. Dabei konnten Sie zeigen, dass anhand der LPS Dosis eine relative Vorhersage der kardialen Reaktion möglich war. Eine niedrige LPS Dosis führte zu einem hyperdynamen Kreislaufgeschehen, vergleichbar mit dem Zustand einer kompensierten menschlichen Sepsis. Bei einer hohen LPS Dosis kommt es zu einem Absinken des kardialen Auswurfes und zu einem Anstieg des systemischen Gefäßwiderstandes. Im Hinblick auf eine kardiovaskuläre Reaktion nutzten es viele weitere Forschungsgruppen. Liu et al [58] applizierte Versuchstieren 15mg/kg/KG LPS und beobachtete dabei die Wirkung von Propofol auf die Nitrit Oxid Produktion in einer Sepsis. Giusti et al. [59] untersuchte die Simvastatinwirkung auf die Katecholamintherapie in der Sepsis. Dabei wurde den Versuchstieren 1,5mg/kg/KG LPS verabreicht.

### 2.6 Statine und Sepsis

In einigen retrospektiven Untersuchungen wurde festgestellt, dass Sepsispatienten, die im Vorfeld des Intensivaufenthaltes mit lipidsenkenden Medikamenten behandelt wurden, eine geringere Mortalität aufwiesen [7]. Andere Untersuchungen brachten jedoch keine eindeutigen Ergebnisse. Als mögliche Ursachen für einen protektiven Statineffekt wurden Veränderungen im Bereich des Fettstoffwechsels (Erhöhung der HDL-Konzentration, Erniedrigung der LDL-Konzentration) oder ein direkter (antiinflammatorischer) Einfluss des Medikamentes postuliert. Ein Hauptmechanismus in der Pathogenese der Sepsis ist die gestörte Mikrozirkulation. Daher war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, im Tierexperiment mittels Intravitalmikroskopie den Einfluss von Simvastatin auf die intestinale Mikrozirkulation bei experimenteller Sepsis zu untersuchen.

#### 2.6.1 Simvastatin

Simvastatin zählt zu den wirksamsten Medikamenten bei der Therapie einer Hypercholesterinämie. Ziel ist es, den erhöhten Cholesterinwert zu senken, um die Bildung von Arteriosklerose zu verhindern. Aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften ist es Simvastatin (Abb.6) möglich, die Zellmembran zu durchtreten. Um einer Herz-Kreislauf-Erkrankungen vorbeugen zu können, sind die Statine die am besten geeigneten Medikamente [60–62]. Sie sind sogenannte Cholesterin-Synthese-Enzymhemmer (CSE-Hemmer), eines der am stärksten regulierenden Enzyme im Körper, welches durch seine Regulationsmechanismen in der Lage ist, seine Aktivität um das fünfzigfache zu steigern mit der höchsten Aktivität nachts, bedingt durch den zirkadianen Rhythmus [63]. Der Name CSE-Hemmer beruht darauf, dass es das entscheidende Enzym der Cholesterinbiosynthese, die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) Reduktase, kompetitiv hemmt [64, 65].

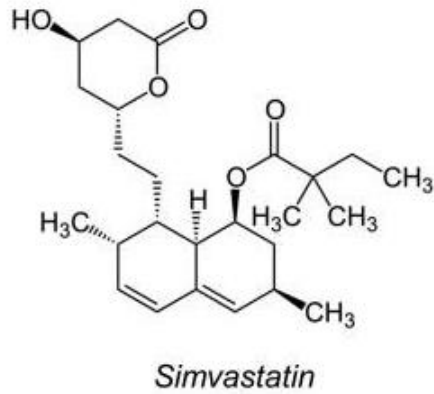


Abb.6: Strukturformel von Simvastatin ( C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub> ) [66]

### 2.6.2 Struktur der HMG-CoA-Reduktase

Simvastatin blockiert das Enzym indem es einen Teil der Bindestelle einnimmt und somit den Zugang des Substrats an das aktive Zentrum verhindert. Bei dem strukturellen Aufbau dieses Schrittmacherenzym handelt es sich um ein Tetramer. Jedes der einzelnen Monomere beinhaltet ein HMG-CoA- und ein NADP-Molekül (Abb.7).

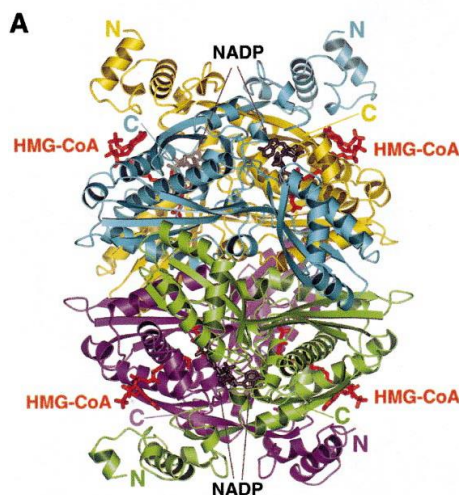


Abb.7: Struktur der HMG-CoA-Reduktase [64]

## Theoretische Grundlagen

---

Zusätzlich gibt es noch drei Domänen, die als N, L und S bezeichnet werden. Das HMG-CoA-Molekül bindet an die L-Domäne, während das NADP an die S-Domäne bindet. Das sogenannte aktive Zentrum wird durch eine „cis“-Schleife zwischen der L- und der S-Domäne des benachbarten Monomers gebildet. Bei der Substratbindung bindet der HMG-CoA-Teil an ein Monomer. Die Statine sind im strukturellen Aufbau dem HMG-CoA ähnlich, haben aber eine größere Affinität zur Bindestelle des Enzyms. Das Medikament setzt sich dabei in eine enge Nische, in der sich normalerweise das HMG befindet, woraufhin es zu einer Bindung mit der O5-Hydroxylgruppe der HMG-ähnlichen-Gruppe kommt, anstatt des Thioestersauerstoffatoms im HMG-CoA [65, 67, 68]. Da sich das Enzym am Anfang des Synthesewegs befindet, und einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt katalysiert, handelt es sich hierbei um ein Schrittmacherezym.

### 2.6.3 Cholesterinstoffwechsel

Der Mensch ist in der Lage, Cholesterin über die Nahrung aufzunehmen oder es in der Leber zu synthetisieren. Das Cholesterin ist dabei aufgrund seiner chemischen Eigenschaften im Blut nicht löslich. Damit es transportiert werden kann, muss es an Lipoproteine gebunden werden. Lipoproteine werden in unterschiedliche Klassen eingeteilt. Die Dichte, der Lipidanteil und die jeweiligen Apolipoproteine sind das Auswahlkriterium für die Gruppe (Tab.2). Man unterscheidet die „Very Low Density Lipoproteins“ (VLDL), die „Intermediate Density Lipoproteins“ (IDL), die „Low Density Lipoproteins“ (LDL) und die „High Density Lipoproteins“ (HDL) [69].



## Theoretische Grundlagen

---

Tabelle 2: Lipoproteine [70]

	Chylomikronen	VLDL	LDL	HDL
Dichte [g/ml]	0,93	0,93–1,006	1,019–1,063	1,063–1,21
Durchmesser [nm]	75–1200	30–80	18–25	5–12
Triacylglycerine [%]	86	55	6	4
Cholesterin [%] und Cholesterinester	5	19	50	19
Phospholipide [%]	7	18	22	34
Apolipoproteine [%] davon	2	8	22	42

Wir beschränken uns hier auf HDL und LDL. Das LDL wird in den peripheren Zellen aufgenommen und zerlegt, wodurch das Cholesterin frei und für seine metabolische Verwendung zugänglich wird. Die Aufnahme in die peripheren Zellen erfolgt dabei über den sogenannten LDL-Rezeptor. Die Rezeptorsynthese wird über einen Feedbackmechanismus des endogenen Cholesterinspiegels reguliert [71]. Eine Steigerung der Syntheserate wird über den Transkriptionsfaktor der Sterol Response Element Binding Protein (SREBP)-Familie vermittelt, die mit ihren beiden Vertretern SREBP1 und SREBP2 an die regulatorische Sequenz Sterol Responsive Element (SRE-1) der Zielgene binden. Diese beiden Proteine werden in Abhängigkeit des Sterolgehaltes aktiviert [72–74]. Der durch die Statinwirkung hervorgerufene Mangel an intrazellulärem Cholesterin führt außerdem zu einer vermehrten mRNA-Expression und einer verbesserten Bindungsaktivität von LDL-Rezeptoren in der Leber. Durch diese Möglichkeit der Regulation kann das Cholesterin in der Leber im Normbereich gehalten und das Cholesterin im Blut reduziert werden [75]. Dem HDL kommt nun die Bedeutung des rückführenden Transportes zu, indem das Cholesterin von den peripheren Geweben zur Leber transportiert wird. Durch seine zusätzlichen antioxidativen Eigenschaften wirkt sich das HDL positiv auf den Cholesterinspiegel aus [76, 77] und beugt somit einer kardiovaskulären Erkrankung vor.

### 2.6.4 Statinhaupteffekte

Die Reduktion des Cholesterinspiegels erfolgt auf zwei Arten. Zum einen wird die Synthese des Cholesterins in der Leber über die HMG-CoA-Reduktase gehemmt, zum anderen wird auch die Anzahl sowie die Aktivität der Low-Density-Lipoproteine (LDL) und der Containing Cholesterol (LDL-C) Rezeptoren auf den Leberzellen erhöht, wodurch das im Blut befindliche LDL, welches eine stark atherogene Eigenschaft besitzt, vermehrt aufgenommen wird [78]. Durch eine zusätzlich vermehrte Expression der Rezeptoren kann nun mehr LDL aus der Blutbahn aufgenommen und der Plasmaspiegel somit reduziert werden [61] [79–81].

Der Erfolg ist dabei auch abhängig von der eingesetzten Statindosis. Beim Gesamtcholesterin kann die Konzentration um 22 % bis 38 % gesenkt werden. Auch beim LDL ist eine ähnliche Reduktion von 27 % bis 48 % möglich, während es beim HDL zu einer Steigerung von 4 % bis 8 % kommen kann. Bei den Triglyceriden kommt es bei der niedrigsten Dosis zu einem Abfall von 10 % bis 15 % und bei der maximalen Dosis von 20 % bis 30 % [82–84]. Bei Simvastatin gibt es die Besonderheit, dass es auch beim Vorliegen der homozygoten familiären Hypercholesterinämie wirkt. Diese Patienten besitzen keine funktionellen LDL-Rezeptoren und trotzdem ist Simvastatin in der Lage die LDL Konzentration zu senken. Dies lässt sich dadurch erklären, dass noch andere Mechanismen für die Reduktion des Cholesterins zuständig sind. Eine Verminderung der VLDL-Synthese für die Gesamtreduktion des LDL scheint von untergeordneter Bedeutung auf den Gesamtmechanismus zu sein [85, 86].

In der Cholesterinbiosynthese gibt es viele Zwischenschritte, bei denen Metabolite entstehen [71]. Diese Produkte führen auch zu weiteren Aspekten der Statinwirkung, deren Effekte in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden.

### 2.6.5 Pleiotrope Wirkungen

Außer der Hauptwirkung auf die Cholesterinbiosynthese besitzt Simvastatin weitere, unabhängige Wirkungen sogenannte „*pleiotrope* Effekte“ (Abb.8). Der Begriff

## Theoretische Grundlagen

---

stammt aus dem Griechischen (*pleio* = voll; *trop* = Drehung, Wendung) und bedeutet in der Pharmakologie: verschiedene Wirkungen durch eine Substanz [87]. Die Ursache für diese zusätzlichen Wirkungen beruht auf dem Einfluss im Bereich des Intermediärstoffwechsels. Die Isoprenoide entstehen im Rahmen der Cholesterinbiosynthese als Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) und Farnesylpyrophosphat (FPP). Durch eine Reduktion dieser Substanzen kommt es zu Störungen der posttranslationalen Modifikationen unter anderem an G-Proteinen und den GTP-bindenden Proteinen Ras und Rho. Dies beeinflusst auch die Stickstoffmonoxidsynthase (NOS). Durch die Veränderung wird die mRNA der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase (eNOS) stabiler und führt, wie auch die LDL Erniedrigung, zu einer Verbesserung und Wiederherstellung endothelialer Funktionen. Als Folge wird die NO-Synthese gesteigert und somit eine bessere Verfügbarkeit gewährleistet [87–90]. Dabei kann NO durch Sauerstoffradikale in seiner Wirkung auf das Endothel beeinflusst werden. Diese bilden zusammen mit den Hydroxylradikalen (OH) und den Wasserstoffperoxiden (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Liegt nun ein Missverhältnis zwischen der ROS-Produktion und den antioxidativen Systemen des Körpers vor, spricht man von ``oxidativem Stress`` [91]. Statine besitzen zum einen durch eine Hemmung der ROS-Bildung, und durch das Absenken der Lipidkonzentration, antioxidative Effekte. Dabei wird die Aufnahme von oxidiertem LDL-reduziert, indem der Scavengerrezeptor der Makrophagen weniger gebildet wird [92].

Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass es auch zu einer Förderung der Stabilität arteriosklerotischer Plaques kommt, indem zum einen Statine eine Aktivierung der Makrophagen durch die Erniedrigung der Matrixmetalloproteinasen verhindern, zum anderen aber auch die Aufnahme sowie die Synthese des Cholesterols vermindern [80, 81, 87, 93–96].

Ein anderer pleiotroper Mechanismus erklärt die Hemmung der Leukozytenadhäsion und die Extravasion in Entzündungsgebieten. Hierbei spielt eine Bindung der Statine an das Integrin Lymphocyte Function-Associated antigen-1 (LFA-1) auf den weißen Blutzellen, sowie eine Reduktion der Synthese der Adhäsionsmoleküle (z.B. VCAM-1) eine entscheidende Rolle. Es konnte eine

## Theoretische Grundlagen

Hemmung von aktivierten und nichtaktivierten Monozyten an den Zellwänden gezeigt werden [97]. Im Rahmen der pleiotropen Wirkungen weisen Statine auch andere antiinflammatorische Effekte auf. Statine können als HMG-CoA-Reduktasehemmer die Plasmakonzentration des Akutphaseproteins (CRP) in Abhängigkeit des Medikaments bis zu 40 % senken [98, 99]. Auch die Zytokine der inflammatorischen und antiinflammatorischen Zellantwort werden von Statinen beeinflusst [88]. Abgesehen von der Präventionsfunktion gegenüber Herz-Gefäßerkrankungen konnte auch gezeigt werden, dass die Gabe von HMG-CoA-Reduktasehemmern nach einem akuten Koronarsyndrom innerhalb der nächsten zwei Jahre zu einer 19%igen Risikoreduktion führt, eine Sepsis zu bekommen [100, 71].

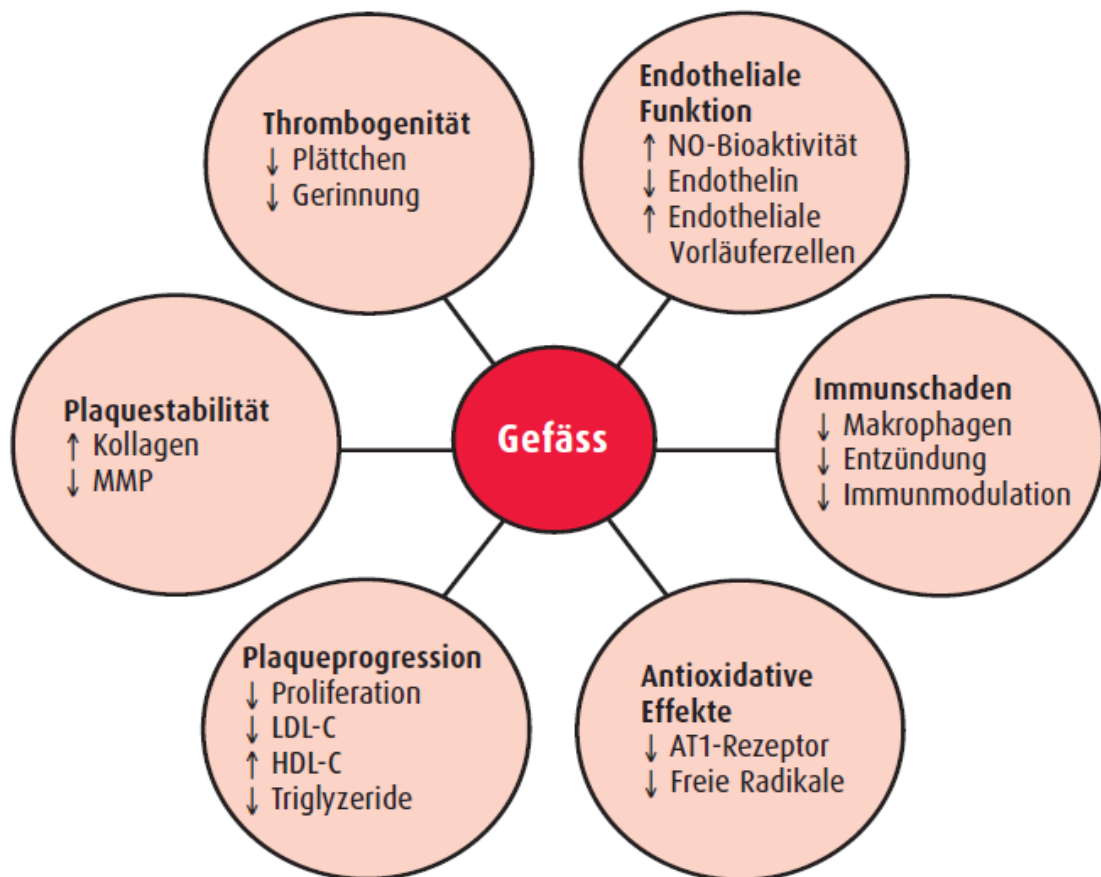


Abb.8: Pleiotrope Effekte der Statine auf Gefäße [101]

### 3 Fragestellung

In verschiedenen retrospektiven Studien wurde beobachtet, dass Sepsispatienten, die aufgrund einer vorbestehenden Hypercholesterinämie medikamentös mit Statinen behandelt waren, weniger Sepsiskomplikationen aufwiesen, als solche Patienten, die keine lipidsenkenden Medikamente erhielten.

Da die Mikrozirkulation von entscheidender Bedeutung bei der Sepsis ist, wurden in dieser Untersuchung die Effekte des Lipidsenkens Simvastatin auf die intestinale Mikrozirkulation bei experimenteller Endotoxinämie untersucht.

Dabei sollten die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. Hat das Medikament Simvastatin einen Einfluss auf die temporäre bzw. permanente Leukozytenadhärenz?
2. Führt der Einsatz von Simvastatin bei experimenteller Sepsis zu einer Verbesserung der funktionellen Kapillardichte?
3. Beeinflusst Simvastatin die Tachykardie und Hypotension bei experimenteller Sepsis?
4. Welchen Einfluss hat Simvastatin auf die Blutgase bei experimenteller Sepsis?

### 4 Material und Methoden

#### 4.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden 40 Ratten verwendet. Dabei handelte es sich um männliche Lewis-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wurden gemäß den geltenden Tierschutzgesetzen und nach Genehmigung durch das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei, Mecklenburg-Vorpommern (LALLF) behandelt. Das Gewicht der Tiere lag bei  $260\text{g}\pm 30\text{g}$ . Die Tiere wurden nach ihrer Anlieferung für mindestens eine Woche im Tierstall der Universität akklimatisiert. Die Versuchstiere befanden sich hierbei in einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus, die Luftfeuchtigkeit betrug 55-60 % und die Raumtemperatur  $25^{\circ}\text{C}$ . Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter.

#### 4.2 Allgemeiner Versuchsablauf

Nach Einleitung der Narkose erhielten die Tiere einen intraarteriellen sowie einen intravenösen Katheter und wurden tracheotomiert. Im Anschluss daran erfolgte gruppenabhängig die Gabe des LPS, oder Placebo (NaCl). In diesem Zusammenhang wurde auch die erste Blutentnahme (BE1) durchgeführt. 15 Minuten danach wurden die Gruppen randomisiert entweder mit Simvastatin oder Placebo (NaCl) behandelt. Es folgte eine 75-minütige Beobachtungsphase (Abb.9).

Als letzter Schritt zur Vorbereitung für die Intravitalmikroskopie wurde eine Laparotomie durchgeführt mit einer anschließenden Ruhephase von 15 Minuten. Nach der mikroskopischen Untersuchung wurde abschließend das zweite Mal Blut abgenommen (BE2).

1. Gruppe: NaCl + NaCl
2. Gruppe: NaCl + Simvastatin
3. Gruppe: LPS + NaCl
4. Gruppe: LPS + Simvastatin

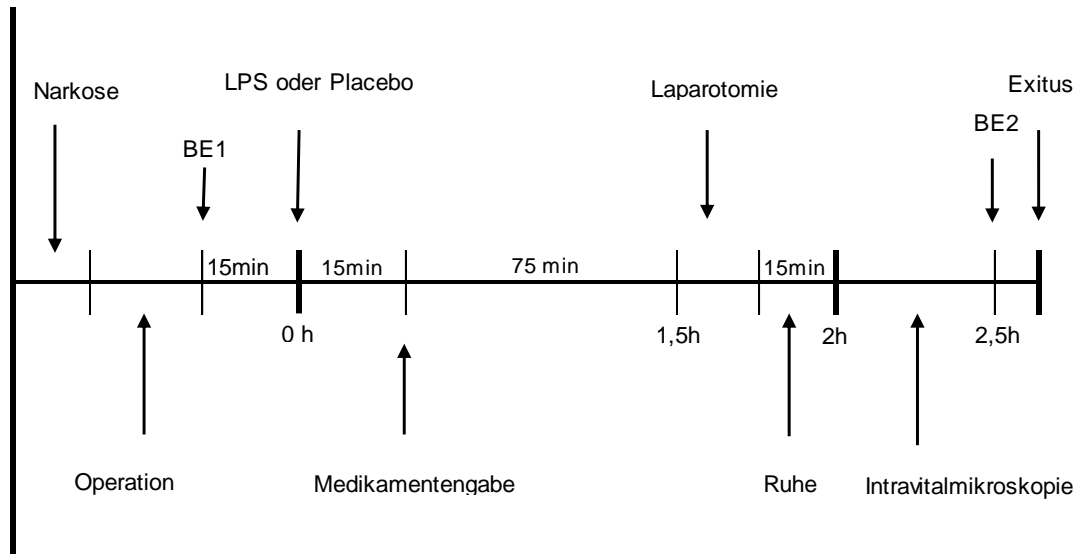


Abb.9: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

### 4.3 Anästhesie und operativer Ablauf

Zur Narkose wurde den Tieren 60 mg/kgKG (Körpergewicht) Pentobarbital (Pentobarbital Natrium, Fagron, Barsbüttl, Deutschland) intraperitoneal verabreicht. Nach 15 Minuten war ein ausreichend tiefes Anästhesieniveau erreicht. Dieses wurde mit Hilfe des Zwischenzehenreflexes überprüft. Die Tiere wurden auf einem Wärmekissen (TM 20, Beurer, Ulm, Deutschland) gelagert, um ein Auskühlen zu vermeiden.

Für die Operation wurden die Vorder- und Hinterläufe der Tiere mit Leukoplast (Leukoplast Hospital, Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) auf dem Wärmekissen fixiert. Mittels eines Rektalthermometers wurde die Körpertemperatur kontinuierlich überprüft.

Im Anschluss an die Vorbereitungen begann die Präparation der Trachea. Hierzu wurde das Operationsgebiet rasiert, desinfiziert und die Haut mittels eines Skalpell (Präzisa plus, P.J. Dahlhausen, Köln, Deutschland) eröffnet. Eine gekürzte Venenverweilkanüle (Braunüle® G16, Braun, Melsungen, Deutschland) wurde als

## Material und Methoden

---

Tubus benutzt, in die Trachea eingeführt und mittels Polyestergerarn fixiert. Die Tiere atmeten während des Versuches spontan Raumluff.

Nach der Tracheotomie erfolgte die Darstellung der HalsgefäÙe. Hierbei wurde auf der linken Seite die *Vena jugularis interna* freigelegt. Kranial wurde die Vene ligiert und kaudal durch einen GefäÙclip (Schwartz Clip, Medicon, Tuttlingen, Deutschland) temporär abgeklemmt. Nach einer kleinen Querinzision wurde ein Polyethylenkatheter (Fine Bore Polyethene Tubing, 0,28 ID, 0,61 OD, Portex, Smith, London, UK) in die *Vena jugularis interna* eingeführt. Nach dessen Fixierung mit Polyestergerarn (Coats Duet, Salach, Deutschland) am GefäÙ selbst und mittels chirurgischem Nahtmaterial (Polyester DS 24, Catgut Markneuenkirchen, Deutschland) an der Haut, wurde die Perfusorpumpe (Perfusor segura FT, Braun, Melsungen, Deutschland) mit NaCl angeschlossen.

Zur kontinuierlichen Blutdruckmessung wurde die *Arteria carotis communis dextra* mit einem größerlumigen Katheter (Fine Bore Polyethene Tubing, 0,58 ID, 0,96 OD, Portex, Smith, London, UK) punktiert. Der Anschluss an einen baugleichen Perfusor (s.o.) erfolgte über ein invasives Blutdruckmesssystem (PMSET 1 DT-XX 1 Safeway, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA). Die mit den Perfusoren verabreichte NaCl-Menge betrug 16 ml/kgKG/h Basisvolumen (1/3 arteriell und 2/3 venös). Über einen Monitor (Model 66-S, Hewlett Packard, Palo Alto, USA) wurden Blutdruck, die Herzfrequenz sowie die Temperatur des Tieres aufgezeichnet.

Nun erfolgte die erste Blutentnahme (0,6ml) über den arteriellen Katheter (Monovette, Saarstedt, Nümbrecht, Deutschland). Daraus wurden 0,1ml zur Bestimmung des Säure-Basen-Status und der Blutgasanalyse entnommen, sowie 0,5ml zur Zytokinbestimmung. Ab jetzt erfolgte eine 90-minütige Überwachungsphase, in der alle 15 Minuten die Vitalparameter (Herzfrequenz, mittlerer arterieller Druck und Temperatur) kontrolliert wurden.

Je nach Gruppenzugehörigkeit der Tiere erfolgte nach 15 Minuten Pause die Gabe von LPS (Lipopolysaccharid, *Escherichia coli* Serotyp 026:B6, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Dosierung von 15 mg/kgKG langsam intravenös oder eine entsprechende Menge NaCl, als Bolus.



## Material und Methoden

---

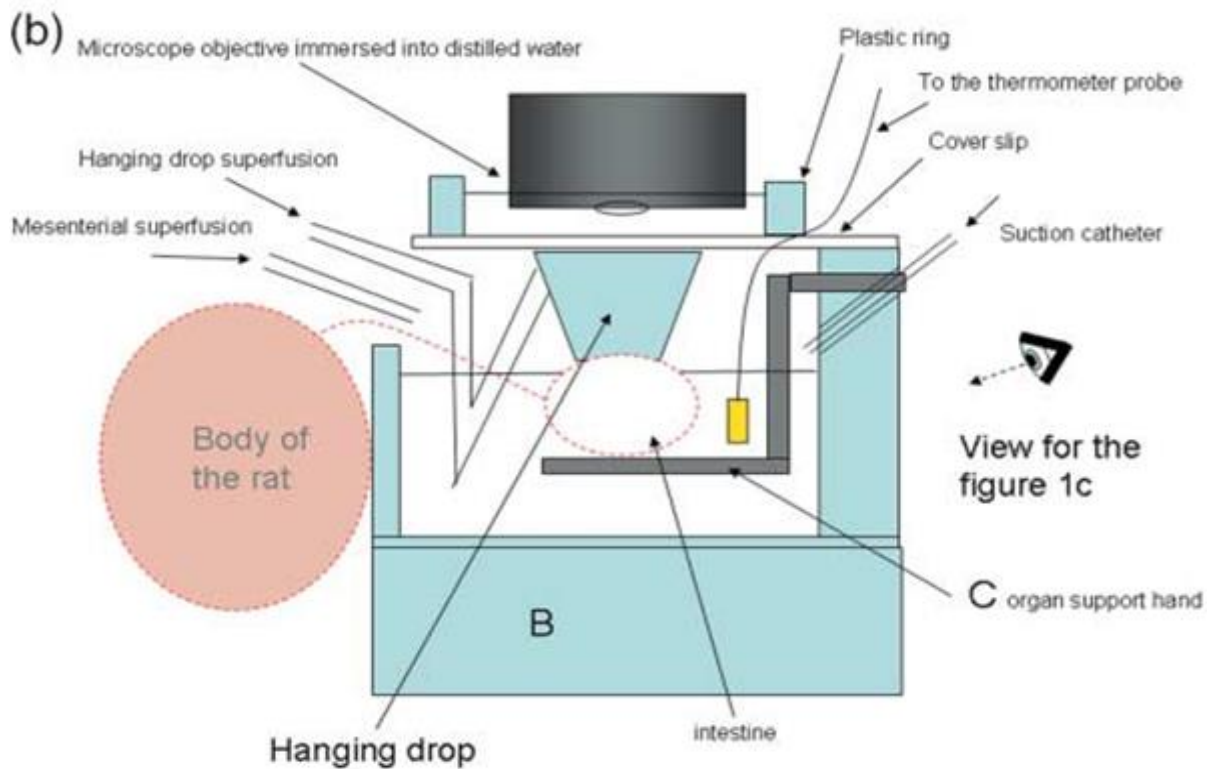
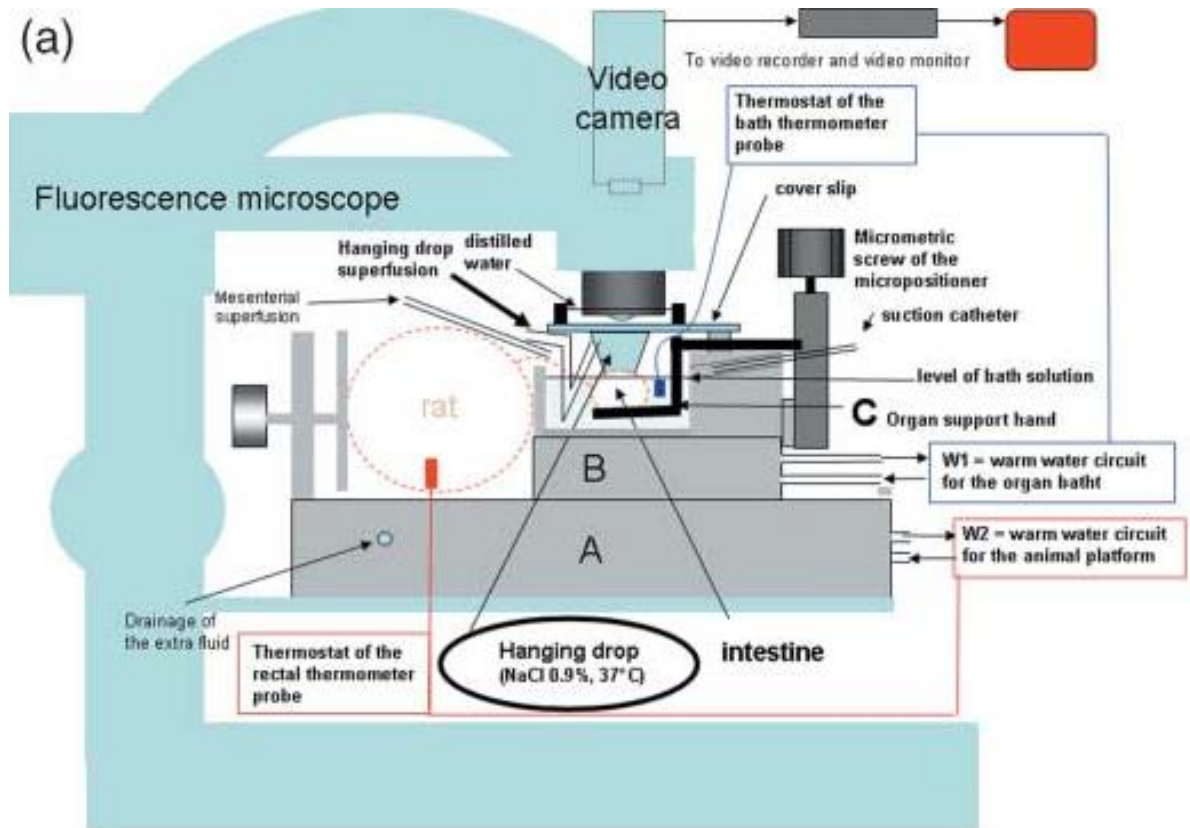
Nach weiteren 15 Minuten wurde den Tieren, je nach randomisierter Gruppe, Simvastatin (S6196-25mg, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Dosierung von 0,2 mg/kgKG oder NaCl verabreicht.

Nach 60 Minuten wurde als abschließende Vorbereitung für die Intravitalmikroskopie eine mediane Laparotomie durchgeführt. Dabei wurde ein Elektrokauter der Firma Servoprax (Wesel, Deutschland) verwendet. Zur Mikroskopie wurden die Tiere auf den beheizbaren Plexiglastisch (entwickelt von: PD Dr. med. habil. D. Pavlovic) (Abb.10a-c) des Mikroskopes umgelagert und in Seitenlage gebracht. Die zu untersuchende Darmschlinge, des terminalen Ileums, wurde mit Hilfe von Q-Tipps (Paul Hartmann, Heidenheim, Deutschland) ohne große Manipulation in einen Plexiglasbehälter mit erwärmter NaCl-Lösung ausgelagert. Um die Auskühlung und Austrocknung durch die Raumluft zu vermeiden, wurde dieser Abschnitt zusätzlich mit einer auf 37°C erwärmten isotonischen NaCl-Lösung (Delta Select, Dreieich, Deutschland) superfundiert. Für eine konstante Benetzung lief die Superfusion, mittels eines Infusomaten, mit 100 ml/h. Die erwärmte Superfusionslösung (Wärmekreislauf, Mechanik Prüfgeräte Werk, Medingen, Deutschland) stellte außerdem die Verbindung zu einem darüber positionierten Objektglasträger (76 x 26 mm Menzel Gläser, Menzel, Braunschweig, Deutschland) dar, dem sogenannten "*Hanging Drop*". Damit der Flüssigkeitsspiegel im Plexiglasbehälter konstant gehalten werden konnte, wurde die Flüssigkeit am Überlauf abgepumpt. Die Pumpe wurde über eine Zeitschaltuhr alle 20 Sekunden aktiviert. Die Kontrolle der Flüssigkeitstemperatur im Behälter erfolgte mit einem im Wasserbecken befestigten Thermometer.

Zwei Stunden nach der LPS-Gabe erfolgte die Intravitalmikroskopie. Dazu wurden die für die Untersuchung notwendigen Farbstoffe über den Venenkatheter verabreicht. Zur Kontrastierung des Plasmas verwendeten wir 5 % FITC-Albumin (Albumin-Fluoresceinisothiocyanat Konjugat, A 9771-5G, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in der Dosis von 1mg/kgKG und zur Markierung der Leukozyten 0,01 % Rhodamin (Rhodamin 6G, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in einer Dosierung von 1,5mg/kgKG. Zur Bestimmung der Blutgaswerte, des Säure-Basen-Status und der Zytokinbestimmung wurde nach Abschluss der Intravitalmikroskopie den Versuchstieren 0,6ml Blut entnommen. Zuletzt erfolgte die Tötung des Versuchstieres

## Material und Methoden

durch die intravenöse Gabe von Kaliumchlorid (Potassium, Aldrich, Steinheim, Deutschland).



## Material und Methoden

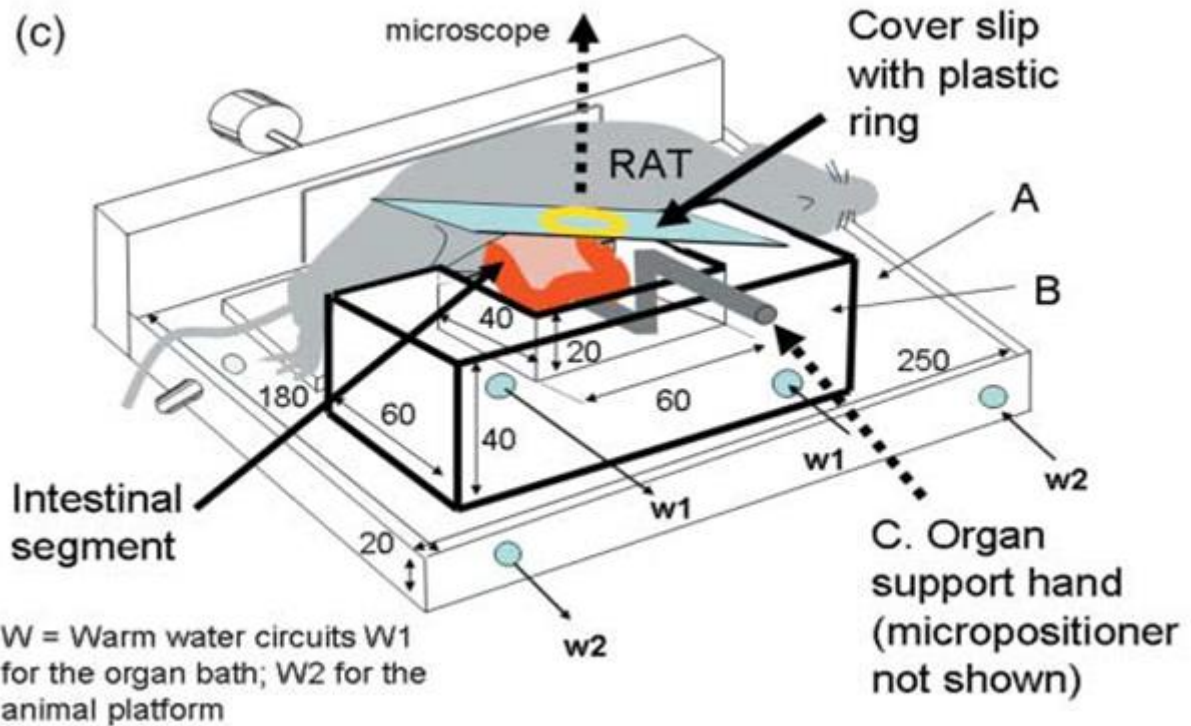


Abb.10: Darstellung des Arbeitsplatzes am Intravitalmikroskop nach dem Prinzip des „Hanging Drop“ nach Pavlovic [102] (a) Schema des Arbeitsplatzes in 2D-Darstellung.(b) Prinzip des „Hanging Drop“ im Detail. (c) Darstellung des Arbeitsplatzes in 3D. Maße in mm. A beheizte Plattform. B Organbad. C Darmablage.

### 4.4 Intravitalmikroskopie

Mit folgender Geräteausstattung wurde die Intravitalmikroskopie durchgeführt:

- Auflichtmikroskop (Axiotech vario 100 HD, Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Lichtquelle (HBO 50, Carl Zeiss Jena, Deutschland)
- Objektiv (Achromplan 20x / 0,5, Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Objektträger (76 x 26 mm Menzel-Gläser, Menzel, Braunschweig, Deutschland)
- Filtersatz Nr. 10, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Anregung: BP 450 - 490; Frequenzteiler: 510; Emission: BP 515 - 565) für Beobachtungen mit FITC-Albumin
- Filtersatz Nr. 20, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Anregung: BP 546/12; Frequenzteiler: 560; Emission: BP 575 - 640) für Beobachtungen mit Rhodamin
- 6GS/W-CCD-Kamera (AVT-BC 12, AVT Horn, Aalen, Deutschland)
- Videorekorder (NV-HS830, Panasonic, Matsushita, Tokio, Japan)
- Monitor (PM 159, Ikegami, Maywood, USA)

Zur Ermittlung der funktionellen Kapillardichte galt es zunächst Kapillaren der *Lamina muscularis circularis* sowie der *Lamina muscularis longitudinalis* aufzusuchen (Abb.11). Hier wurden an fünf verschiedenen Stellen Videosequenzen von jeweils 35 Sekunden Länge aufgenommen.

Zur Untersuchung der Leukozytenadhärenz wurden im Bereich der Submukosa unverzweigte Venolenabschnitte ausgewählt. Hierbei lag das Augenmerk auf Venolen der ersten und der dritten Ordnung. Es wurden wiederum fünf Sequenzen zu je 35 Sekunden aufgenommen.

Nach der Untersuchung im Bereich der Submukosa schloss sich die mikroskopische Untersuchung der Mukosa an. Dazu wurde der Darm mit Hilfe des Elektrokauters antimesenterial eröffnet und anschließend mit Kochsalzlösung ausgespült. Der Darmabschnitt wurde zur weiteren mikroskopischen Untersuchung in die gleiche Position gebracht wie bei den vorangegangenen Untersuchungen. Hierbei

## Material und Methoden

wurde die lumenale Seite der Darmschlinge, unter Verwendung des „Hanging Drop“, an das Objektträgerglas herangeführt. Von den Darmzotten wurden an fünf verschiedenen Positionen Videoaufnahmen von jeweils 35 Sekunden aufgezeichnet.

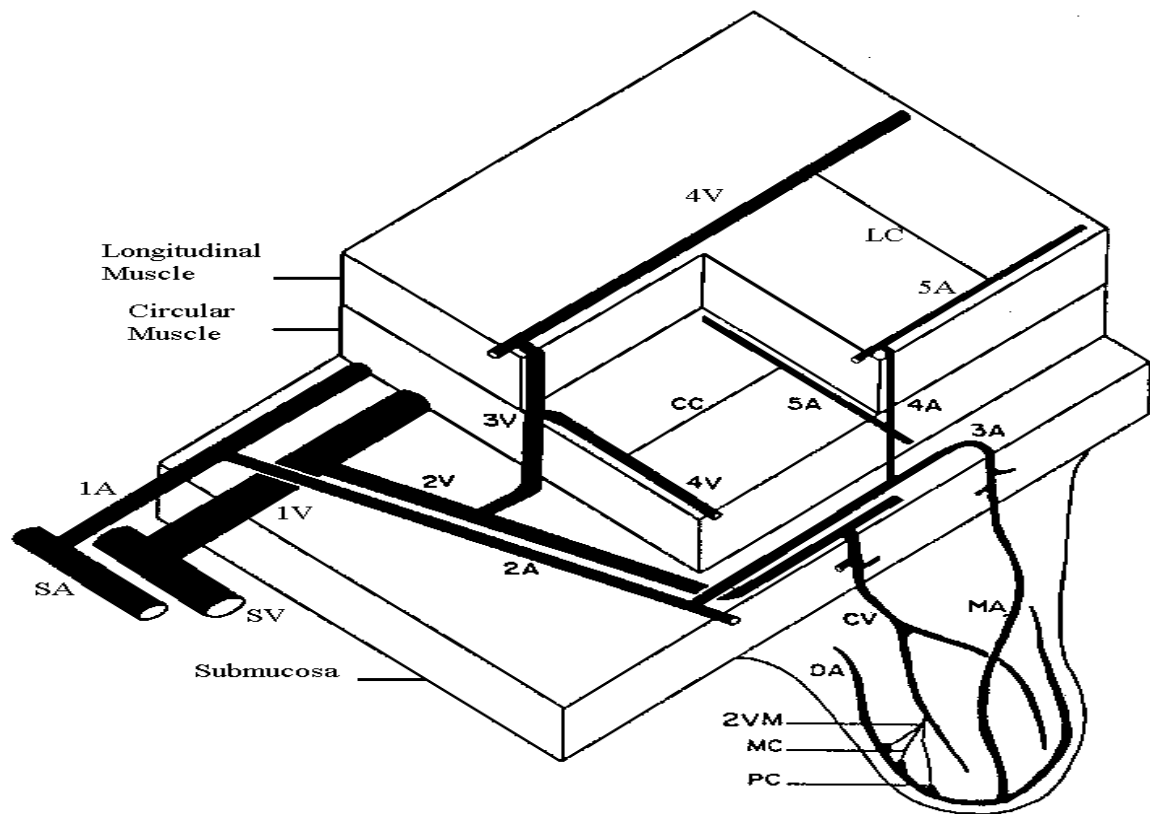


Abb.11: Schema des Darmwandaufbaus; wesentliche Aufzweigungen der Arteriolen (A1 - A5) und Venolen (V1 - V4), Kapillaren der zirkulären (CC) und longitudinalen (LC) Muskulatur, zentrale Villusarteriole (MA) mit Aufzweigung in zwei Verteilungsarteriolen (DA), präkapilläre Sphinkteren(PC), Mukosakapillare (MC), mukosale Venolen zweiter Ordnung (2VM), Villussammelvenole (CV) [103]

### 4.5 Auswertung der Intravitalmikroskopie

Die Auswertung der einzelnen Videosequenzen erfolgte offline und verblindet. Hierfür wurde ein spezielles Computerprogramm (CapImage, Zeintl, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

In den Videosequenzen, die während der Untersuchung in den fünf Gefäßabschnitten der Venolen der ersten (V1) und der dritten (V3) Ordnung (Abb.12) aufgenommen wurden, konnten nun jeweils zwei Arten von Leukozyten klassifiziert werden. Die permanent adhärenenten und die temporär adhärenenten Leukozyten.

Permanent adhärenente Leukozyten „Sticker“ charakterisieren sich dadurch, dass sie über eine Dauer von 30 Sekunden am Gefäßendothel haften bleiben.

Bei den Leukozyten, die nur temporär an der Endothelwand haften bleiben, handelt es sich um sogenannte „Roller“. Durch die nur temporäre Haftung gewinnt der Beobachter den Eindruck, dass die Leukozyten an der Gefäßwand entlangrollen. Venolen von mindestens 200µm Länge wurden ausgewertet (Leukozyten pro Fläche; n/mm<sup>2</sup>).

Da das Gefäßendothel einer Zylinderfläche entspricht, wurde mit Hilfe der Formel zur Berechnung der Zylinderfläche die Leukozytenzahl n/mm<sup>2</sup> ermittelt.

$$\text{Zylinderfläche} = 2 \times \pi \times r \times l$$

( $r = \frac{1}{2} \times$  Breite des Gefäßes,  $l =$  die markierte Länge,  $\pi =$  festgelegte Konstante)

Der Beobachtungszeitraum lag auch hier bei 30 Sekunden. Um die Messung durchführen zu können, wurde eine virtuelle Linie festgelegt, über die sich die Leukozyten innerhalb des Zeitfensters hinwegbewegten. Das Ergebnis wurde anschließend mit der Zahl zwei multipliziert (Einheit in Zellen/min).

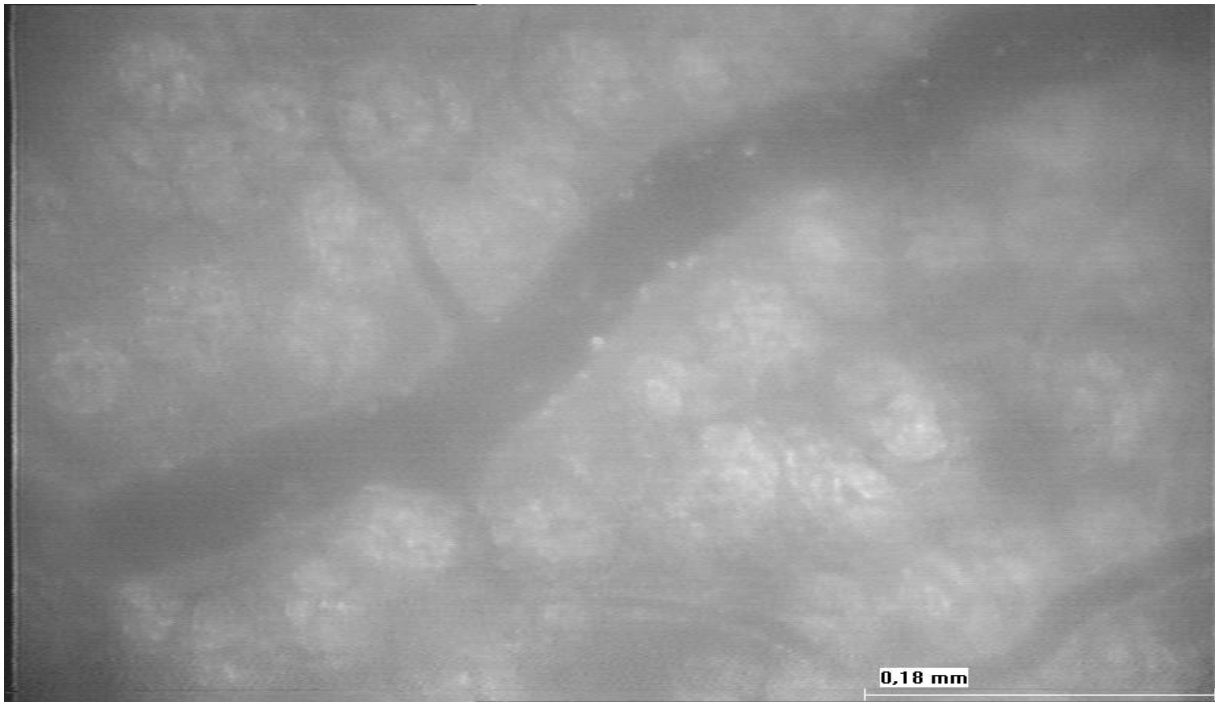


Abb.12: Darstellung der postkapillären Venole dritter Ordnung in der Submukosa eines Endotoxintieres, Leukozyten markiert mit Rhodamin 6G

Außer der Leukozytenadhärenz wurde auch die funktionelle Kapillardichte der longitudinalen und zirkulären Muscularis sowie der Mukosa untersucht (Abb.13-15). Bei der funktionellen Kapillardichte (*Functional Capillary Density*, FCD) handelt es sich um die Anzahl der sichtbar perfundierten Gefäße im Hinblick auf eine bestimmte Fläche. Die Visualisierung der Kapillarperfusion ist durch die unterschiedlich gefärbten Bestandteile des Blutes möglich. Das durch FITC-Albumin hell gefärbte Plasma ist deutlich von den dunklen Erythrozyten zu unterscheiden. Nach der Festlegung der Fläche, im Falle der Submukosa 400 x 500  $\mu\text{m}$ , mussten die perfundierten Kapillarabschnitte ihrer Länge nach auf dem Bildschirm markiert werden, um so die FCD bestimmen zu können.

Dasselbe Verfahren erfolgte nun auch hinsichtlich der dysfunktionalen Kapillaren (*Dysfunctional Capillary Density*, DCD) und der nicht durchbluteten (*Nonfunctional Capillary Density*, NCD) Gefäße. Bei der Betrachtung der Mukosa wurde die Durchblutung der einzelnen Darmzotten ausgewertet. Hierbei wurde ein Feld der Größe 100 x 150  $\mu\text{m}$  ausgewählt und hinsichtlich der Kapillarperfusion untersucht.

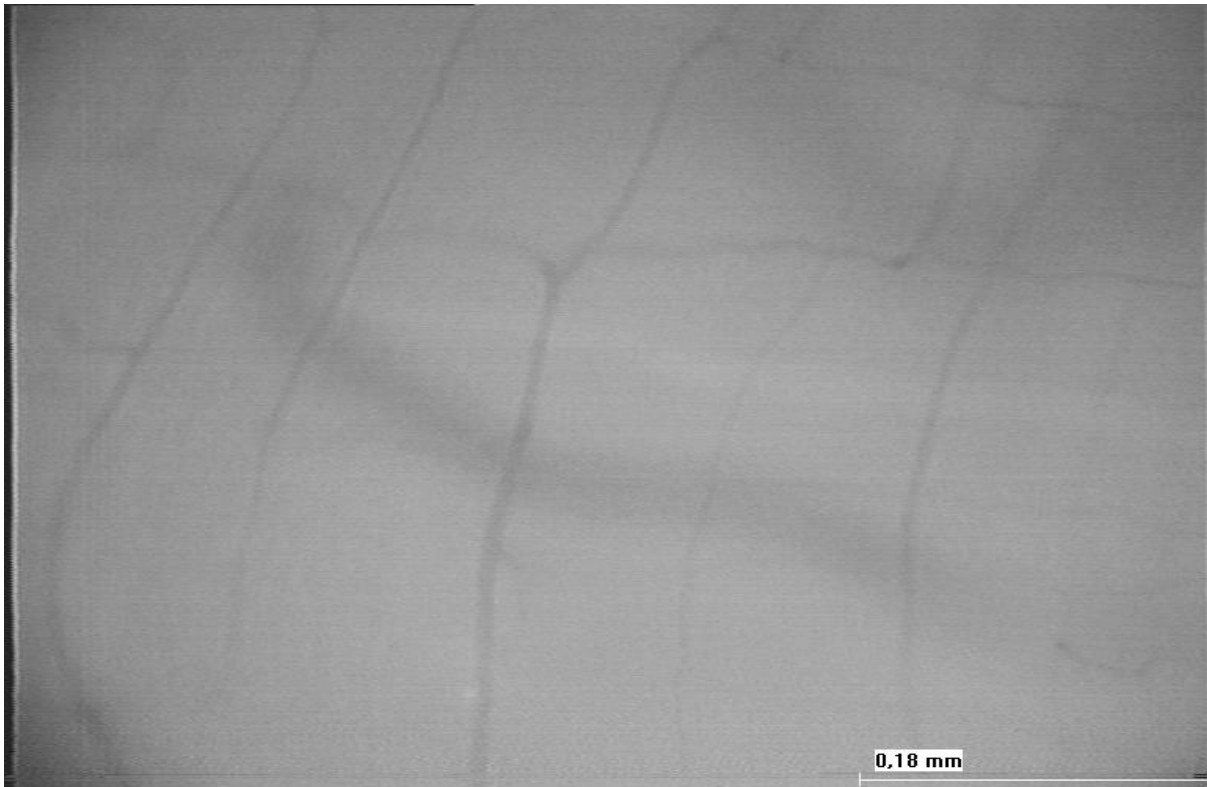


Abb.13: Darstellung der Kapillaren in der *Lamina muscularis circularis* eines Kontrolltieres, markiert mit FITC-Albumin

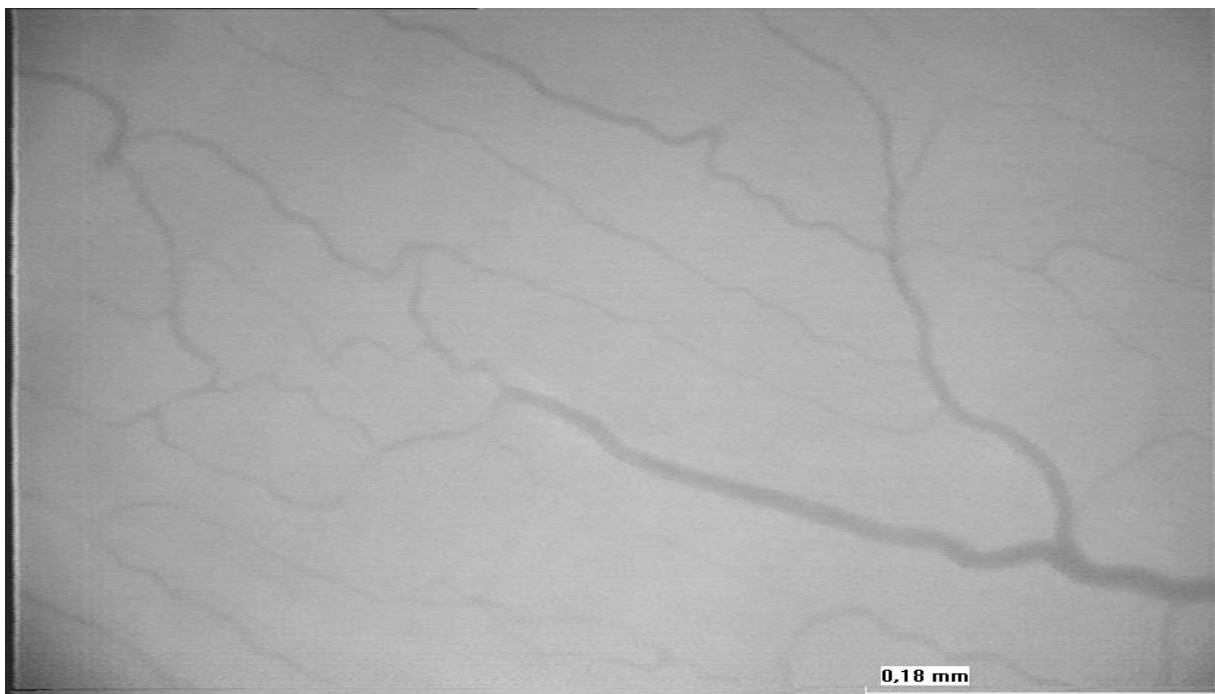


Abb.14: Darstellung der Kapillaren in der *Lamina muscularis longitudinalis* eines Kontrolltieres, markiert mit FITC-Albumin



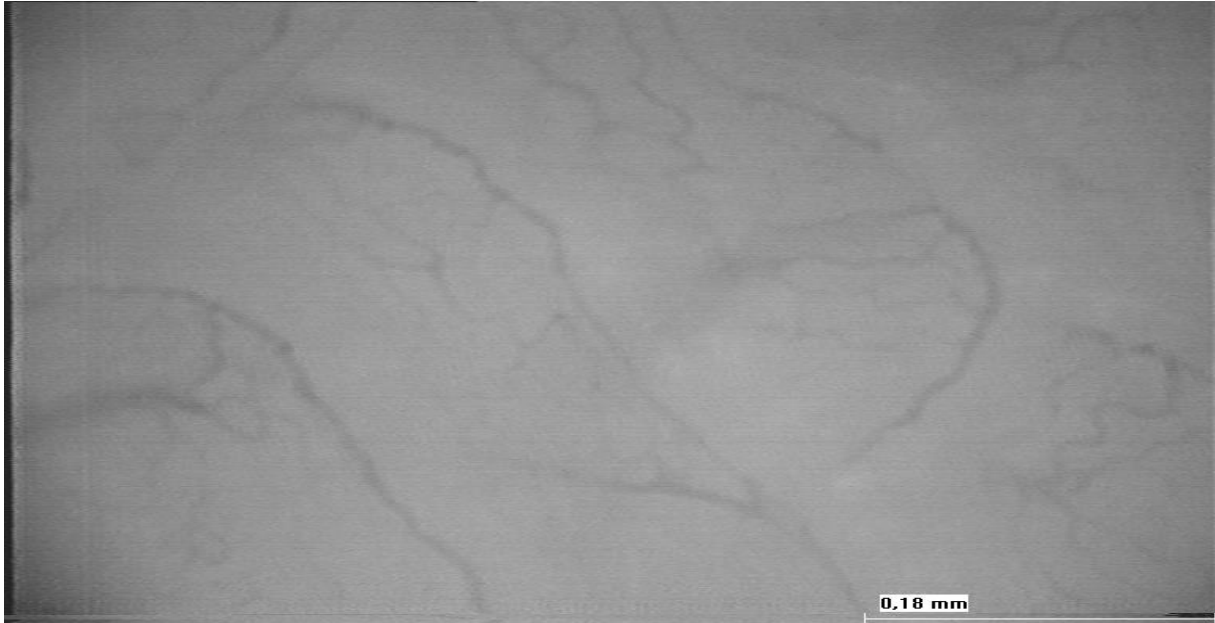


Abb.15: Darstellung der Kapillaren in der *Lamina mucosa* eines Kontrolltieres, markiert mit FITC-Albumin

### 4.6 Blutgasanalyse

Zur Kontrolle der Blutgasparameter und des Säure-Base-Haushaltes wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten Blut abgenommen. Die erste Abnahme wurde unmittelbar vor LPS- oder Placebogabe, die zweite direkt am Ende des Versuches über den arteriellen Katheter durchgeführt. Die Auswertung erfolgte an einem automatischen Blutgasanalysegerät (ABL 700, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark).

### 4.7 Zytokindiagnostik

Bei beiden Blutentnahmen wurden 0,5ml Blut in Heparinröhrchen für die Zytokinauswertung abgenommen. Dieses wurde für 10 Minuten mit 3000U/min zentrifugiert (Desaspeed, DESAGA Sarstedt Group, Nümbrecht, Deutschland), um das so gewonnenen Plasma zur Analyse der Zytokine verwenden zu können. Es wurden die Konzentration von Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ),

und der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) bestimmt. Die Auswertung erfolgte hierbei an einem Durchflusszytometer (FACSCalibur, BectonDickinson&Co, USA) mit Hilfe eines speziellen KITs (BMS725FF rat Cytokine 6plex, Bender MedSystems GmbH, Wien, Österreich).

### 4.8 Statistik

Unser Tierexperiment wurde als randomisierte, kontrollierte, verblindete Studie durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe zweier Computerprogramme, Microsoft Excel sowie Graph Pad Prism (Graph Pad Software, La Jolla, USA). Es wurden graphisch der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD) und der Standardfehler (SEM) dargestellt. Die Normalverteilung der Daten wurde durch den Komogorov-Smirnov-Test ermittelt. Danach erfolgte die einfaktorielle Varianzanalyse mit dem Post-hoc Newman-Keuls-Test.

Herzfrequenz, Blutdruck, Blutgase, Interleukine sowie Temperatur wurden mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse und dem Bonferroni Post-hoc Test ausgewertet. Bei allen Analysen galt das Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Vitalparameter

#### 5.1.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Zum Ausgangszeitpunkt (T= 0 min) gab es keine Unterschiede im mittleren arteriellen Druck zwischen den vier Gruppen. Der mittlere Blutdruck lag zwischen  $121\pm 11$  mmHg (NaCl-Gruppe) und  $135\pm 9$  mmHg (Simvastatingruppe). Nach der LPS-Injektion wiesen die Endotoxinbelasteten Gruppen mit  $102\pm 13$  mmHg (LPS+NaCl) und  $99\pm 11$  mmHg (LPS+Simvastatin) signifikant niedrigere Blutdruckwerte auf, als die mit NaCl ( $124\pm 15$  mmHg) bzw. mit Simvastatin ( $130\pm 11$  mmHg) behandelten Kontrollgruppen. Bis zum Zeitpunkt T = 105 min lagen die Werte der Endotoxingruppen mit 103 bis 109 mmHg auch weiterhin signifikant unter ihrem Ausgangswert.

Mit Beginn der intravitalmikroskopischen Untersuchung stieg der Blutdruck bis auf  $118\pm 9$  mmHg (LPS+Simvastatin) bzw.  $115\pm 12$  mmHg (LPS+NaCl) an. Nur bei der mit NaCl behandelten LPS-Gruppe lag noch ein signifikanter Unterschied zum Ausgangswert vor.

Gegen Ende der Untersuchung (T = 150 min), waren lediglich die Werte der unter Simvastatin stehenden LPS-Gruppe ( $111\pm 11$  mmHg) stark signifikant niedriger, als die der mit Simvastatin behandelten Kontrollgruppe ( $132\pm 13$  mmHg) bzw. signifikant niedriger als die der mit NaCl behandelten Kontrollgruppe ( $129\pm 12$  mmHg).

Im Beobachtungszeitraum zeigte sich bei den Tieren der NaCl-Kontrollgruppe bis zum Zeitpunkt T = 105 min ein leicht abnehmender Blutdruck (124 bis 114 mmHg). Mit Beginn der mikroskopischen Untersuchung fiel der Blutdruck bei den Tieren der Medikamenten-Kontrollgruppe signifikant auf  $114\pm 12$  mmHg ab. Daran schloss sich, wie bereits bei den anderen Gruppen erwähnt, ein Anstieg des Blutdruckes auf  $135\pm 13$  mmHg (T = 135 min) an. Zwischen der NaCl-Kontroll- und der Simvastatinkontrollgruppe gab es keine signifikanten Unterschiede.

## Ergebnisse

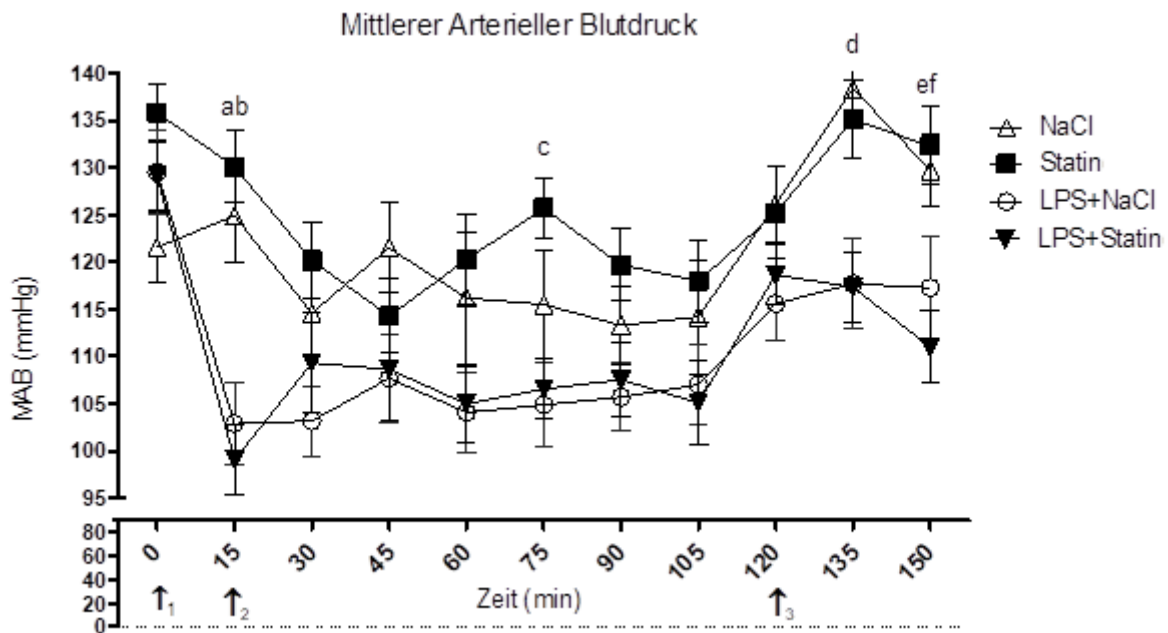


Abb.16: Darstellung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAB in mmHg); MW  $\pm$  SD; n = 10;  $\uparrow_1$  = Zeitpunkt der LPS-Gabe;  $\uparrow_2$  = Zeitpunkt der Statingabe;  $\uparrow_3$  = Beginn der Intravitalmikroskopie; a = stark signifikanter ( $p < 0,01$ ) Unterschied der LPS- + NaCl-Gruppe sowie sehr stark signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) der mit Statinen behandelten LPS-Gruppe gegenüber der mit NaCl-Kontrollgruppe; b = sehr stark signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) der Endotoxingruppen gegenüber der Simvastatin-Kontrollgruppe; c = stark signifikante Differenz ( $p < 0,01$ ) der LPS- + NaCl bzw. signifikante ( $p < 0,05$ ) Differenz der LPS- + Simvastatingruppe gegenüber der Simvastatingruppe; d = stark signifikante Differenz ( $p < 0,01$ ) der LPS- + NaCl-Gruppe bzw. signifikante ( $p < 0,05$ ) Differenz der LPS- + Simvastatingruppe gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe; e = signifikante ( $p < 0,05$ ) Differenz der LPS- + NaCl-Gruppe gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe; f = stark signifikante ( $p < 0,01$ ) Differenz der LPS + Simvastatingruppe gegenüber der Simvastatingruppe

### 5.1.2 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz aller vier Gruppen lagen in einem vergleichbaren Bereich:  $440 \pm 21$  /min (NaCl-Kontrollgruppe),  $459 \pm 26$  /min (Statinkontrollgruppe),  $428 \pm 52$  /min (LPS+NaCl),  $438 \pm 25$  /min (LPS+Statin).

Ab dem Zeitpunkt T = 30 min war ein unterschiedliches Verhalten zu erkennen: die endotoxinbelasteten Tiere wiesen eine Zunahme und die NaCl-Gruppe sowie die Simvastatingruppe eine Abnahme der Herzfrequenz auf. Die Tachykardie bei den Endotoxintieren war ab T = 75 min signifikant und nahm mit dem Verlauf des Experimentes weiter zu.

## Ergebnisse

Zum Zeitpunkt T = 135 min lag eine hoch-signifikante ( $p < 0,001$ ) Differenz der LPS+NaCl-Gruppe ( $493 \pm 34$  /min) und der mit Statinen behandelten LPS-Gruppe ( $491 \pm 16$  /min) gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe vor. Die Simvastatinkontrollgruppe lag mit einer Herzfrequenz von  $440 \pm 29$  /min deutlich unter den Werten der Endotoxingruppe.

Bis zum Abschluss des Versuches kam es zu keiner weiteren Änderung. Innerhalb der Kontroll- sowie der LPS-Gruppen war zu keiner Zeit ein Unterschied zwischen NaCl und Statin erkennbar. Die Simvastatinkontrollgruppe ( $440 \pm 21$  /min) sowie die NaCl-Kontrollgruppe ( $451 \pm 20$  /min) wiesen im Verlaufe des Versuches jeweils einen nicht signifikanten Rückgang der Herzfrequenz auf ( $424 \pm 43$  /min;  $443 \pm 36$  /min). Bei den Endotoxingruppen war ab T = 60 min eine gravierende Tachykardie im Vergleich zum Ausgangswert festzustellen. Mit Erreichen von T = 150 min lag die Frequenz bei  $501 \pm 33$  /min (LPS + NaCl) sowie bei  $503 \pm 27$  /min (LPS + Simvastatin).

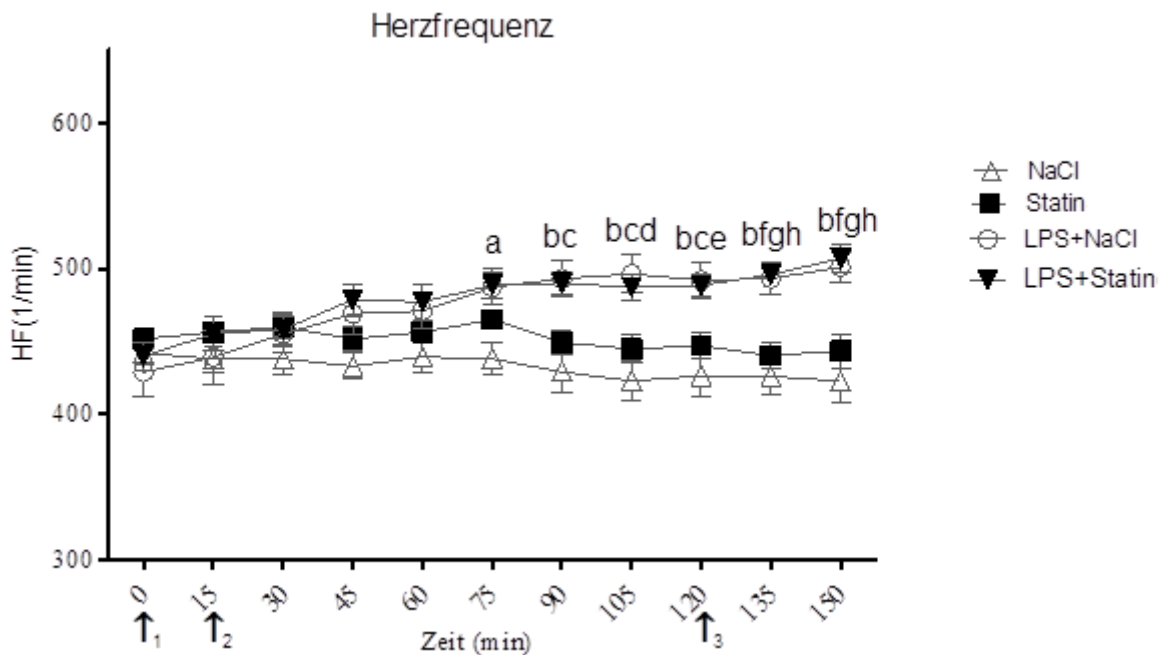


Abb. 17: Darstellung der Herzfrequenz (HF) in 1/min, MW  $\pm$  SD; n=10;  $\uparrow_1$  = Zeitpunkt der LPS-Gabe;  $\uparrow_2$  = Zeitpunkt der Statingabe;  $\uparrow_3$  = Beginn der Intravitalmikroskopie; a = signifikanter Unterschied der LPS+NaCl und behandelten LPS Gruppe gegenüber der NaCl-Gruppe; b = sehr stark signifikanter Unterschied der LPS+NaCl gegenüber der NaCl-Gruppe; c = stark signifikanter Unterschied der behandelten LPS- gegenüber der NaCl-Gruppe; d = stark signifikanter Unterschied der LPS + NaCl-Gruppe gegenüber der Simvastatingruppe; e = signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied der LPS- + NaCl-Gruppe gegenüber der Simvastatingruppe; f = sehr stark signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied der NaCl-Gruppe gegenüber der LPS- + Simvastatingruppe; g = stark signifikanter ( $p < 0,01$ ) Unterschied der LPS- gegenüber der Simvastatingruppe; h = stark signifikanter ( $p < 0,01$ ) Unterschied der Simvastatingruppe gegenüber der behandelten LPS- + Simvastatingruppe

## 5.2 Intravitalmikroskopie

### 5.2.1 Funktionelle Kapillardichte

Bei der intravitalmikroskopischen Untersuchung ab dem Zeitpunkt  $T = 120$  min konnte für die funktionelle Kapillardichte (FCD) im Bereich der Lamina muscularis longitudinalis ein signifikanter Unterschied der einzelnen Gruppen gegenüber der behandelten LPS-Gruppe beobachtet werden. Die mit Statinen behandelte LPS-Gruppe wies mit  $54,5 \pm 11,6$  cm/cm<sup>2</sup> einen signifikant geringeren Wert auf, als die NaCl- ( $77,0 \pm 12,8$  cm/cm<sup>2</sup>), die Simvastatin- ( $82,3 \pm 17,1$  cm/cm<sup>2</sup>) sowie die unbehandelte LPS-Gruppe ( $70,4 \pm 8,4$  cm/cm<sup>2</sup>).

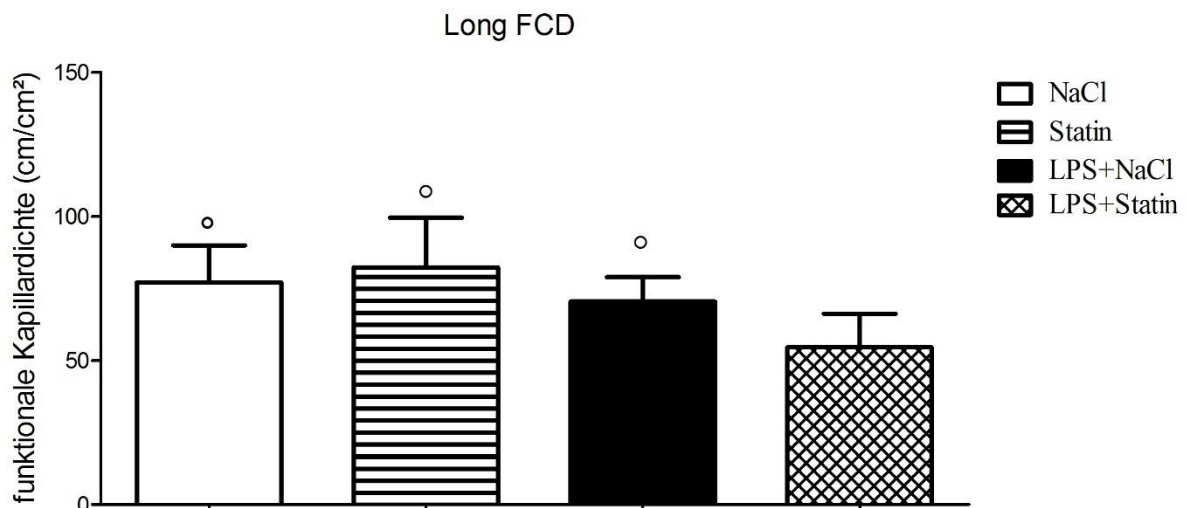


Abb.18: Darstellung der funktionellen Kapillardichte (FCD) in der Lamina muscularis longitudinalis in cm/cm<sup>2</sup>; MW  $\pm$  SD; n=10; ° = signifikanter Unterschied gegenüber der behandelten LPS-Gruppe ( $p < 0,05$ )

In der folgenden Schicht, der Lamina muscularis circularis, wurde auch ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der mit Statinen behandelten LPS-Gruppe gefunden. Hierbei unterschied sich nur die Statinkontrollgruppe mit  $68,1 \pm 11,6$  cm/cm<sup>2</sup> signifikant von dieser  $54,6 \pm 10,2$  cm/cm<sup>2</sup>. Bei der NaCl-Kontrollgruppe mit  $63,3 \pm 8,7$  cm/cm<sup>2</sup> und der LPS- + NaCl-Gruppe mit  $60,2 \pm 11,6$  cm/cm<sup>2</sup> lag kein signifikanter Unterschied vor.

## Ergebnisse

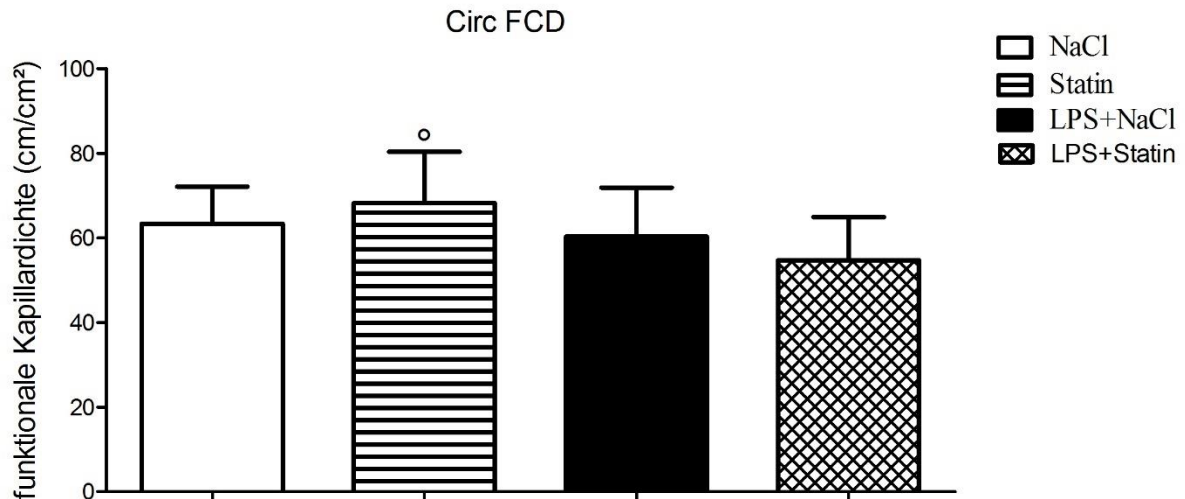


Abb.19: Darstellung der funktionellen Kapillardichte (FCD) in der Lamina muscularis circularis in cm/cm<sup>2</sup>; MW ± SD; n=10; ° = signifikanter Unterschied gegenüber der behandelten LPS-Gruppe (p<0,05)

Bei Betrachtung der Kapillardichte in der Mukosa der Darmzotten fiel innerhalb der Gruppen keine größere Differenz auf. Die NaCl-Kontrollgruppe hatte mit 267,6±28,4 cm/cm<sup>2</sup> den höchsten Wert, gefolgt von der reinen Statinkontrollgruppe mit 263,5±38,0 cm/cm<sup>2</sup>. Die beiden LPS-Gruppen wiesen Werte auf, die sich kaum voneinander unterschieden. Die mit NaCl behandelte Gruppe hatte mit 222,7±63,4 cm/cm<sup>2</sup> im Gegensatz zu der mit Statinen behandelten Gruppe mit 218,0±30,0 cm/cm<sup>2</sup> den höheren Wert.

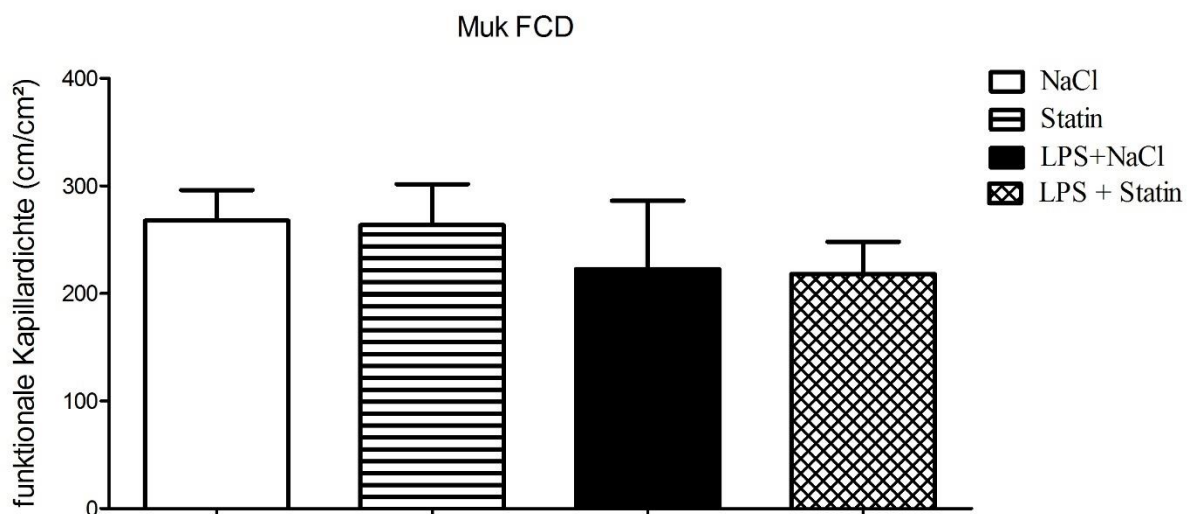


Abb.20: Darstellung der funktionellen Kapillardichte (FCD) in der Mukosa in cm/cm<sup>2</sup>; MW ± SD; n=10

## Ergebnisse

### 5.2.2 Temporär adhärenente Leukozyten in V1“Roller“

Bei der Analyse der Anzahl der temporär adhärenente Leukozyten am Endothel der Venolen der ersten Ordnung konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die Auszählung in der NaCl-Kontrollgruppe ergab  $1,4 \pm 1,1$  /min sowie in der Simvastatinkontrollgruppe  $1,6 \pm 1,0$  /min. In beiden Endotoxingruppen lag die Zahl der „Roller“ bei  $2,8 \pm 1,3$  /min (LPS+NaCl) beziehungsweise bei  $2,0 \pm 1,0$  /min (LPS+Simvastatin).

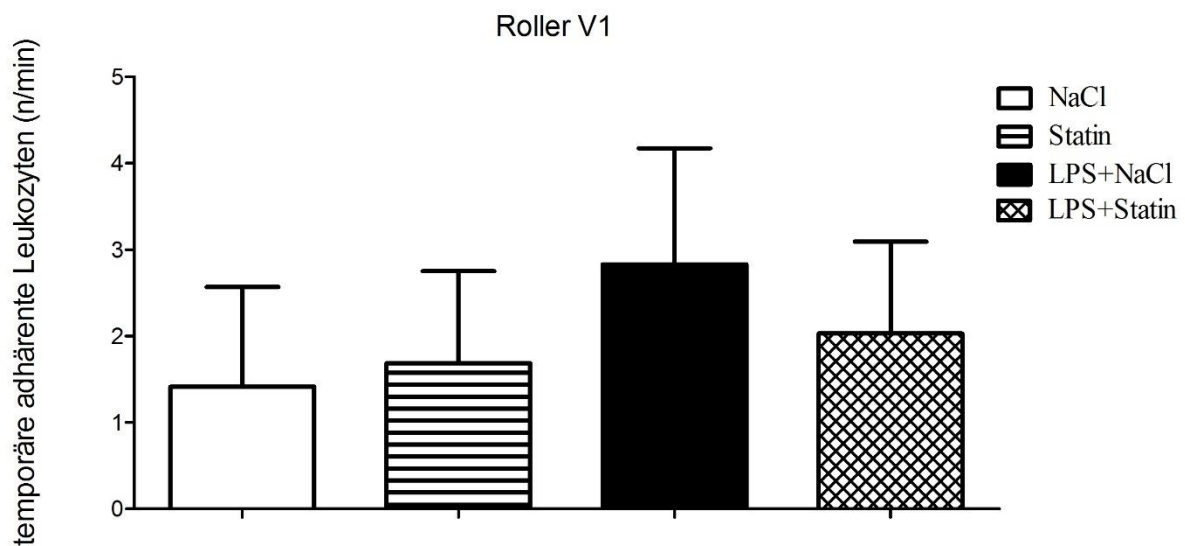


Abb.21: Darstellung der Anzahl an temporär adhärenente Leukozyten (Roller) [n/min] der einzelnen Gruppen am Endothel in den Venolen der ersten Ordnung (V1); MW  $\pm$  SD; n = 10



## Ergebnisse

### 5.2.3 Permanent adhärenente Leukozyten in V1“Sticker“

Bei den permanent adhärenente Leukozyten in den V1-Venolen konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Gruppen ohne Endotoxin und den beiden Gruppen mit Endotoxin festgestellt werden. In der NaCl-Kontrollgruppe wurden  $29,9 \pm 12,8$  /mm<sup>2</sup> und in der Statinkontrollgruppe  $31,0 \pm 10,3$  /mm<sup>2</sup> „Sticker“ gezählt. Bei den Endotoxingruppen wurde mit  $72,3 \pm 20,9$  /mm<sup>2</sup> (LPS + NaCl) und mit  $70,3 \pm 22,8$  /mm<sup>2</sup> (LPS+Simvastatin) eine signifikant höhere Anzahl an „Stickern“ festgestellt.

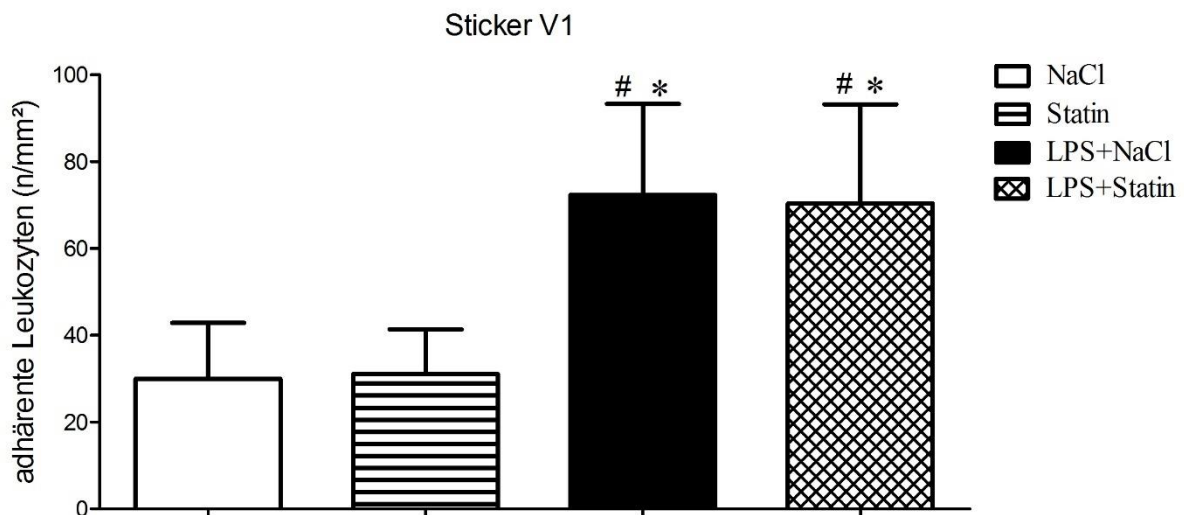


Abb.22: Anzahl der permanent adhärenente Leukozyten (Sticker) [n/mm<sup>2</sup>] in den Venolen der ersten Ordnung (V1) [n/mm<sup>2</sup>] aller Gruppen; MW ± SD; n = 10; # = signifikanter Unterschied (p < 0,05) der LPS-Gruppen gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe; \* = signifikanter Unterschied (p < 0,05) der LPS-Gruppen gegenüber der Statinkontrollgruppe

## Ergebnisse

### 5.2.4 Temporäre adhärenente Leukozyten in V3 "Roller"

Bei der Analyse der temporär adhärenente Leukozyten in den Venolen der dritten Ordnung wurden bei den Endotoxingruppen weniger Roller gezählt als bei den endotoxinfreien Tieren. Es lag hierbei nur ein signifikanter Unterschied der beiden LPS-Gruppen gegenüber der Simvastatinkontrollgruppe vor. Das Ergebnis in der NaCl-Kontrollgruppe lag mit  $2,6 \pm 1,4$  /min knapp unter dem der Simvastatinkontrollgruppe mit  $3,8 \pm 2,3$  /min. In den Endotoxingruppen lagen die Zahlen in der NaCl-Gruppe bei  $1,4 \pm 0,9$  /min und in der Simvastatingruppe bei  $1,0 \pm 0,7$  /min.

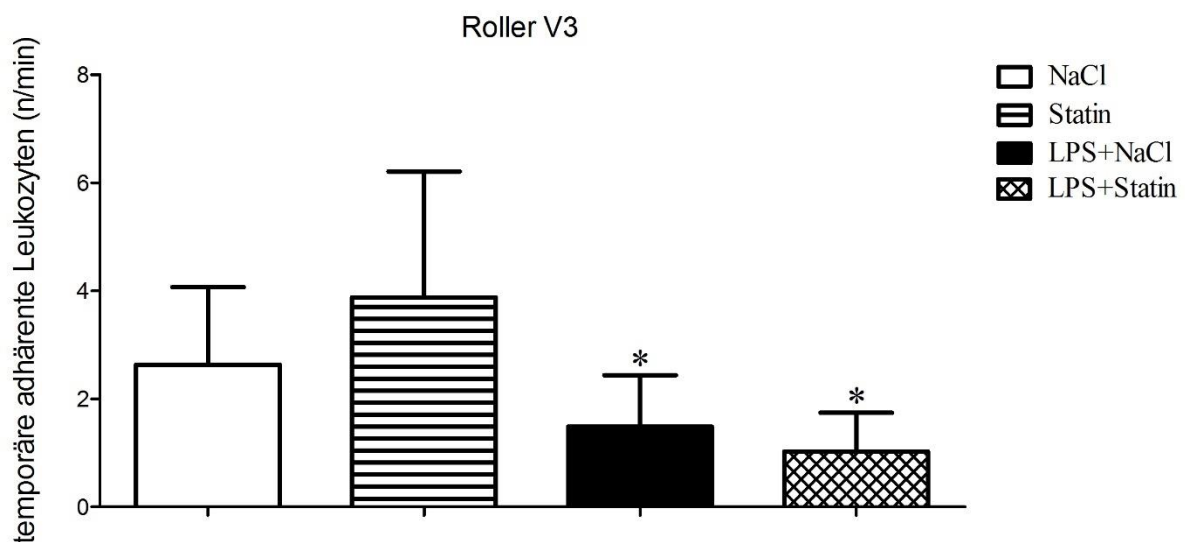


Abb.23: Darstellung der temporär adhärenente Leukozyten (Roller) [n/min] der einzelnen Versuchsgruppen in den Venolen der dritten Ordnung (V3); MW  $\pm$  SD; n = 10; \* = signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied gegenüber der Statinkontrollgruppe

## Ergebnisse

### 5.2.5 Permanent adhärenente Leukozyten in V3 “Sticker“

Bei der Auszählung der Anzahl permanent adhärenente Leukozyten in den V3-Venolen wurden signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und den LPS-Gruppen gefunden. Bei der NaCl-Kontrollgruppe wurden  $76,1 \pm 33,4$  /mm<sup>2</sup> adhärenente Leukozyten gezählt und bei der Statinkontrollgruppe  $96,9 \pm 43,2$  /mm<sup>2</sup>. Bei den LPS belasteten Gruppen war eine wesentlich höhere Anzahl zu finden. Die unbehandelte Gruppe wies eine Anzahl von  $196,5 \pm 55,0$  /mm<sup>2</sup> auf und die nur mit Simvastatin behandelte Gruppe eine von  $154,9 \pm 80,3$  /mm<sup>2</sup>.

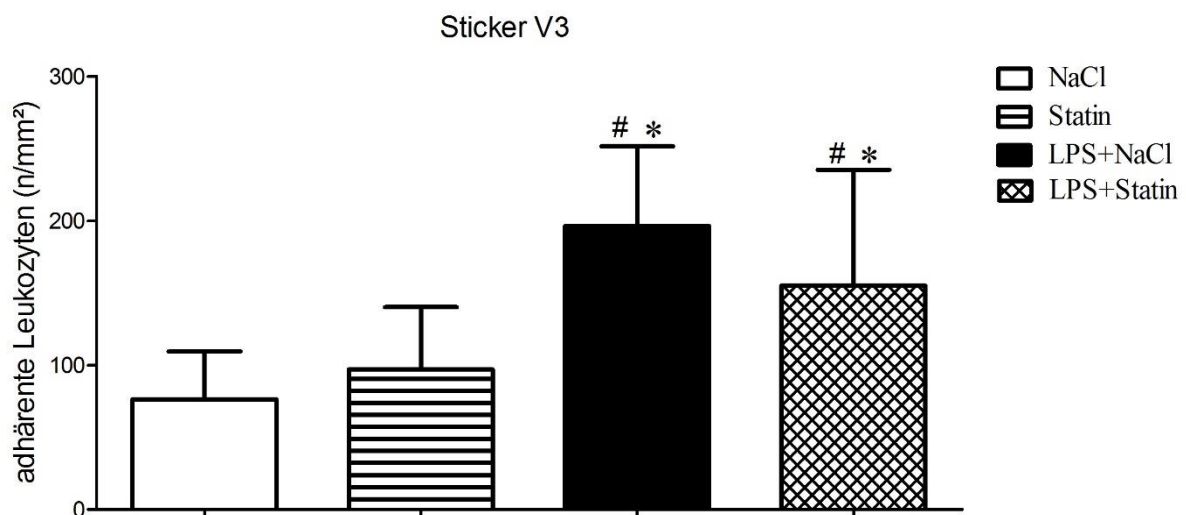


Abb.24: permanent adhärenente Leukozyten (Sticker) [n/mm<sup>2</sup>] der einzelnen Versuchsgruppen in den Venolen dritter Ordnung (V3); MW  $\pm$  SD; n= 10; # = signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe; \* = signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied gegenüber der Statinkontrollgruppe.

## 5.3 Blutgasanalyse

### 5.3.1 Sauerstoffpartialdruck

Während bei allen Gruppen eine Zunahme des Sauerstoffpartialdruckes im Beobachtungszeitraum gemessen werden konnte, erreichten die Unterschiede nicht alle Signifikanzniveau. Lediglich bei der NaCl- sowie der Statinkontrollgruppe kam es zu einer statistisch signifikanten Veränderung der Werte.

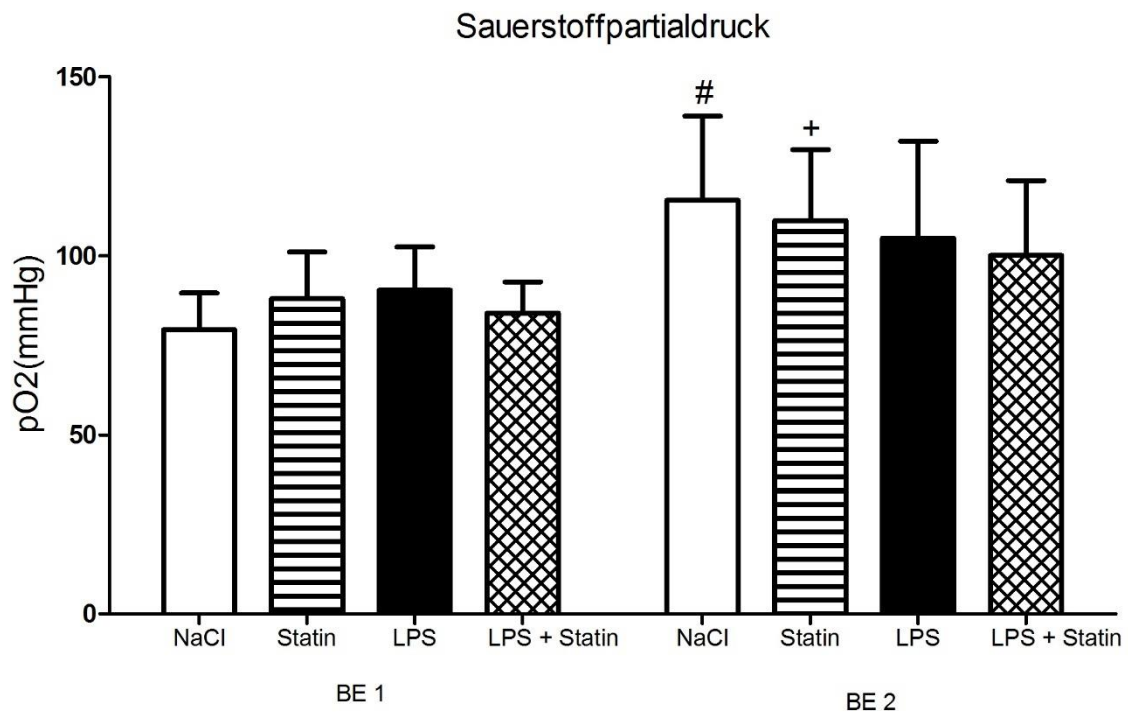


Abb.25: Darstellung des Sauerstoffpartialdruckes (pO<sub>2</sub>) [mmHg]; MW ± SD; n = 10; BE 1 = erste Blutentnahme; BE 2 = zweite Blutentnahme; + = signifikanter (p<0,05) Unterschied zwischen BE1/BE2; # = stark signifikanter (p<0,01) Unterschied zwischen BE1/BE2

## Ergebnisse

### 5.3.2 Kohlendioxidpartialdruck

Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme waren bei allen Gruppen signifikant geringere Kohlendioxidpartialdrucke festzustellen. Die zwei LPS-Gruppen wiesen beim Vergleich der beiden Blutentnahmen einen sehr stark signifikanten ( $p < 0,001$ ) Abfall der Werte auf, die beiden Kontrollgruppen (NaCl bzw. Simvastatin) einen signifikanten ( $p < 0,05$ ) Wert. Bei der zweiten Blutentnahme konnte man feststellen, dass die beiden mit Endotoxin belasteten Gruppen deutlich geringere Werte aufwiesen, als die Kontrollgruppe der Statine. Die NaCl-Kontrollgruppe wies gegenüber der LPS-Gruppe mit  $p < 0,05$  eine geringere Signifikanz auf als gegenüber der LPS + Statingruppe mit  $p < 0,001$ .

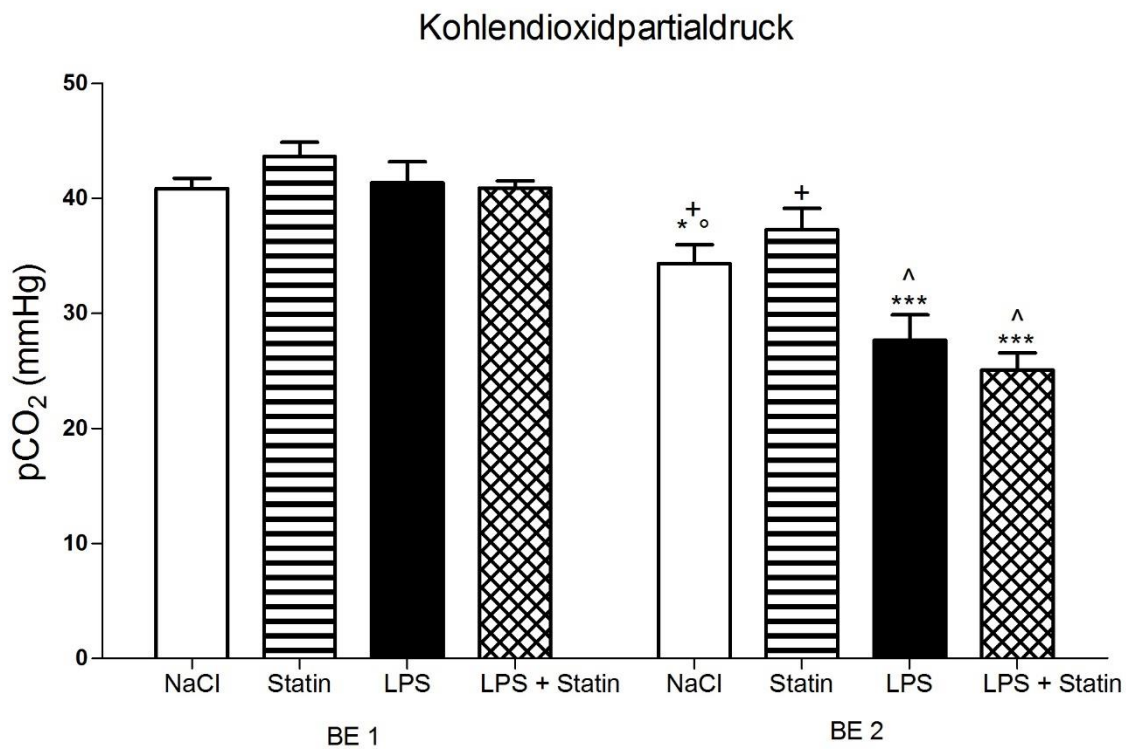


Abb.26: Darstellung des Kohlendioxidpartialdruckes ( $pCO_2$ ) [mmHg] bei zwei Blutentnahmen; BE 1= erste Blutentnahme; BE 2 = zweite Blutentnahme; MW  $\pm$  SD; n = 10; \*\*\* = sehr stark signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied gegenüber der Statinkontrollgruppe ; \* = signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied gegenüber der LPS-Gruppe; ° = sehr stark signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied gegenüber der LPS- + Statingruppe; + = signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied zwischen BE1/ BE 2; ^ = sehr stark signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied zwischen BE1/BE 2

# Ergebnisse

## 5.3.3 Hydrogencarbonat

Bei allen vorliegenden Gruppen konnte eine deutliche Reduktion der Hydrogencarbonatwerte nachgewiesen werden. Beim Vergleich der Blutentnahmen innerhalb der einzelnen Gruppen waren die Werte deutlich ( $p < 0,001$ ) niedriger als die der Ausgangswerte. Außerdem zeigte auch ein Vergleich der LPS-Gruppen mit den Kontrollgruppen, dass es sehr stark signifikante Unterschiede gab ( $p < 0,001$ ).

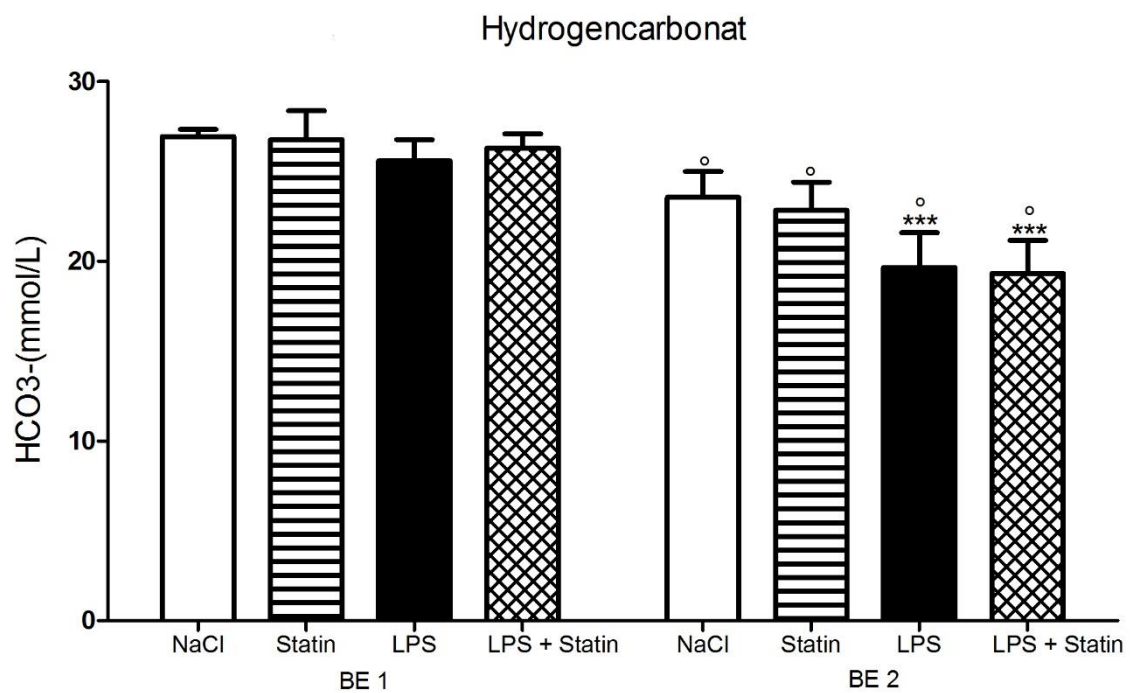


Abb.27: Darstellung des Hydrogencarbonates ( $\text{HCO}_3$ ) [mmol/l] bei zwei Blutentnahmen; BE 1 = erste Blutentnahme; BE 2 = zweite Blutentnahme;  $\text{MW} \pm \text{SD}$ ;  $n = 10$ ; \*\*\* = sehr stark signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied gegenüber der NaCl- sowie der Statinkontrollgruppe; ° = sehr stark signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied zwischen BE1/BE2

## Ergebnisse

### 5.3.4 pH-Wert

Bei keiner der untersuchten Gruppen konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei der NaCl-Kontroll- sowie den beiden LPS-Gruppen war ein leichter Abfall der pH-Werte zwischen der ersten und der zweiten Blutentnahme zu erkennen, wohingegen die Statinkontrollgruppe bei der zweiten Blutentnahme minimal höhere Werte aufwies.

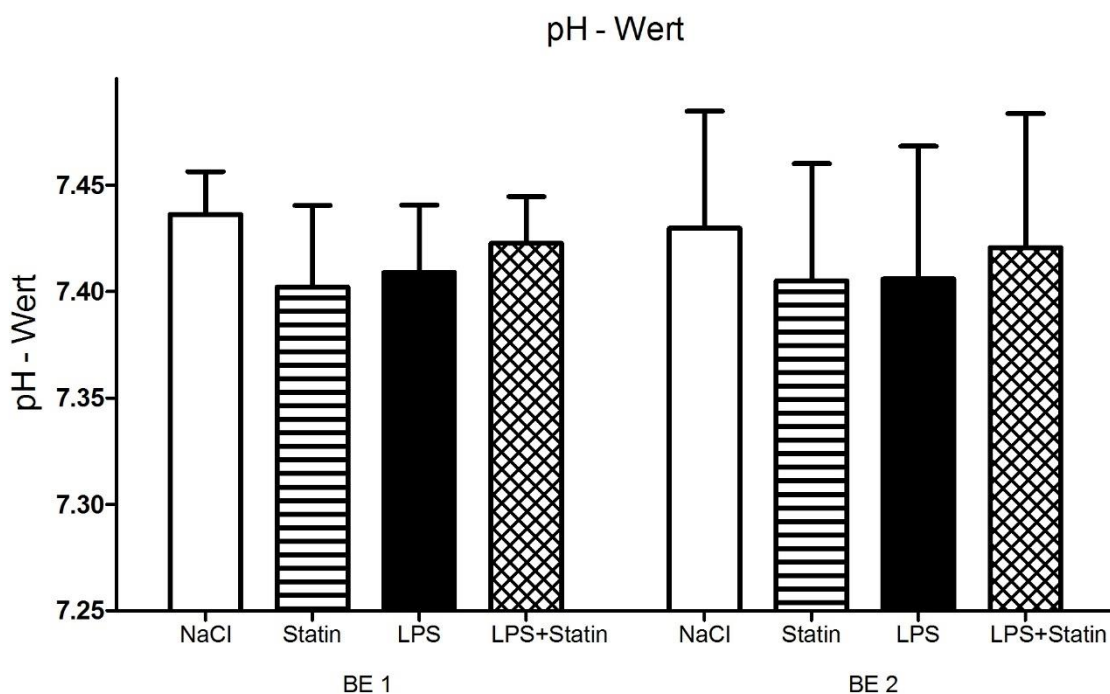


Abb.28: Darstellung des pH-Wertes (pH) bei zwei Blutentnahmen; BE 1 = erste Blutentnahme; BE 2 = zweite Blutentnahme; MW ± SD; n = 10;

## Ergebnisse

### 5.3.5 Laktat

Bei der Analyse der Blutproben, die zu Beginn und am Ende des Experimentes abgenommen wurden, konnte in der zweiten Blutprobe bei den LPS-Gruppen ein signifikant deutlich höherer Laktatspiegel nachgewiesen werden. Während bei der unbehandelten LPS-Gruppe schon ein stark signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen BE 1 und BE 2 vorlag, war der Unterschied bei den behandelten Gruppen nochmals deutlicher ( $p < 0,001$ ). Auch im Vergleich der Statinkontrollgruppe mit den beiden LPS-Gruppen, konnte ein sehr stark signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) beim Laktatwert registriert werden. Bei der NaCl-Kontrollgruppe war nur ein Unterschied im Hinblick auf die behandelte LPS-Gruppe stark signifikant ( $p < 0,01$ ).

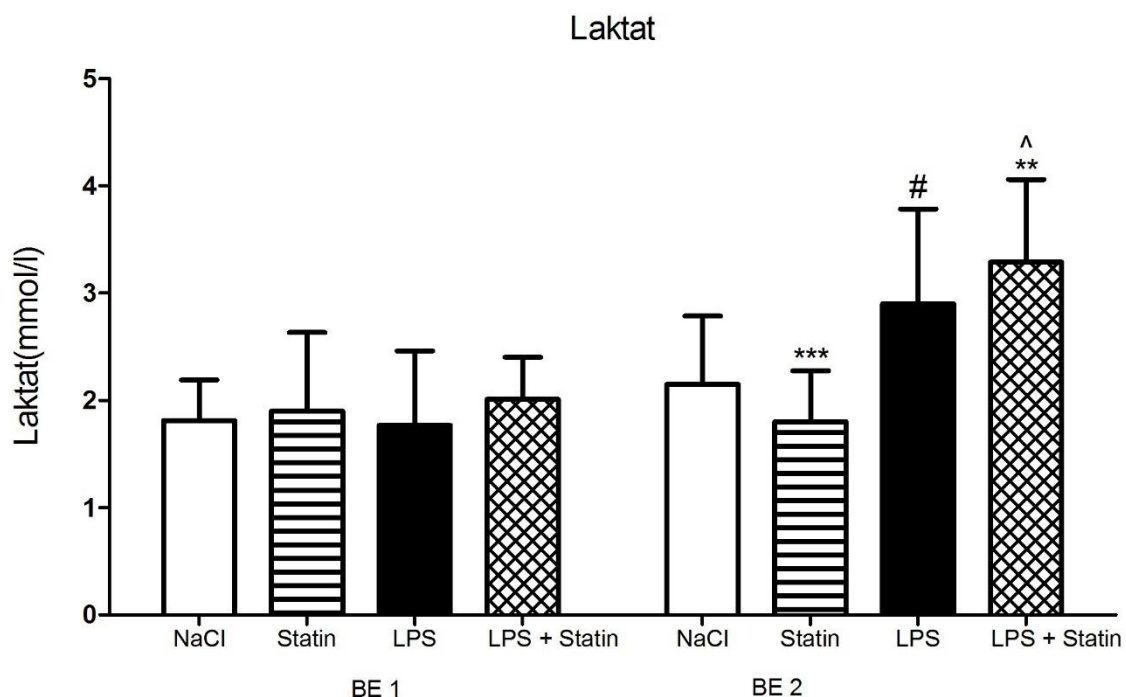


Abb.29: Darstellung des Laktatwertes [mmol/l] bei zwei Blutentnahmen; BE 1 = erste Blutentnahme; BE 2 = zweite Blutentnahme; MW  $\pm$  SD; n = 10; \*\*\* = sehr starker signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied gegenüber den beiden LPS-Gruppen; \*\* = stark signifikanter ( $p < 0,01$ ) Unterschied gegenüber der NaCl-Kontrollgruppe; # = stark signifikanter ( $p < 0,01$ ) Unterschied zwischen BE1/BE2; ^ = sehr stark signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied zwischen BE1/BE2



# Ergebnisse

## 5.4 Zytokine

### 5.4.1 GM-CSF

Bei der ersten Blutentnahme war bei keiner der vier Versuchsgruppen GM-CSF im Plasma messbar. Zum Zeitpunkt der zweiten Blutentnahme kam es bei beiden endotoxinbelasteten Gruppen zu einem Anstieg des GM-CSF-Plasmaspiegels. Bei der LPS-Gruppe wurden  $348 \pm 106$  pg/ml und bei der mit Statin behandelte LPS-Gruppe  $333.8 \pm 38.79$  pg/ml gemessen. Im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen lag hierbei ein sehr stark signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied vor.

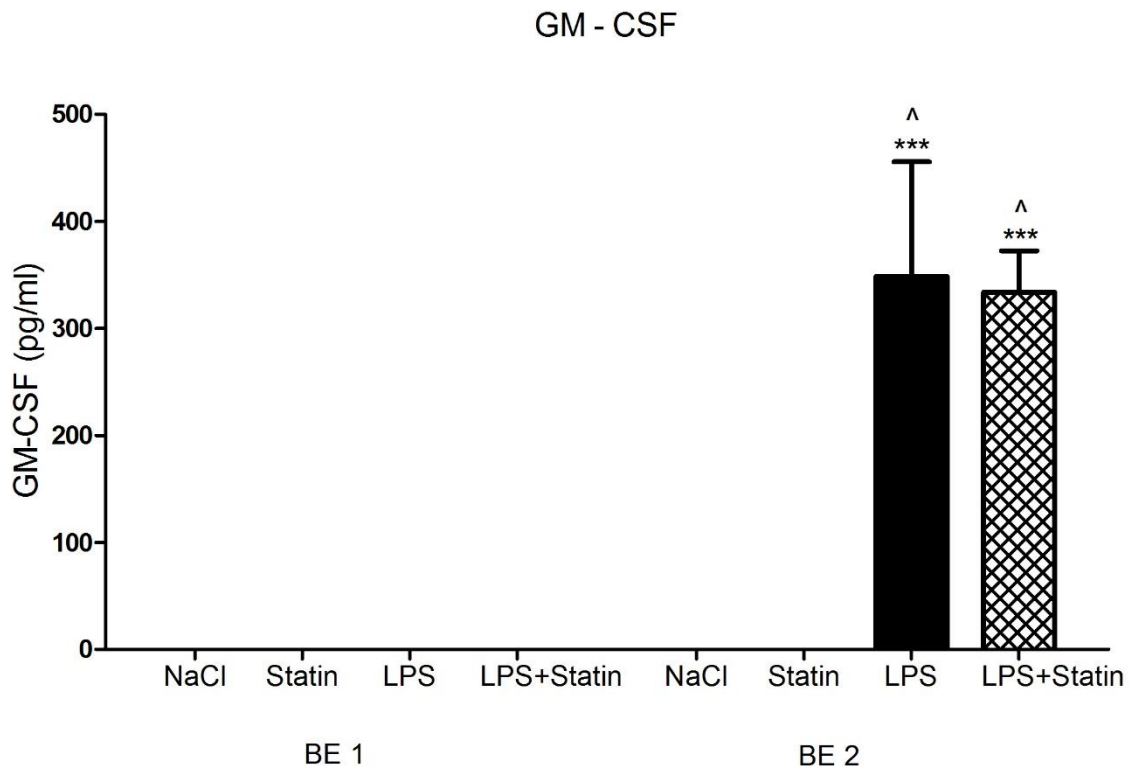


Abb.30: Darstellung des ``Granocyte Macrophage Colony Stimulating Factor`` GM-CSF [pg/ml] bei zwei Blutentnahmen; BE 1 = erste Blutentnahme; BE 2 = zweite Blutentnahme; MW  $\pm$  SD; n = 10; \*\*\* = sehr stark signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied gegenüber der NaCl- sowie der Statinkontrollgruppe; ^ = sehr stark signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied zwischen BE1/BE 2

# Ergebnisse

## 5.4.2 TNF-Alpha

Bei der Bestimmung der TNF-Alpha (TNF- $\alpha$ )-Konzentrationen gab es bei der ersten Blutentnahme keine größeren Auffälligkeiten. Bei der abschließenden Blutentnahme wurden bei allen vier Gruppen höhere Werte festgestellt. Der Anstieg war in allen Gruppen gleichermaßen zu verzeichnen, sodass es keinen signifikanten Unterschied untereinander gab. Einzig der Anstieg innerhalb der jeweiligen Gruppe wies eine Signifikanz auf. Hierbei wurden Konzentration von  $736.8 \pm 204.7$  pg/ml (Statin-kontrollgruppe) und  $680.4 \pm 203.8$  pg/ml (LPS+Statin) gemessen.

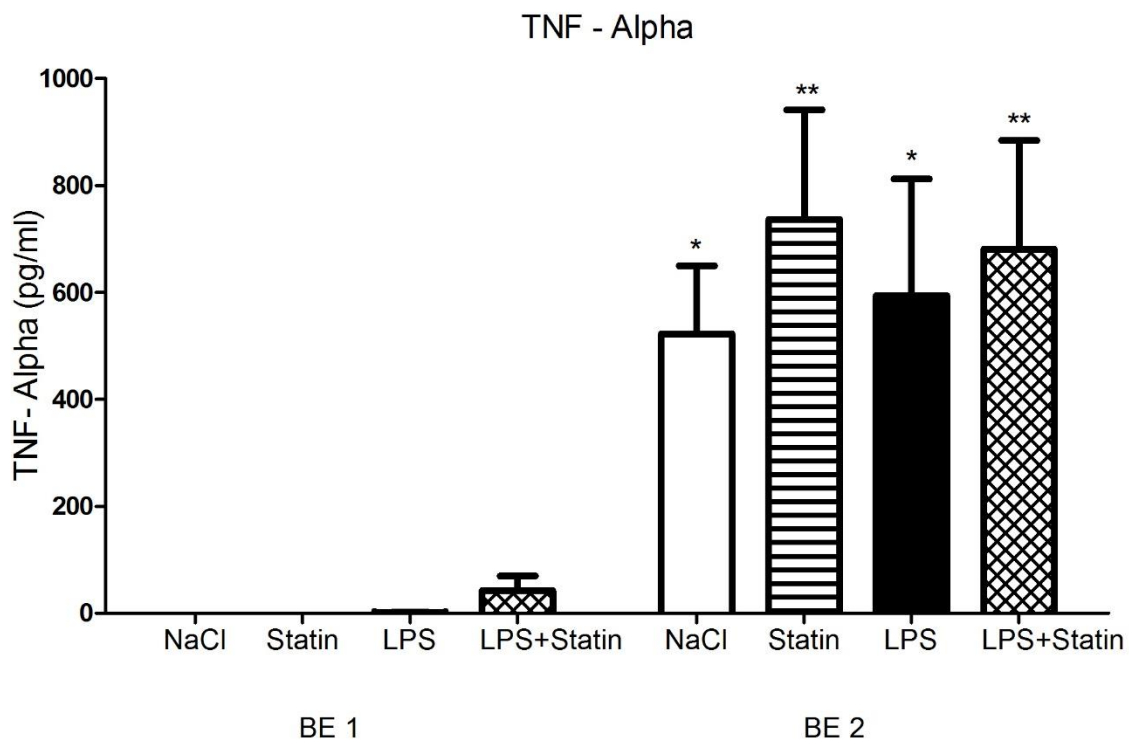


Abb.31: TNF- $\alpha$  Konzentration [pg/ml] bei zwei Blutentnahmen; BE 1 = erste Blutentnahme; BE 2 = zweite Blutentnahme; MW  $\pm$  SD; n = 10; \*\* = stark signifikanter ( $p < 0,01$ ) Unterschied zwischen BE1/BE 2; \* = signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied zwischen BE1/BE 2

## Ergebnisse

### 5.4.3 IL-1 Alpha

Im Rahmen der Zytokinbestimmungen wurden auch die IL-1 Alpha (IL 1  $\alpha$ )-Spiegel untersucht. Dabei wurde bei der zweiten Blutentnahme der endotoxinbelasteten Tiere ein sepsistypischer Anstieg gegenüber der ersten Blutentnahme festgestellt. Die beiden LPS-Gruppen wiesen hierbei mit  $14922 \pm 1056$  pg/ml (LPS+Statin) und  $14937 \pm 2089$  pg/ml (LPS+NaCl) signifikant höhere Werte auf, als die beiden Kontrollgruppen bei BE 2.

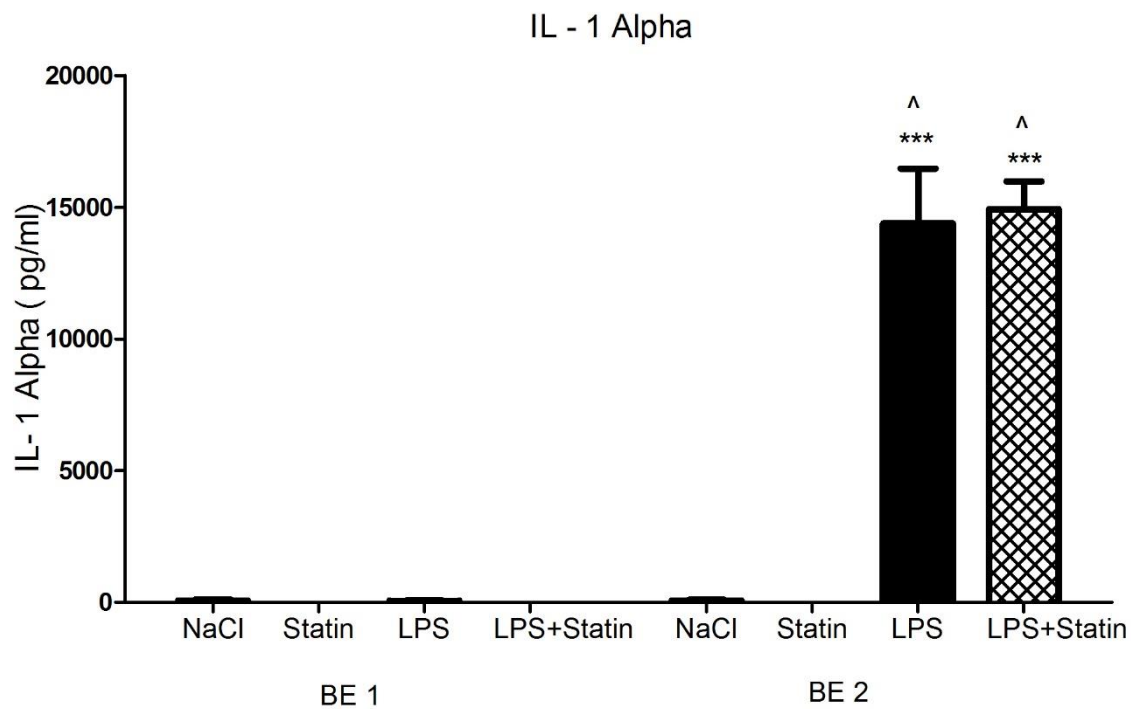


Abb.32: IL-1 Alpha Konzentration [pg/ml] bei zwei Blutentnahmen; BE 1 = erste Blutentnahme; BE 2 = zweite Blutentnahme; MW  $\pm$  SD; n = 10; \*\*\* = sehr stark signifikanter ( $p < 0,001$ ) Unterschied gegenüber den beiden Kontrollgruppen; ^ = signifikanter ( $p < 0,05$ ) Unterschied zwischen BE1/BE 2

### 6 Diskussion

#### 6.1 Allgemein

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Simvastatin auf die intestinale Mikrozirkulation bei tierexperimenteller Sepsis untersucht.

Zum Studium der Sepsisinduktion gibt es verschiedene experimentelle Ansätze. Ziel ist es pathophysiologische Veränderungen, wie sie bei septischen Patienten vorkommen, nachzuahmen. Dabei muss man einen Kompromiss eingehen zwischen klinischem Realismus und experimenteller Vereinfachung einer solchen Studie. In unserem Fall wurde die Sepsisinduktion mittels systemischer Lipopolysaccharidgabe (Endotoxinämie) vorgenommen [104]. Der Vorteil für unseren Versuchsaufbau sahen wir in der quantitativen und qualitativen Reproduzierbarkeit [46] sowie in einer besseren Kontrolle über den zeitlichen Ablauf der Endotoxinämie. Durch die exakt verabreichte LPS-Dosis wird eine gewisse Standardisierung etabliert [105, 50, 106, 54]. Das Endotoxin löst eine starke systemische Inflammation aus. Die rasche Immunantwort bedingt einen zeitlichen Vorteil bei der Planbarkeit des Experimentes.

Unsere Untersuchungen fokussierten sich auf den Darm, denn die Splanchnikusorganen spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Sepsis. Ungefähr 1/3 des Herzzeitvolumens fließt in die Bauchorgane. Die Darmmukosa erhält hiervon den größten Teil mit ungefähr 80%. Die Darmmukosa verfügt über einen hohen Sauerstoffverbrauch, jedoch über keinen Sauerstoffspeicher. Bei einer verminderten Perfusion bzw. einem verminderten Sauerstoffangebot kommt es sehr schnell zu einer Ischämie mit möglichen strukturellen und funktionellen Änderungen der Mukosa. Durch die damit verbundene Störung der Barrierefunktion ist eine vermehrte Translokation der Bakterien in den Systemkreislauf möglich. Dies beschleunigt die Sepsisentwicklung, was letztendlich zu einem Multiorganversagen führen kann [107].

### 6.2 Hämodynamik

Die hämodynamischen Veränderungen bei der Endotoxinämie sind hinreichend bekannt und geben einen Überblick über die Schwere und das Ausmaß der Endotoxinämie. Für die Untersuchung der mikrozirkulatorischen Veränderungen in dieser Arbeit war es notwendig, die Endotoxinämieeffekte auf die systemische Makrohämodynamik möglichst gering zu halten [108].

Unmittelbar nach intravenöser Gabe des LPS wurde in den betreffenden Gruppen zunächst ein signifikanter Abfall des MAB festgestellt. Dieser sank im Mittel um 30 mmHg ab, stabilisierte sich jedoch im weiteren Verlauf und stieg gegen Versuchsende (Zeitpunkt der mikrozirkulatorischen Untersuchung) annähernd auf das Ausgangsniveau an. Die beiden Kontrollgruppen hingegen zeigten durchweg einen stabilen Verlauf. Als Ursache der Hypotonie in den LPS-Gruppen ist die Freisetzung von NO anzunehmen [109]. Die Induktion der NO-Produktion bei klinischer Sepsis zeigt sich verantwortlich für den abfallenden Blutdruck, sowie die Resistenz gegenüber Vasopressoren. Simvastatin ist in der Lage, die NO Freisetzung zu reduzieren und kann somit theoretisch die vaskuläre Reaktion in Rahmen eines septischen Schocks verbessern [110].

In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings kein stabilisierender Einfluss von Simvastatin festgestellt werden. Der Blutdruck und die Herzfrequenz verhielten sich unter Statintherapie im Vergleich zur unbehandelten LPS-Gruppe unverändert. 2004 untersuchte eine Forschungsgruppe um Pleiner et al. in einer randomisierten, placebokontrollierten Studie die potentielle vasoprotektive Funktion von Simvastatin. Dabei erhielten die Testpersonen vorab 80 mg Simvastatin über vier Tage. Die Entzündungsreaktion wurde am letzten Tag durch die Gabe von 2 ng/kgKG LPS ausgelöst. Es konnte gezeigt werden, dass eine hochdosierte Vorbehandlung mit Simvastatin zu einer Reduzierung der Katecholamindosis sowie zu einer Steigerung des peripheren Widerstandes während einer akuten Entzündungsreaktion führte [111]. Auch Giusti et al. konnten in einem Tiermodell zeigen, dass eine Statintherapie vor Auslösen einer Sepsis einen Benefit in Hinblick auf die notwendige Katecholamintherapie aufweist. Dabei wurden allerdings mit 20 bzw. 80 mg/kgKG, deutlich höhere Statindosen verabreicht [59].

## Diskussion

---

Bei der Herzfrequenz wiesen alle vier Gruppen mit ca. 440 Schlägen/min einen ähnlichen Ausgangswert auf. Im Verlauf des Experimentes konnte bei den Kontrollgruppen ein stabiler Verlauf dokumentiert werden. Bei beiden Experimentalgruppen lässt sich nach Medikamentengabe ein Anstieg der Herzfrequenz verzeichnen. Ab dem Zeitpunkt 135 Minuten nach LPS-Gabe konnte bei den Versuchsgruppen eine um 50 Schläge höhere Herzfrequenz verzeichnet werden. Diese Differenz spiegelt einen signifikanten Unterschied wider und entspricht den Verläufen einer Sepsis.

Auch Sato et al. konnten nach intravenöser Gabe von *Escherichia coli* eine gesteigerte Herzfrequenz aufzeichnen. Er fasste das Ganze in zwei unterschiedlichen Phasen zusammen. Einer „hyperdynamen Phase“ mit erhöhter Herzfrequenz und gesteigertem Herzzeitvolumen folgt später eine sogenannte „hypodynamen Phase“ [112]. Diese hämodynamischen Veränderungen werden auch durch die Untersuchungen von Liu et al. beschrieben. [113]. In ihrem tierexperimentellen Ansatz wurden Ratten 10mg/kgKG LPS intravenös appliziert. Über sechs Stunden wurden kardiovaskuläre und metabolische Parameter erhoben. Bei gleichen Ausgangswerten der Versuchsgruppen kam es im Verlauf zu einer Zunahme der Herzfrequenz. Im Vergleich zu den Kontrollgruppen wiesen die Experimentalgruppen eine signifikant höhere Herzfrequenz auf. Im Verlauf näherten sich die Kurven wieder an. Auch bisherige Beobachtungen aus unserem Labor beschreiben diese hämodynamische Entwicklung. In einer tierexperimentellen Untersuchung von Lehmann et al. wurde nach dreißig Minuten ein Anstieg der Herzfrequenz beschrieben, der sich nach zwei Stunden stabilisierte. Aber es zeigte sich eine signifikant erhöhte Herzfrequenz im Vergleich zu den Kontrollgruppen [114].

### 6.3 Funktionelle Kapillardichte

Während der Endotoxinämie kommt es im Rahmen der systemischen Inflammationsreaktion in der Regel zu einer Veränderung der kapillären Durchblutung in der Skelettmuskulatur sowie in der Haut. An Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass es auch zu einer Minderdurchblutung des Darms kommt. Die Folge ist eine Abnahme der intestinalen funktionellen Kapillardichte [115–118]. Es entsteht ein

## Diskussion

---

sogenannter Pendelfluss. Wie stark dabei die Mikrozirkulation gestört wird, zeigte eine Forschungsgruppe um Lam et al. [119]. Sie fanden heraus, dass sich die FCD um 1/3 reduziert und sich der Bereich, in dem kein Fluss nachzuweisen ist, fast verdreifacht [119]. Dies wird auch durch die Ergebnisse einer Arbeit von Lehmann et al. beschrieben. In seinem tierexperimentellen Ansatz reduzierte sich die funktionelle Kapillardichte nach LPS Gabe auch um 1/3 [114]. Im Rahmen einer Sepsis scheint sich eine uneinheitliche Verteilung an funktionellen Kapillaren herauszubilden. An Hand eines mathematischen Modells konnte Walley et al. zeigen, dass eine zunehmende Heterogenität des Blutflusses mit einer kritischen Sauerstoffversorgung verbunden ist [120]. Diese These untersuchten Hummer et al. an einem Tierversuchsmodell mit Schweinen. Eine Sepsis verursacht durch *Escherichia coli*-Gabe führte zu einer steigenden Heterogenität der kapillären Transitzeit. Dies führte zu einem Defizit zwischen Sauerstoffangebot und kritischer Sauerstoffextraktion [121].

Im dem vorliegenden Versuch zeigte sich 120 min nach LPS-Gabe bei der intravitalmikroskopischen Untersuchung in den LPS-Gruppen ein Abfall der Kapillardichte gegenüber der Kontrollgruppe. Dabei wiesen die mit Simvastatin behandelte LPS- Gruppe mit  $54,5 \pm 11,6 \text{ cm/cm}^2$  in der *Lamina muscularis longitudinalis* entgegen den Erwartungen die geringste funktionelle Kapillardichte auf. In der Kontrollgruppe hatte die mit Simvastatin behandelte Gruppe den höchsten Wert. In der *Lamina muscularis circularis* zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Statinkontrollgruppe zeigte wieder die höchste Kapillardichte ( $68,1 \pm 11,6 \text{ cm/cm}^2$ ), während die statinbehandelte LPS-Gruppe auch hier den geringsten Wert aufwies. Es wurde somit kein positiver Effekt des Simvastatins auf die FCD bei Endotoxinämie nachgewiesen. Einen möglichen Zusammenhang könnten wir in der Arbeit von Leung et al finden. In diesem experimentellen Aufbau wurde die Wirkung von Statinen auf den Laktattransport untersucht. Simvastatin blockiert die Monocarboxylat-Transporter (MCTs) und führt somit zu einem Anstieg der Milchsäure um 25-35 %. Durch die additive Wirkung der Sepsis und der medikamentösen Laktatproduktion kann eine Verschlechterung der FCD erklärbar sein. Signifikant war der Unterschied im Vergleich zwischen der gesunden Statin- und der statinbehandelten LPS-Gruppe. In der Mukosa zeigte sich ein ähnliches Bild.

## Diskussion

---

Entgegen der vorliegenden Ergebnisse konnten El Azab et al. in einer Versuchsreihe an Ratten zeigen, dass die Gabe von Simvastatin einen positiven Effekt auf die Kapillardichte hat. Bei einer körperrgewichtsadaptierten Dosis, von 1 mg/kgKG konnte die funktionelle Kapillardichte dabei um ein Vielfaches gesteigert werden [122]. Auch die Gruppe von Dold et al. konnte in ihrer Studie eine protektive Wirkung feststellen. Simvastatin wurde in dem Versuch als Prophylaxe verabreicht.

In einem Mausmodell wurde durch eine Ligatur der Gallenblase eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Vor dem operativen Eingriff wurde Simvastatin in einer Dosierung von 0,2 mg/kgKG appliziert. In der Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Minderung der Anzahl adhärenter Leukozyten kam, was auch eine verbesserte Mikrozirkulation erklärt [123]. Auf vergleichbare Ergebnisse kam eine Gruppe von La Mura et al., die die Wirkung von Simvastatin im Zusammenhang mit einer Leberfunktionsstörung untersuchten. Die Medikamentengabe erfolgte in einer Dosierung von 25 mg/kgKG vor bzw. nach LPS-Gabe. In beiden Fällen konnte eine Endothelschädigung in der Leber verhindert werden. Dabei zeigte sich die protektive Wirkung des Medikamentes auf die Mikrozirkulation [124].

Anlass zur Diskussion ergibt sich aus der Arbeit von Akarsu et al. In einem Versuchsaufbau mit Ratten wurde in einem Ischämie-Reperusionsmodell eine mögliche proangiogene Wirkung von Simvastatin untersucht. Im Hinblick auf die Gewebeprotektion nach Reperfusion konnte durch die Simvastatingabe eine positive Auswirkung auf das Gewebe festgestellt werden. Dabei gab es keine Überlegenheit einer prä- und postinterventionellen Simvastatingabe gegenüber einer alleinigen post-interventionellen Gabe [125]. Eine vorab Gabe scheint hierbei keine Rolle zu spielen. Die Arbeit von Sata et al. liefert weiteren Aufschluss zur Dosierung. Die Autoren kamen zu dem Ergebnis, dass Cerivastatin in einer niedrigen Dosis von 0,5 mg/kgKG einen proangiogenen Effekt auf die Kapillardichte hat. Für eine angiostatische Wirkung beschrieb die Gruppe eine Dosis von 2,5 mg/kgKG. Auch ein Vergleich mit einem anderen Statin zeigte ähnliche Ergebnisse. Bei dem Einsatz von Pitavastatin konnte der Blutfluss innerhalb eines ischämischen Gewebes mit einer niedrigeren Medikamentendosis (1mg/kgKG pro Tag) besser gesteigert werden, als mit einer höheren Dosis (10mg/kgKG pro Tag) [126]. Auch die deutsche Gruppe Haak et al.



konnte in einer doppelt verblindeten Patientenstudie positive Effekte feststellen. Fluvastatin wurde 46 Patienten verabreicht. Nach sechs Wochen Therapie, konnte eine signifikant bessere Mikrozirkulation beobachtet werden. Die Therapie erfolgte über insgesamt 12 Wochen [127]. Mit der von uns gewählten Akutdosis von 0,2 mg/kgKG lässt sich vermuten, dass die Dosis zu niedrig und der Beobachtungszeitraum zu kurz waren, um einen entsprechenden Effekt erzielen zu können.

### 6.4 Leukozytenadhäsion

Die intravasal initiierte Entzündungsreaktion durch LPS ist ein komplexer Prozess, der aus verschiedenen Einzelschritten besteht. Am Anfang steht die sogenannte „Margination“. Hierbei wechseln die Leukozyten aus dem schnell fließenden zentralen Blutstrom in den langsam strömenden Randbereich. Es folgt die endotheliale-leukozytäre Interaktion. Dabei vermitteln die Selektine kurzfristige Bindungen. Somit erweckt es den Anschein, dass die Leukozyten am Endothel entlang „rollen“ [128]. Dies wurde mittels Intravitalmikroskopie als Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten („Roller“) quantifiziert. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Expression von Integrinen, die für eine feste Bindung der Leukozyten am Endothel sorgen, den sogenannten permanent adhärenenten Leukozyten („Sticker“) [129, 130]. In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen einer Sepsis zu einer Zunahme der Anzahl adhärenenten Leukozyten in der Mikrozirkulation kommt. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls überprüft [131, 117].

Bei der Auswertung der Anzahl der rollenden Leukozyten zeigte sich in der LPS-Gruppe eine deutliche Zunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe (V1-Venolen). Die Statinkontrollgruppe wies minimal mehr „Roller“ auf als die der NaCl-Kontrollgruppe und die mit statinbehandelte LPS-Gruppe konnte weniger „Roller“ verzeichnen als die LPS Gruppe. Diese Ergebnisse waren aber statistisch nicht signifikant.

Bei den Rollern in den V3-Venolen gab es ein eindeutigeres Ergebnis. Die LPS-NaCl-Gruppe lag mit  $1,4 \pm 0,9$  /mm<sup>2</sup> signifikant unter dem Ergebnis der NaCl-Kontrollgruppe

## Diskussion

---

( $2,83 \pm 1,4$  /mm<sup>2</sup>) und der Statingruppe ( $3,8 \pm 2,3$  /mm<sup>2</sup>). Die statinbehandelte LPS-Gruppe wies mit  $1,0 \pm 0,7$  /mm<sup>2</sup> die geringste Anzahl an rollenden Leukozyten auf.

In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Simvastatin die Leukozytenadhärenz vermindert. Dabei wird die Expression von P-Selektin reduziert und steht nicht mehr für die leukozytär-endothelialen Verbindungen zur Verfügung, wodurch das sogenannte „Rolling“ vermindert wird. Auch  $\beta_2$ -Integrine, wie das lymphozytenfunktionsassoziierte Antigen-1 (LFA-1; CD11a/CD18) und der Makrophagenrezeptor-1 (MAC-1; CD11b/CD18), werden vermindert exprimiert [132, 133]. In einer neueren Arbeit von Mijares et al. wurde an 40 Probanden gezeigt, dass Simvastatin die Leukozyten-Endothelinteraktion reduziert und die Geschwindigkeit der Leukozyten erhöht [134]. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden.

Bei der Auswertung der permanenten Leukozytenadhärenz in V1-Venolen zeigte sich folgendes Bild:

Beide LPS-Gruppen wiesen im Vergleich zu den Kontrollgruppen doppelt so viele adhärenente Leukozyten auf. Auch in den kleineren Venolen der dritten Ordnung war ein Anstieg der Anzahl der adhärenenten Leukozyten zu verzeichnen. Dabei wurden mit  $196,5 \pm 55,0$  /mm<sup>2</sup> (LPS+NaCl) und  $154,9 \pm 80,3$  /mm<sup>2</sup> (LPS+Statin) doppelt so viele permanent adhärenente Leukozyten gezählt, als in den vergleichbaren Kontrollgruppen mit  $76,1 \pm 33,4$  /mm<sup>2</sup> (NaCl+NaCl) und  $96,9 \pm 43,2$  /mm<sup>2</sup> (NaCl+Statin).

Dieses Ergebnis ist mit dem bereits beschriebenen Konzept vereinbar, dass es im Rahmen einer Entzündung zu einer chemotaktischen Aktivierung kommt, wodurch mehr feste Bindungen mit dem Endothel entstehen [128]. Bei der Analyse der permanent adhärenenten Leukozyten lässt sich ein protektiver Effekt, wie ihn Mijares et al. und Prüfer et al. beschrieben haben, von uns nicht bestätigen. Zwischen den beiden LPS Gruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied [132, 134]. Dabei lässt sich vermuten, dass es in der kurzen Beobachtungszeit zu keiner ausreichenden Veränderung der Leukozyten/Endothelinteraktion kommt. Zudem wurde in unserer Arbeit Simvastatin zur medikamentösen Therapie verabreicht.

## Diskussion

---

In einer Studie von Dold et al. wurde Simvastatin in einer Dosierung von 0,2 mg/kgKG intraperitoneal, als Prophylaxe vor dem operativen Eingriff verabreicht. In einem Mausmodell wurde mittels Ligatur der Gallenblase eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass es zu einer signifikanten Minderung der Leukozytenadhäsion kommt. Dadurch lässt sich auch eine verbesserte Mikrozirkulation erklären [123].

Auch in einer Arbeit von McGown et al. konnte gezeigt werden, dass Statine einen protektiven Einfluss auf die Leukozytenadhärenz haben. In einem Rattenmodell wurde Atorvastatin in einer Dosierung von 0,2 mg/kgKG 18 Stunden und drei Stunden vor der LPS-Injektion verabreicht. Die LPS-Injektion erfolgte über eine 4 Stunden-Kurzinfusion in einer Dosierung von 150 µg/kgKG/h. Die Leukozytenaktivität wurde mittels Intravitalmikroskopie untersucht. Durch die Statingabe konnte die Leukozytenadhärenz um ca. 2/3 gesenkt werden [135]. Zu diesem Ergebnis kamen auch Gottschalk et al. In einer Arbeit mit arthritischen Mäusen untersuchten sie die Leukozytenadhärenz unter einer therapeutischen Dosierung von 40 mg/kgKG Simvastatin. Dabei kamen Sie zu dem Ergebnis, dass diese medikamentöse Therapie zu einer signifikanten Abnahme der Leukozyten-Endothelinteraktion führte [136].

Nach guten Ergebnissen in Bezug auf das Überleben durch die prophylaktische Gabe von Simvastatin untersuchten Merx et al. den Effekt im Rahmen eines therapeutischen Ansatzes. Septischen Versuchstieren wurde sechs bzw. 18 Stunden nach Sepsisbeginn das Medikament verabreicht. Bei der Analyse der Leukozytenzahlen zeigte sich, dass diese unter der Statintherapie, im Vergleich zur Kontrollgruppe, rückläufig waren. Insgesamt konnte auch hier eine Verlängerung der Überlebensrate registriert werden [137].

Zur Beantwortung der Frage, wann der beste Zeitpunkt der Medikamentengabe sei, liefert die Arbeit von Pruefer et al. zusätzliche Hinweise. Im Tiermodell wurde Simvastatin in einer Dosierung von 50 bzw. 100 µg/kgKG 18 Stunden vor Toxinapplikation verabreicht. Zur Aktivierung der Endotoxinämie wurden 40 µg/kgKG Staphylococcus aureus-Toxin gegeben. Durch die Toxinwirkung wurden P-Selektin- und der ICAM-1-Spiegel erhöht, welche für die Leukozytenadhäsion notwendig sind. Eine signifikante Zunahme der Leukozytenadhärenz war nach 30 Minuten festzustellen. Im Rahmen der Intravitalmikroskopie konnte ein signifikanter Effekt der Statingabe auf die „Roller“ und „Sticker“ beobachtet werden. Die Anzahl war unter

## Diskussion

---

Medikamentengabe deutlich rückläufig gegenüber der Kontrollgruppe. Dies beruht darauf, dass es im Rahmen einer inflammatorischen Reaktion zu einer endothelialen Dysfunktion kommt. Die Stickstoffmonoxid abhängige P-Selektin-Bereitstellung bewirkt eine Zunahme der Leukozyten-Endothelinteraktion. Durch die Statingabe kommt es zu einer Stabilisierung der endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase sowie zu einer, Nf-kB vermittelten Verminderung der iNOS. Die endotheliale Funktion wird verbessert und wieder hergestellt. Durch die nun verminderte P-Selektin-Bereitstellung kommt es folglich zu einer geringeren Anzahl an Leukozyten-Endothel-interaktionen [138].

### 6.5 Blutgasanalyse

Während des gesamten Versuchsablaufes wurde an zwei festgelegten Zeitpunkten eine Blutentnahme durchgeführt. Dafür wurde jeweils der Port des arteriellen Zugangs genutzt. Die erste Blutentnahme „BE1“ erfolgte am Ende der Präparation, um einen Überblick über den Säure-Basen-Status sowie die Blutgase vor der LPS- und vor der Medikamentengabe zu erhalten. Hierbei galt es den möglichen Einfluss von Stress oder Schmerzen auf die Resultate zu beachten. Die zweite Entnahme „BE2“, im Anschluss an die Intravitalmikroskopie, sollte den Effekt der Endotoxinämie mit und ohne experimentelle Statintherapie untersuchen.

Bei der zweiten Blutentnahme sahen wir Veränderungen des Sauerstoff- sowie des Kohlendioxidpartialdruckes. Der Sauerstoffpartialdruck zeigte bei allen Gruppen einen Anstieg der Werte auf ca. 100 mmHg. Signifikant war dies aber nur in den Kontrollgruppen. Bei den LPS-Gruppen kam es dagegen zu keiner signifikanten Steigerung. Während sich die Kontrollgruppen offensichtlich von einer initialen Atemdepression durch die Narkoseeinleitung gut erholten, hatten die LPS-Tiere möglicherweise durch eine toxische Schädigung des Lungengewebes Probleme bei der Sauerstoffversorgung. In den vorliegenden Ergebnissen konnten wir im Gegensatz zu einer Gruppe von Li et al. keinen protektiven Effekt durch Simvastatin feststellen. In der Studie von Li et al. wurde Simvastatin über vier Tage, vor LPS Injektion, in einer 20fach höheren Dosierung verabreicht. Das LPS wurde den Ratten mit 5 mg/kgKG

## Diskussion

---

intraperitoneal injiziert. In der Studie kam es bei den septischen Tieren nach Statingabe zu einem Anstieg des Oxygenierungsindex nach Horovitz [139].

Durch die LPS-induzierte Hyperventilation kommt es in der Regel zur Reduktion des Kohlendioxidpartialdruckes. Hypokapnie ist ein Frühzeichen einer Sepsis [140]. In unserem Versuch kam es bei der zweiten Blutentnahme zu einem sehr stark signifikanten Abfall des pCO<sub>2</sub> Wertes im Vergleich zur ersten. Ein Vergleich mit einer Arbeit von Tang et al. lässt die LPS-Gabe als Ursache vermuten [141].

Bei der Analyse des pH-Wertes sind die Werte bei „BE2“ zwar geringer, die Unterschiede erreichen aber kein Signifikanzniveau. Die Versuchstiere sind in der Lage eine potentielle LPS-induzierte metabolische Azidose respiratorisch zu kompensieren und damit den Wert stabil zu halten.

Während einer systemischen Entzündungsreaktion kommt es zu einem Anstieg des Laktatspiegels. In unserem Versuch konnte bei den LPS-Gruppen eine deutliche Steigerung des Laktatspiegels festgestellt werden. Bei der zweiten BE lagen die Konzentrationen um die 3 mmol/L. Somit spricht man von einer Hyperlaktatämie. Das Laktat stellt bei einer Inflammation einen guten Parameter für das Vorliegen einer Gewebhypoxie dar [142]. Bei der zweiten Blutentnahme ist der Laktatwert der behandelten LPS-Gruppe sogar höher als der der unbehandelten LPS-Gruppe. Die höhere Laktatkonzentration der behandelten LPS-Gruppe lässt vermuten, dass das Medikament sich auf die Laktatproduktion auswirkt. In der Literatur ist ein solcher Effekt bei Menschen [143, 144] und Tieren [145, 146] beschrieben worden. Dabei spielt der Einfluss auf die mitochondriale Atmungskette eine Rolle [147–149]. Vergleicht man dazu die pCO<sub>2</sub>-Werte, sieht man, dass es bei der behandelten LPS-Gruppe zu einem niedrigeren pCO<sub>2</sub>-Wert kommt. Hierbei lässt sich vermuten, dass das Tier eine metabolische Azidose respiratorisch versucht zu kompensieren. Eine Azidose lässt sich durch eine gesteigerte Laktatproduktion im Rahmen einer anaeroben Glykolyse erklären. Durch die Endotoxinfreisetzung kommt es zu einer Hemmung der Pyruvatdehydrogenase [150]. Diese Beobachtungen lassen sich auch auf den Krankheitsverlauf beim Menschen übertragen. Standardmäßig wird im Zusammenhang mit der Sepsis der Laktatspiegel als Indikator für die Schwere und die Prognose einer Sepsis genutzt [151]. Aufgrund dieser Erkenntnis fand die Empfehlung

zur Bestimmung des Laktatspiegels als zusätzlicher Laborparameter Einzug in die aktuelle Sepsisleitlinie von 2016. In vielen Vergleichsarbeiten wurde, als Zeichen steigender Mortalität, immer wieder ein Cut-off von 2 mmol/l beschrieben. Bei Anzeichen einer Sepsis mit hämodynamischer Instabilität und vorliegenden Laktatwerten > 2 mmol/l liegt ein septischer Schock vor [152]. Auch eine australische Arbeitsgruppe um Shetty et al. konnte ebenfalls zeigen, dass eine Sepsis-Diagnostik mit Laktatbestimmung deutlich sensitiver ist [153].

### 6.6 Zytokine

Im Rahmen einer Sepsis kommt es zu einer Zytokinüberproduktion und -dysregulation („*Cytokine Storm*“)[154]. Statine sind in der Lage die körpereigenen Immunreaktionen zu modulieren, indem sie wichtige nukleäre Transkriptionsfaktoren regulieren. Dies betrifft im Besonderen die durch LPS bedingte Aktivierung von Nuclear Factor kappa B (NF- $\kappa$ B) [155, 156]. In unserer Arbeit richteten wir das Augenmerk auf die proinflammatorischen IL1- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  und GM-CSF.

#### 6.6.1 GM-CSF

Der GM-CSF wird von unterschiedlichen Zellen gebildet. Dazu zählen die T-Zellen, die Mastzellen, die endothelialen Zellen und die Fibroblasten. Das Wachstum der weißen Blutzellen wird angeregt, und die Differenzierung von Neutrophilen, Eosinophilen, Basophilen und Monozyten stimuliert. Mera et al. haben bei Patienten, die an einer Sepsis starben, einen kontinuierlichen Anstieg der GM-CSF Spiegel beschrieben [157].

Im Rahmen einer in vitro Studie untersuchten Lendemanns et al. dagegen die therapeutische Gabe von GM-CSF [158]. Dies macht Sinn, wenn es im Verlauf der Sepsis zur Erschöpfung des Immunsystems gekommen ist („*Immune Paralysis*“) und die Abwehrfunktion gegenüber (sekundären) Infektionen extrem geschwächt ist. Die Gabe von GM-CSF zeigte vielversprechende Ansätze in Tiermodellen [159, 160]. Auch Meisel et al. konnten einen positiven Effekt im Rahmen einer Studie an 39

## Diskussion

---

septischen Patienten zeigen. Als Endpunkt galt Tag 28, die Entlassung bzw. der Tod des Patienten. Zusammenfassend stellt die Zytokintherapie eine sichere und effektive Behandlung, mit einer verkürzten Beatmungszeit sowie einer verkürzten Krankenhausverweildauer dar [161].

Um sich einen Überblick über die Datenlage zu verschaffen, führte eine Forschergruppe um Bo eine Metaanalyse von Studien mit nahezu 2000 Patienten durch. Am Ende konnte aber der Nutzen nicht eindeutig belegt werden um GM-CSF in die Routine-Therapie für Patienten mit Sepsis aufzunehmen [162].

In unserer Versuchsreihe war ein deutlicher Anstieg von GM-CSF, als Zeichen der Sepsis zu verzeichnen. Innerhalb der Endotoxinämiegruppen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Untersuchungen. In einer amerikanischen Studie konnte gezeigt werden, dass unter Statintherapie die GM-CSF-Plasmalevel sinken [163].

### 6.6.2 TNF- $\alpha$

Der TNF- $\alpha$  gehört zu den am besten untersuchten Zytokinen im Rahmen einer Sepsis. Durch die LPS-Injektion verursacht, kommt es bereits nach 1,5 Stunden zu einem Peak der TNF- $\alpha$ -Plasmakonzentration. Viele Zellen, insbesondere die Leukozyten, aber auch endo- und epitheliale Zellen, tragen dazu bei. Fraunberger et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass durch die Statinwirkung die TNF- $\alpha$ -Freisetzung verringert wird. Die Autoren vermuteten, dass dies auf eine verringerte NF- $\kappa$ B-Aktivität zurückzuführen ist [164]. Eine klinische Forschergruppe um Shyamsundar et al. verabreichte 30 Probanden 40 mg beziehungsweise 80 mg Simvastatin vier Tage vor LPS-Applikation. Bei den so behandelten Probanden wurde eine geringere TNF- $\alpha$ -Plasmakonzentration nachgewiesen [165]. Therapeutisch wurde auch versucht, mittels Antikörper den TNF- $\alpha$ -Spiegel zu beeinflussen. Hierfür findet man in der Literatur kontroverse Ergebnisse. Aikawa et al. benutzten einen TNF- $\alpha$  Antikörper gegen menschlichen TNF- $\alpha$ . Dabei wurde der Plasmalevel des TNF- $\alpha$  gesenkt. Die Ergebnisse zeigten, dass die 28 Tage-Mortalität gesenkt werden konnte. Die Autoren fügten jedoch an, dass die Patientengruppe, mit 20 Patienten zu klein sei um

## Diskussion

---

definitive Schlussfolgerungen ziehen zu können [166]. Dem widersprachen die Ergebnisse einer neuseeländischen Forschergruppe um Clark et al. Zwar konnte ein Einfluss auf die Temperatur sowie auf das kardiovaskuläre System festgestellt werden, ein Effekt auf die 28 Tage-Sterberate war jedoch nicht zu detektieren [167]. Letzten Endes lässt sich aus der Literatur keine eindeutige Schlussfolgerung ziehen.

Um sich einen Überblick zu verschaffen, wurde durch eine chinesische Arbeitsgruppe eine ausführliche Literaturrecherche durchgeführt. Nach einem Auswahlverfahren wurden 17 Studien eingeschlossen mit ca. 9000 Patienten. Im Vergleich konnte gezeigt werden, dass es unter Anti-TNF $\alpha$ -Therapie zu einer signifikanten Reduktion der 28 Tage Mortalität kommt. Dabei ist der Effekt in den Stadien vor einem septischen Schock größer als im Schock selbst. Auch wenn es sehr vielversprechende Resultate gibt, wurden auch Grenzen aufgezeigt, die einen alltäglichen Gebrauch in der Klinik erschweren. In den zugrunde liegenden Studien gab es keine einheitliche Dosierung bei der Verabreichung der TNF $\alpha$ -Antikörper und auch keine einheitliche Therapiedauer [168]. Vereinbar mit den unterschiedlichen Studien zeigte sich auch eine Untersuchung von Lorente et al. Allgemein konnte an Patienten und in Tiermodellen gezeigt werden, dass der Plasmaspiegel von TNF- $\alpha$  im Laufe eines septischen Geschehens ansteigt [169]. Darauf aufbauend untersuchte eine Gruppe um Neto et al. an Hand von tierexperimentellen Daten die Wirkung von Simvastatin auf den TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel. In einer Versuchsreihe an Wistar-Ratten konnten die Autoren zeigen, dass Simvastatin, verabreicht in einer Dosierung von 10 mg/kg/KG, eine Auswirkung auf den TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel bei Sepsis hat. Die Werte lagen bei den behandelten septischen Ratten ca 50% niedriger als bei den unbehandelten septischen Ratten, Eine Aussage auf die Mortalität als Endpunkt konnte hierbei nicht getroffen werden, da dies nicht Gegenstand der Versuchsreihe war[170].

Wir konnten wie zu erwarten war ein Ansteigen der TNF- $\alpha$ -Plasmaspiegel bei experimenteller Sepsis beobachten. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien ließ sich in unserer Untersuchung eine Reduktion der Plasmaspiegel durch die Statingabe nicht reproduzieren.



### 6.6.3 IL-1 $\alpha$

IL-1 $\alpha$  zählt wie TNF- $\alpha$  zu den ausgiebig untersuchten Zytokinen im Rahmen der Pathophysiologie einer Sepsis. Genauso wie TNF- $\alpha$  wird IL-1 $\alpha$  zu einem frühen Zeitpunkt bei der Sepsis freigesetzt [154]. IL-1 $\alpha$  ist wichtig für die Entstehung von Fieber, die Gerinnungsaktivierung und die Hämatopoese. Zudem fördert IL-1 $\alpha$  die Extravasation von inflammatorischen Zellen. In Sepsismodellen konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\alpha$  bedeutend zur Verstärkung der inflammatorischen Kaskaden beiträgt. In unserem Versuchsmodell konnten wir wie erwartet einen Anstieg der Konzentration feststellen, jedoch ohne einen Effekt durch die Simvastatingabe zu erreichen. Mit Hilfe von monoklonalen IL-1 $\alpha$ -Antikörpern wurden bereits Therapieveruche unternommen. Nach anfänglich positiven Resultaten in Sepsismodellen konnten in klinischen Studien aber keine vergleichbaren Erkenntnisse erzielt werden [171]. Die Ursache für das Versagen liegt möglicherweise in der kurzzeitigen Verweildauer der Antikörper in der Zirkulation [172].

### 6.7 Limitierung

Da Simvastatin in seiner lipidmodulierenden Wirkung sehr verbreitet ist, stellt eine potenzielle proangiogene Wirkung im Bereich der Sepsistherapie einen interessanten therapeutischen Ansatz dar. In bisherigen Untersuchungen wurde das Medikament vielversprechend an Menschen und Tieren untersucht. Im Gegensatz zu unserem Tiermodell wurde es in höheren Dosierungen bzw. auch deutlich vor einer LPS-Applikation eingesetzt. Die Dosis und der Applikationszeitpunkt stellten ein wesentliches Kriterium dar. Im Vergleich zu bisherigen Versuchsabläufen wählten wir eine Arzneimittelgabe nach LPS-Induktion.

Wie bereits erwähnt, ist die Sepsis ein Krankheitsbild mit hoher Mortalitätsrate. Vor allem ältere Patienten mit zahlreichen Komorbiditäten erkranken daran [53]. In unserem Versuchsaufbau wurden nur junge Tiere verwendet, was eine erste Limitierung bedeutet. Diese weisen im Gegensatz zu einem älteren Patientenklientel geringe Komorbiditäten auf. Somit fehlt das Spektrum des heterogenen

## Diskussion

---

Patientenkollektivs [47, 46]. Der Vorteil bei diesem Modell ist in der schnellen kardiovaskulären Reaktion und Entzündungsantwort zu sehen. LPS als Wirkstoff für eine Inflammation ist auch kritisch zu hinterfragen [50, 56]. Durch die LPS-Gabe wird nur ein Zellwandbestandteil appliziert. Dies steht im Gegensatz zu den meist polymikrobiell ausgelösten Entzündungen. Hierbei können mögliche Reaktionen auf unterschiedliche Pathogenitätsfaktoren nicht berücksichtigt werden. Da wir im Versuchsaufbau nur eine LPS-Charge verwendet haben, ist auch hier eine fehlende Variabilität des Endotoxins anzuführen.

Trotzdem ist das Modell der systemischen Entzündung auf Grund der schnellen Wirksamkeit von LPS sehr gut geeignet um neue Therapien für akute Entzündungen untersuchen zu können. Durch unseren Versuchsaufbau befinden wir uns in einem Bereich der Akuttherapie.

Die respiratorische Insuffizienz der Tiere konnte durch die Simvastatingabe nicht gebessert werden. Es kam zu einer sepsistypischen Hyperventilation sowie einer deutlich eingeschränkten Oxygenierung. Bisherige Erkenntnisse, die eine Besserung der Oxygenierung unter Simvastatingabe in einer Sepsis beschreiben, konnten von uns nicht aufgezeigt werden [139]. Durch die niedrige Medikamentendosis scheint es zu keiner ausreichenden Reduktion der NO Freisetzung zu kommen und somit auch nicht zu einer erhofften Kreislaufstabilisierung im Rahmen der Inflammation [173]. Durch den von uns gewählten Zeitpunkt der Medikamentenapplikation, nach Endotoxinämieinitiierung, konnte möglicherweise eine fortschreitende toxische Störung auf verschiedenen Ebenen des Körpers nicht beeinflusst werden. Eventuell ist zu diesem Zeitpunkt eine Verstärkung der Laktatproduktion durch Simvastatin wie in anderen Arbeiten beschrieben zum Tragen gekommen.

Auch im Hinblick auf die Mikrozirkulation und Leukozyten-Endothelreaktion zeigte sich bei uns kein Benefit der Statingabe. Bisherige erfolgversprechende Studien oder Versuchsaufbauten benutzten höhere Medikamentendosen bzw. eine Medikamentenapplikation vor Beginn der Endotoxinämie [135, 123].

Die deutlich besseren Ergebnisse in anderen Studien lassen darauf schließen, dass das Medikament eher in einem präventiven Ansatz eine potentere Wirkung aufzeigen kann [134]. Bei der experimentellen Untersuchung von Prüfer et al. konnte

## Zusammenfassung

---

eine protektive Wirkung bei einer Vorabgabe von 18 Stunden gezeigt werden. Allerdings war eine solche Reaktion bei einer Gabe unmittelbar vor Auslösen einer Endotoxinämie nicht mehr zu beobachten [173].

Die für eine Sepsis typische Zytokindysregulation wurde auch in unserem Fall beachtet und untersucht. Dabei konnten wir eine typische Steigerung der Zytokine feststellen. Eine protektive Wirkung des Simvastatins blieb jedoch aus.

Eine Aussage über langfristige Effekte bezüglich der medikamentösen Therapie ist nicht möglich. Aufgrund des weit verbreiteten Medikamentes ist es vielversprechend, an dieser präventiven Maßnahme weiter zu forschen.

## 7 Zusammenfassung

Eine Sepsis ist die schwerste Verlaufsform einer akuten Infektion. Sie stellt trotz intensiver Forschung und einer langen Historie insbesondere den intensivmedizinischen Bereich immer wieder vor neue Herausforderungen. Die Ausprägungen können sich auf zirkulatorischer, zellulärer und metabolischer Ebene zeigen und imponieren durch vielseitige klinische Manifestationen. Bedingt durch die aktuelle Altersstruktur der Bevölkerung und den zahlreichen Komorbiditäten stellt die Sepsis ein Krankheitsbild mit hoher Sterblichkeitsrate dar.

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir im Tiermodell die pleiotropen Wirkungen von Simvastatin in der Sepsis bei experimenteller Endotoxinämie. Damit griffen wir die Ergebnisse klinischer Studien auf, die besagen, dass eine Veränderung des Fettstoffwechsels die Mortalität der Sepsis verringert.

Unser Interesse richtete sich dabei auf die intestinale Mikrozirkulation. Mittels Intravitalmikroskopie wurde die Leukozytenadhärenz der Venolen der submukösen Darmwand und die funktionelle Kapillardichte in den unterschiedlichen Schichten der Darmwand untersucht. Da sich die Sepsis sehr vielseitig manifestiert, erfolgte begleitend zu dem Versuchsablauf eine kontinuierliche Messung der

## Zusammenfassung

---

hämodynamischen Parameter. Mit Hilfe von repetitiven Blutentnahmen, wurden die metabolischen Veränderungen protokolliert.

Nach LPS induzierter Endotoxämie führte die Simvastatingabe im Versuchsablauf zu keiner Verbesserung der infektypischen, hämodynamischen intestinalen Situation. In der Intravitalmikroskopie zeigten sich keine proangiogenen Veränderungen der Kapillardichte in der Lamina muscularis longitudinalis und circularis. Bei der Beobachtung der Leukozyten-Endothelinteraktion konnte zwar ein Anstieg der Leukozytenadhärenz festgestellt werden, jedoch kein protektiver Effekt nach Medikamentengabe.

Unsere Hypothese, dass eine Lipidmodulation mit Simvastatin in der akuten Sepsistherapie eine wichtige Rolle spielen könnte, wurde in unserem Versuchsaufbau nicht nachgewiesen. Die pleiotropen Effekte des Medikamentes in niedriger Dosierung scheinen keinen Einfluss auf das septische Geschehen zu haben. Die von uns vermutete Wirkung scheint eher bei einer prophylaktischen und langfristigen Einnahme gegeben zu sein. Dies könnte Gegenstand der Betrachtung von weiteren Untersuchungen sein.

Auch eine initial höhere therapeutische Dosierung und mehrfach Gabe eines Statins über einen längeren Zeitraum könnte Gegenstand einer weiteren Untersuchung sein.

### 8 Literaturverzeichnis

1. Kidd J. Life after statin patent expiries. *Nature reviews. Drug discovery* 2006; 5: 813–814
2. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* (London, England) 1994; 344: 1383–1389
3. Ohsfeldt RL, Gandhi SK, Fox KM, Stacy TA, McKenney JM. Effectiveness and cost-effectiveness of rosuvastatin, atorvastatin, and simvastatin among high-risk patients in usual clinical practice. *The American journal of managed care* 2006; 12: S412-23
4. Notarbartolo A, Barbagallo CM. Characteristics of a statine of the most recent generation. *Italian heart journal. Supplement : official journal of the Italian Federation of Cardiology* 2001; 2: 230–234
5. Lindgren P, Jonsson B. Cost-effectiveness of statins revisited: lessons learned about the value of innovation. *The European journal of health economics : HEPAC : health economics in prevention and care* 2012; 13: 445–450
6. Hackam DG, Mamdani M, Li P, Redelmeier DA. Statins and sepsis in patients with cardiovascular disease: a population-based cohort analysis. *Lancet* (London, England) 2006; 367: 413–418
7. Falagas ME, Makris GC, Matthaïou DK, Rafailidis PI. Statins for infection and sepsis: a systematic review of the clinical evidence. *England*, 2008 Apr
8. Bjorkhem-Bergman L, Bergman P, Andersson J, Lindh JD. Statin treatment and mortality in bacterial infections--a systematic review and meta-analysis. *United States*, 2010 May 19
9. Liappis AP, Kan VL, Rochester CG, Simon GL. The effect of statins on mortality in patients with bacteremia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2001; 33: 1352–1357
10. Merx MW, Liehn EA, Graf J, et al. Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival. *Circulation* 2005; 112: 117–124
11. Noakes TD, Borresen J, Hew-Butler T, Lambert MI, Jordaan E. Semmelweis and the aetiology of puerperal sepsis 160 years on: an historical review. *Epidemiology and infection* 2008; 136: 1–9
12. Cope Z. Joseph Lister, 1827-1912. *British medical journal* 1967; 2: 7–8

## Literaturverzeichnis

---

13. Kempker JA, Martin GS. The Changing Epidemiology and Definitions of Sepsis. *Clinics in chest medicine* 2016; 37: 165–179
14. K. Reinhart , F.B., H. Bone, H. Gerlach, M. Gründling, G. Kreymann, , G.M. P. Kujath, K. Mayer, A. Meier-Hellmann, C. Peckelsen, C. Putensen,, and M.R. M. Quintel, R. Rossaint, F. Stüber, N. Weiler, T. Welte, K. Werdan. Diagnose und Therapie der Sepsis: S2-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). *Internist* 2006 2006: 356–373
15. Engel C, Brunkhorst FM, Bone H-G, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive care medicine* 2007; 33: 606–618
16. Reinhart, K. and F.M. Brunkhorst. Leitlinienreport Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. AWMF online - S2-Leitlinie/Methodenreport; 2010:: 1–27
17. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Critical care medicine* 2006; 34: 15–21
18. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine* 2001; 29: 1303–1310
19. Moerer O, Schmid A, Hofmann M, et al. Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive care medicine* 2002; 28: 1440–1446
20. Schmid A, Burchardi H, Clouth J, Schneider H. Burden of illness imposed by severe sepsis in Germany. *The European journal of health economics : HEPAC : health economics in prevention and care* 2002; 3: 77–82
21. Hagel, S. and F. Brunkhorst. Sepsis. *Intensivmed* 2011: 57–73
22. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101: 1644–1655
23. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997; 112: 235–243
24. Kaukonen K-M, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med* 2015; 372: 1629–1638

## Literaturverzeichnis

---

25. Vincent J-L, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ. Sepsis definitions: time for change. *Lancet* (London, England) 2013; 381: 774–775
26. Seymour CW, Liu VX, Iwashyna TJ, et al. Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* 2016; 315: 762–774
27. Shah RU, Henry TD, Rutten-Ramos S, Garberich RF, Tighiouart M, Bairey Merz CN. Increasing percutaneous coronary interventions for ST-segment elevation myocardial infarction in the United States: progress and opportunity. *JACC. Cardiovascular interventions* 2015; 8: 139–146
28. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* 2016; 315: 801–810
29. Vincent J-L, Rello J, Marshall J, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *Jama* 2009; 302: 2323–2329
30. Schumann RR, Lamping N, Kirschning C, Knopf HP, Hoess A, Herrmann F. Lipopolysaccharide binding protein: its role and therapeutical potential in inflammation and sepsis. *Biochemical Society transactions* 1994; 22: 80–82
31. Wurfel MM, Kunitake ST, Lichenstein H, Kane JP, Wright SD. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS. *The Journal of experimental medicine* 1994; 180: 1025–1035
32. Zabel, P., Endotoxinbindende Proteine, Antiendotoxinantikörper. Sepsis und MODS; 2005. 4. vollständig überarbeitete und aktualisierte Auflage: p. 189-206. Endotoxinbindende Proteine, Antiendotoxinantikörper. Sepsis und MODS 2005: 189–206
33. Rensing H. Endotoxin. *Der Anaesthesist* 2003: S7-S13
34. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420: 885–891
35. Villar J, Maca-Meyer N, Perez-Mendez L, Flores C. Bench-to-bedside review: understanding genetic predisposition to sepsis. *Critical care* (London, England) 2004; 8: 180–189
36. Liu SF, Malik AB. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 2006; 290: L622-L645
37. Sundd P, Pospieszalska MK, Cheung LS-L, Konstantopoulos K, Ley K. Biomechanics of leukocyte rolling. *Biorheology* 2011; 48: 1–35

## Literaturverzeichnis

---

38. Ley K. Leukocyte adhesion to vascular endothelium. *Journal of reconstructive microsurgery* 1992; 8: 495–503
39. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology* 2003; 24: 327–334
40. Johnson-Leger C, Imhof BA. Forging the endothelium during inflammation: pushing at a half-open door? *Cell and tissue research* 2003; 314: 93–105
41. Böcker, W., et al. Zellen und zelluläre Reaktionen der Entzündung. *Pathologie* 2008: 121–123
42. Abraham E. Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis. *Intensive care medicine* 1999; 25: 556–566
43. Granger DN, Senchenkova E. Inflammation and the Microcirculation. *Colloquium Series on Integrated Systems Physiology: From Molecule to Function* 2010; 2: 1–87
44. Tyagi A, Sethi AK, Girotra G, Mohta M. The microcirculation in sepsis. *Indian journal of anaesthesia* 2009; 53: 281–293
45. Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Critical care (London, England)* 2005; 9 Suppl 4: S13-9
46. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends in microbiology* 2011; 19: 198–208
47. Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature reviews. Drug discovery* 2005; 4: 854–865
48. Stortz JA, Raymond SL, Mira JC, Moldawer LL, Mohr AM, Efron PA. Murine Models of Sepsis and Trauma: Can We Bridge the Gap? *ILAR journal* 2017; 58: 90–105
49. van der Poll T. Preclinical sepsis models. *Surgical infections* 2012; 13: 287–292
50. Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *United States*, 2008 Oct
51. Wen H. Sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2013; 1031: 117–124
52. Gong W, Wen H. Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 2019; 1960: 249–255
53. Zanotti-Cavazzoni SL, Goldfarb RD. Animal models of sepsis. *Critical care clinics* 2009; 25: 703-19, vii-viii



## Literaturverzeichnis

---

54. Seemann S, Zohles F, Lupp A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. *Journal of biomedical science* 2017; 24: 60
55. Deitch EA. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. *Shock (Augusta, Ga.)* 1998; 9: 1–11
56. Remick DG, Ward PA. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)* 2005; 24 Suppl 1: 7–11
57. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *Journal of Surgical Research* 1990; 49: 186–196
58. Liu Y-C, Chan JYH, Tsai Y-C. Influence of propofol on blood pressure spectrum in sepsis and the role of inducible nitric oxide synthase. *Acta anaesthesiologica Taiwanica : official journal of the Taiwan Society of Anesthesiologists* 2009; 47: 62–70
59. Giusti-Paiva A, Martinez MR, Felix JV, et al. Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats. *Shock (Augusta, Ga.)* 2004; 21: 271–275
60. Sytkowski PA, Kannel WB, D'Agostino RB. Changes in risk factors and the decline in mortality from cardiovascular disease. The Framingham Heart Study. *N Engl J Med* 1990; 322: 1635–1641
61. Martin PD, Mitchell PD, Schneck DW. Pharmacodynamic effects and pharmacokinetics of a new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, after morning or evening administration in healthy volunteers. *British journal of clinical pharmacology* 2002; 54: 472–477
62. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000; 101: 207–213
63. Ichihara K, Satoh K. Disparity between angiographic regression and clinical event rates with hydrophobic statins. *Lancet (London, England)* 2002; 359: 2195–2198
64. Istvan ES, Deisenhofer J. The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1529: 9–18
65. Istvan ES. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J* 2002; 144: S27-32
66. Margaritis M, Channon KM, Antoniades C. Statins as regulators of redox state in the vascular endothelium: beyond lipid lowering. *Antioxidants & redox signaling* 2014; 20: 1198–1215

## Literaturverzeichnis

---

67. Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 2001; 292: 1160–1164
68. Istvan ES. Bacterial and mammalian HMG-CoA reductases: related enzymes with distinct architectures. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11: 746–751
69. Wieland H., März W., Nauck M. (1994) (Hrsg.). *Diagnostics of Lipids and Lipoproteins*. In: Lanzer P., Rösch J. (eds) *Vascular Diagnostics.*: Springer, Berlin, Heidelberg
70. Georg Löffler, Petro E. Petrides. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*: Springer, Berlin, Heidelberg, 2007
71. Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343: 425–430
72. Edwards PA, Ericsson J. Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway: mechanisms of action and possible roles in human disease. *Current opinion in lipidology* 1998; 9: 433–440
73. Moon Y-A, Liang G, Xie X, et al. The Scap/SREBP pathway is essential for developing diabetic fatty liver and carbohydrate-induced hypertriglyceridemia in animals. *Cell Metab* 2012; 15: 240–246
74. Duriez P. Mechanisms of actions of statins and fibrates. *Therapie* 2003; 58: 5–14
75. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009; 29: 431–438
76. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, et al. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation* 1997; 95: 69–75
77. Shih DM, Xia YR, Wang XP, et al. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *The Journal of biological chemistry* 2000; 275: 17527–17535
78. LaRosa JC, He J, Vupputuri S. Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Jama* 1999; 282: 2340–2346
79. Aguilar-Salinas CA, Barrett H, Schonfeld G. Metabolic modes of action of the statins in the hyperlipoproteinemias. *Atherosclerosis* 1998; 141: 203–207
80. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005; 45: 89–118
81. Corsini A, Maggi FM, Catapano AL. Pharmacology of competitive inhibitors of HMG-CoA reductase. *Pharmacol Res* 1995; 31: 9–27

## Literaturverzeichnis

---

82. Saito Y, Yoshida S, Nakaya N, Hata Y, Goto Y. Comparison between morning and evening doses of simvastatin in hyperlipidemic subjects. A double-blind comparative study. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 816–826
83. Carl J. Vaughan, Antonio M. Gotto. Update on Statins: 2003. *Circulation* 2004; 110: 886–892
84. Cholesterinsenkung mit Statinen Nicht über einen Kamm scheren. *Deutsches Ärzteblatt* Jg 2004; 101
85. Mishra TK, Routray S. Current perspectives on statins. *J Indian Med Assoc* 2003; 101: 381–383
86. Feher MD, Webb JC, Patel DD, et al. Cholesterol-lowering drug therapy in a patient with receptor-negative homozygous familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 1993; 103: 171–180
87. Laufs U, Liao JK. Isoprenoid metabolism and the pleiotropic effects of statins. *Current atherosclerosis reports* 2003; 5: 372–378
88. Wang C-Y, Liu P-Y, Liao JK. Pleiotropic effects of statin therapy: molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol Med* 2008; 14: 37–44
89. Liao JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *International Journal of Cardiology* 2002; 86: 5–18
90. Peng X, Jin J, Giri S, et al. Immunomodulatory effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme-A reductase inhibitors, potential therapy for relapsing remitting multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* 2006; 178: 130–139
91. Adam O, Laufs U. Antioxidative effects of statins. *Archives of toxicology* 2008; 82: 885–892
92. Kirmizis D, Chatzidimitriou D. Pleiotropic vasoprotective effects of statins: the chicken or the egg? *Drug design, development and therapy* 2009; 3: 191–204
93. Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet (London, England)* 1996; 348: 1079–1082
94. Liao JK. Isoprenoids as mediators of the biological effects of statins. *The Journal of clinical investigation* 2002; 110: 285–288
95. Soehnlein O, Eskafi S, Schmeisser A, Kloos H, Daniel WG, Garlachs CD. Atorvastatin induces tissue transglutaminase in human endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004; 322: 105–109
96. Corsini A, Ferri N, Cortellaro M. Are pleiotropic effects of statins real? *Vascular health and risk management* 2007; 3: 611–613

## Literaturverzeichnis

---

97. Wagner AH, Gebauer M, Guldenzoph B, Hecker M. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase-independent inhibition of CD40 expression by atorvastatin in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1784–1789
98. Nissen SE, Tuzcu EM, Schoenhagen P, et al. Statin therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 29–38
99. Ridker PM, Rifai N, Pfeffer MA, Sacks F, Braunwald E. Long-term effects of pravastatin on plasma concentration of C-reactive protein. The Cholesterol and Recurrent Events (CARE) Investigators. *Circulation* 1999; 100: 230–235
100. Kjekshus J, Dunselman P, Blideskog M, et al. A statin in the treatment of heart failure? Controlled rosuvastatin multinational study in heart failure (CORONA): study design and baseline characteristics. *Eur J Heart Fail* 2005; 7: 1059–1069
101. Riesen. Pleiotrope Effekte der Statine – Aktuelle Fragen der Lipidtherapie (Teil 1). *ARS Medici*; 2007: 789–793
102. Pavlovic D, Frieling H, Lauer K-S, et al. Thermostatic tissue platform for intravital microscopy: 'the hanging drop' model. *Journal of microscopy* 2006; 224: 203–210
103. Gore RW, Bohlen HG. Microvascular pressures in rat intestinal muscle and mucosal villi. *The American journal of physiology* 1977; 233: H685-93
104. Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Critical care medicine* 2009; 37: S30-7
105. Lilley E, Armstrong R, Clark N, et al. Refinement of animal models of sepsis and septic shock. *Shock (Augusta, Ga.)* 2015; 43: 304–316
106. Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock (Augusta, Ga.)* 2005; 24 Suppl 1: 19–23
107. Frey L, Kesel K. Significance of perfusion of the gastrointestinal tract in shock. *Der Anaesthesist* 2000; 49: 446–450
108. Moazzam F, DeLano FA, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW. The leukocyte response to fluid stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94: 5338–5343
109. Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K. [Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. *Der Anaesthesist* 2006; 55: 835–845
110. Novack V, Terblanche M, Almog Y. Do statins have a role in preventing or treating sepsis? *Critical care (London, England)* 2006; 10: 113
111. Pleiner J, Schaller G, Mittermayer F, et al. Simvastatin prevents vascular hyporeactivity during inflammation. *Circulation* 2004; 110: 3349–3354

## Literaturverzeichnis

---

112. Sato T, Isoyama T, Tanaka J, Jones RT, Cowley RA, Trump BF. The pathophysiology of septic shock: changes in hemodynamics in rats following live *E coli* injection. An application of the thermodilution method for measurement of cardiac output. *Advances in shock research* 1982; 7: 25–42
113. Liu DD, Hsu YH, Chen HI. Endotoxin-induced acute lung injury is enhanced in rats with spontaneous hypertension. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 2007; 34: 61–69
114. Lehmann C, Meissner K, Knöck A, et al. Activated protein C improves intestinal microcirculation in experimental endotoxaemia in the rat. *Critical care (London, England)* 2006; 10: R157
115. Farquhar I, Martin CM, Lam C, Potter R, Ellis CG, Sibbald WJ. Decreased Capillary Density in Vivoin Bowel Mucosa of Rats with Normotensive Sepsis. *Journal of Surgical Research* 1996; 61: 190–196
116. Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. Bench-to-bedside review. *Critical care (London, England)* 2003; 7: 359–373
117. Birnbaum J, Klotz E, Spies CD, et al. Effects of dopexamine on the intestinal microvascular blood flow and leukocyte activation in a sepsis model in rats. *Critical care (London, England)* 2006; 10: R117
118. Birnbaum J, Hein OV, Lühns C, et al. Effects of coagulation factor XIII on intestinal functional capillary density, leukocyte adherence and mesenteric plasma extravasation in experimental endotoxemia. *Critical care (London, England)* 2006; 10: R29
119. Lam C, Tyml K, Martin C, Sibbald W. Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. *The Journal of clinical investigation* 1994; 94: 2077–2083
120. Walley KR. Heterogeneity of oxygen delivery impairs oxygen extraction by peripheral tissues 1996; 81: 885–894
121. Humer MF, Phang PT, Friesen BP, Allard MF, Goddard CM, Walley KR. Heterogeneity of gut capillary transit times and impaired gut oxygen extraction in endotoxemic pigs 1996; 81: 895–904
122. El-Azab MF, Hazem RM, Moustafa YM. Role of simvastatin and/or antioxidant vitamins in therapeutic angiogenesis in experimental diabetic hindlimb ischemia: effects on capillary density, angiogenesis markers, and oxidative stress. *European journal of pharmacology* 2012; 690: 31–41
123. Dold S, Laschke MW, Lavasani S, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Simvastatin protects against cholestasis-induced liver injury. *British journal of pharmacology* 2009; 156: 466–474

## Literaturverzeichnis

---

124. La Mura V, Pasarin M, Meireles CZ, et al. Effects of simvastatin administration on rodents with lipopolysaccharide-induced liver microvascular dysfunction. *Hepatology* (Baltimore, Md.) 2013; 57: 1172–1181
125. Akarsu M, Saygun O, Aydinuraz K, et al. The Effects of Simvastatin on Ischemia Reperfusion Injury in an Experimental Colon Anastomosis Model. *The Indian journal of surgery* 2017; 79: 390–395
126. Sata M, Nishimatsu H, Osuga J, et al. Statins augment collateral growth in response to ischemia but they do not promote cancer and atherosclerosis. *Hypertension* (Dallas, Tex. : 1979) 2004; 43: 1214–1220
127. Haak E, Abletshauser C, Weber S, et al. Fluvastatin therapy improves microcirculation in patients with hyperlipidaemia. *Atherosclerosis* 2001; 155: 395–401
128. Ley K. Leukocyte adhesion to vascular endothelium. *Journal of reconstructive microsurgery* 1992; 8: 495–503
129. Granger DN, Senchenkova E. *Inflammation and the Microcirculation*. San Rafael (CA), 2010
130. Muller WA. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in immunology* 2003; 24: 327–334
131. Birnbaum J, Lehmann C, Klotz E, et al. Effects of N-acetylcysteine and tirilazad mesylate on intestinal functional capillary density, leukocyte adherence, mesenteric plasma extravasation and cytokine levels in experimental endotoxemia in rats. *Clinical hemorheology and microcirculation* 2008; 39: 99–111
132. Pruefer D, Scalia R, Lefer AM. Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 2894–2900
133. Lorant DE, Topham MK, Whatley RE, et al. Inflammatory roles of P-selectin. *The Journal of clinical investigation* 1993; 92: 559–570
134. Hernandez-Mijares A, Banuls C, Rovira-Llopis S, et al. Effects of simvastatin, ezetimibe and simvastatin/ezetimibe on mitochondrial function and leukocyte/endothelial cell interactions in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 2016; 247: 40–47
135. McGown CC, Brookes ZLS, Hellewell PG, Ross JJ, Brown NJ. Atorvastatin reduces endotoxin-induced microvascular inflammation via NOSII. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 2015; 388: 557–564

## Literaturverzeichnis

---

136. Gottschalk O, Dao Trong ML, Metz P, et al. Simvastatin reduces leucocyte- and platelet-endothelial cell interaction in murine antigen-induced arthritis in vivo. *Scandinavian journal of rheumatology* 2014; 43: 356–363
137. Merx MW, Liehn EA, Graf J, et al. Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival. *Circulation* 2005; 112: 117–124
138. Pruefer D, Makowski J, Schnell M, et al. Simvastatin inhibits inflammatory properties of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Circulation* 2002; 106: 2104–2110
139. Li WC, Zou ZJ, Zhou MG, et al. Effects of simvastatin on the expression of inducible NOS in acute lung injury in septic rats. *International journal of clinical and experimental pathology* 2015; 8: 15106–15111
140. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101: 1644–1655
141. Tang GJ, Kou YR, Lin YS. Peripheral neural modulation of endotoxin-induced hyperventilation. *Critical care medicine* 1998; 26: 1558–1563
142. Backer D de. Lactic acidosis. *Minerva anesthesiologica* 2003; 69: 281–284
143. Neale R, Reynolds TM, Saweirs W. Statin precipitated lactic acidosis? *Journal of clinical pathology* 2004; 57: 989–990
144. Goli AK, Goli SA, Byrd RP, JR, Roy TM. Simvastatin-induced lactic acidosis: a rare adverse reaction? *Clinical pharmacology and therapeutics* 2002; 72: 461–464
145. El-Ganainy SO, El-Mallah A, Abdallah D, Khattab MM, Mohy El-Din MM, El-Khatib AS. Elucidation of the mechanism of atorvastatin-induced myopathy in a rat model. *Toxicology* 2016; 359-360: 29–38
146. Bouitbir J, Charles A-L, Rasseneur L, et al. Atorvastatin treatment reduces exercise capacities in rats: involvement of mitochondrial impairments and oxidative stress. *Journal of Applied Physiology* 2011; 111: 1477–1483
147. Huang J, Du J, Lin W, et al. Regulation of lactate production through p53/ $\beta$ -enolase axis contributes to statin-associated muscle symptoms. *EBioMedicine* 2019; 45: 251–260
148. Broniarek I, Jarmuszkiwicz W. Statins and mitochondria. *Postepy biochemii* 2016; 62: 77–84

## Literaturverzeichnis

---

149. Pinieux G de, Chariot P, Ammi-Saïd M, et al. Lipid-lowering drugs and mitochondrial function: effects of HMG-CoA reductase inhibitors on serum ubiquinone and blood lactate/pyruvate ratio. *British journal of clinical pharmacology* 1996; 42: 333–337
150. Vary TC, Siegel JH, Nakatani T, Sato T, Aoyama H. Effect of sepsis on activity of pyruvate dehydrogenase complex in skeletal muscle and liver. *The American journal of physiology* 1986; 250: E634-40
151. Mikkelsen ME, Miltiades AN, Gaieski DF, et al. Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. *Critical care medicine* 2009; 37: 1670–1677
152. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *Jama* 2016; 315: 801–810
153. Shetty A, MacDonald SP, Williams JM, et al. Lactate  $\geq 2$  mmol/L plus qSOFA improves utility over qSOFA alone in emergency department patients presenting with suspected sepsis. *Emergency medicine Australasia : EMA* 2017; 29: 626–634
154. Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In vivo (Athens, Greece)* 2013; 27: 669–684
155. Balakumar P, Mahadevan N. Interplay between statins and PPARs in improving cardiovascular outcomes: a double-edged sword? *British journal of pharmacology* 2012; 165: 373–379
156. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, et al. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circulation research* 2007; 100: 1442–1451
157. Mera S, Tatulescu D, Cismaru C, et al. Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2011; 119: 155–163
158. Lendemans S, Kreuzfelder E, Waydhas C, Schade FU, Flohe S. Differential immunostimulating effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and interferon gamma (IFN $\gamma$ ) after severe trauma. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 2007; 56: 38–44
159. Haberstroh J, Breuer H, Lucke I, et al. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hemodynamic and cytokine response in



- a porcine model of Pseudomonas sepsis. *Shock* (Augusta, Ga.) 1995; 4: 216–224
160. Eichacker PQ, Waisman Y, Natanson C, et al. Cardiopulmonary effects of granulocyte colony-stimulating factor in a canine model of bacterial sepsis. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 1994; 77: 2366–2373
161. Meisel C, Schefold JC, Pschowski R, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor to reverse sepsis-associated immunosuppression: a double-blind, randomized, placebo-controlled multicenter trial. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009; 180: 640–648
162. Bo L, Wang F, Zhu J, Li J, Deng X. Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) for sepsis: a meta-analysis. *Critical care* (London, England) 2011; 15: R58
163. Cimato TR, Palka BA. Fractalkine (CX3CL1), GM-CSF and VEGF-a levels are reduced by statins in adult patients. *Clinical and translational medicine* 2014; 3: 14
164. Fraunberger P, Grone E, Grone H-J, Walli AK. Simvastatin reduces endotoxin-induced nuclear factor kappaB activation and mortality in guinea pigs despite lowering circulating low-density lipoprotein cholesterol. *Shock* (Augusta, Ga.) 2009; 32: 159–163
165. Shyamsundar M, McKeown STW, O'Kane CM, et al. Simvastatin decreases lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in healthy volunteers. *American journal of respiratory and critical care medicine* 2009; 179: 1107–1114
166. Aikawa N, Takahashi T, Fujimi S, et al. A Phase II study of polyclonal anti-TNF-alpha (AZD9773) in Japanese patients with severe sepsis and/or septic shock. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 2013; 19: 931–940
167. Clark MA, Plank LD, Connolly AB, et al. Effect of a chimeric antibody to tumor necrosis factor-alpha on cytokine and physiologic responses in patients with severe sepsis--a randomized, clinical trial. *Critical care medicine* 1998; 26: 1650–1659
168. Lv S, Han M, Yi R, Kwon S, Dai C, Wang R. Anti-TNF-alpha therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis. *International journal of clinical practice* 2014; 68: 520–528
169. Lorente JA, Marshall JC. Neutralization of tumor necrosis factor in preclinical models of sepsis. *Shock* (Augusta, Ga.) 2005; 24 Suppl 1: 107–119

## Literaturverzeichnis

---

170. José Luiz de Souza Neto, Irami Araújo Filho, Amália Cíntia Meneses do Rego, et al. Effects of simvastatin in abdominal sepsis in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*; 2006
171. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. *Mediators of inflammation* 2013; 2013: 165974
172. Parrish WR, Gallowitsch-Puerta M, Czura CJ, Tracey KJ. Experimental therapeutic strategies for severe sepsis: mediators and mechanisms. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1144: 210–236
173. Pruefer D, Makowski J, Schnell M, et al. Simvastatin inhibits inflammatory properties of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Circulation* 2002; 106: 2104–2110

### 9 Anhang

#### Danksagung

Nach Jahren intensiver Arbeit liegt nun meine Dissertation vor. In diesem Zuge möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mich auf diesem langen Weg unterstützt und stets motiviert haben und somit wesentlich zur Vollendung der Promotion beigetragen haben.

Zunächst danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Hahnenkamp und Herrn Prof. Dr. med. Taras Usichenko, die meine Dissertation innerhalb der Klinik für Klinik für Anästhesie, Intensiv-, Notfall- und Schmerzmedizin der Universitätsmedizin Greifswald ermöglichten.

Mein tiefer und besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Christian Lehmann, meinem Doktorvater, für die Vergabe des Promotionsthemas und vor allem für die langjährige und sehr geduldige Betreuung. Sein intensives Engagement, seine konstruktive Kritik und die vielen wertvollen Anregungen haben die Dissertation substantiell beeinflusst.

Für die unermüdliche Hilfe bei der Einweisung und Erlernung der Technik der Intravitalmikroskopie danke ich meinen wissenschaftlichen Kollegen aus dem Laborteam. Hier sind insbesondere Herr Privatdozent Dr. med. Dragan Pavlovic sowie Frau Dipl.-Ing. Annette Wegner hervorzuheben. Beide unterstützten meine Forschungen und die anschließende Auswertung mit praktischem und theoretischem Fachwissen. Frau Anette Wegner war mir stets eine zuverlässige und ideengebende Ansprechpartnerin. Bei der guten Seele des Labors Frau Sabine Will möchte ich mich für die organisatorische Unterstützung bedanken.

Frau Roswitha Dressler aus der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Raila Busch gebührt ein großes Dankeschön für die zügige Analyse der Zytokine.

## Anhang

---

Meinen Eltern Ute und Dr. med. Erich Haußmann sowie meiner Schwester Dr. med. Alena Haußmann danke ich für das mühevollen, zeitintensive und sorgfältige Korrekturlesen. Die mehrfache Durchsicht und die kritische Betrachtung sowie die geführten Diskussionen rundeten die Dissertation ab.

Darüber hinaus gilt mein außerordentlicher Dank drei ganz besonderen Menschen, meinen Töchtern Marie und Frieda sowie meiner Frau Franziska. Sie unterstützten mich während jeder aufreibenden Phase der Dissertation, brachten mir viel liebevolles Verständnis entgegen und mussten sich oft in Verzicht üben.