

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

**Thema: Effekte des synthetischen Src-Tyrosinkinaseinhibitors PP2 auf die intestinale
Mikrozirkulation während experimenteller Endotoxinämie am Tiermodell Ratte**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Universität

Greifswald

2018

vorgelegt von:

Stefan Lütche

geb. am: 25.07.1989

in: Potsdam

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur
1. Gutachter: Prof. Dr. med. Taras Usichenko
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Lehmann

Ort, Raum: Greifswald, Klinik für Anästhesiologie Seminarraum K 5.11
Tag der Disputation: 04.05.2020

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
1.1 Einführung	9
1.2 Definition und Einteilung der Sepsis	10
2 Theoretische Grundlagen	14
2.1 Pathophysiologie, Pathogenese der Sepsis und des Multiorganversagens	14
2.1.1 Endotoxin / Lipopolysaccharid	14
2.1.2 Zytokine	21
2.1.2.1 Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)	21
2.1.2.2 Interleukin 1 alpha (IL-1 α)	22
2.1.2.3 Interferon gamma (IFN- γ)	22
2.1.2.4 Interleukin 4 (IL-4)	23
2.1.2.5 Monozyten Chemotaxis Protein-1 (MCP-1)	24
2.1.3 Leukozyten-Endothel-Interaktion	24
2.2 Src-Tyrosinkinase	26
2.2.1 Aufbau	26
2.2.2 Funktionsweise	28
2.3 PP2	29
2.4 Dimethyl Sulfoxid	31
3 Zielsetzung und Arbeitshypothese	33
4 Methodik	34
4.1 Versuchstiere	34
4.2 Gruppeneinteilung	34
4.3 Versuchsmodell	35
4.3.1 Versuchsaufbau	35
4.3.2 Anästhesie, Monitoring und operative Technik	36

4.4	Intravitalmikroskopie (IVM)	41
4.4.1	Technik	41
4.4.2	Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel	41
4.4.3	Kapillardichten	42
4.5	Laborparameter, Blutgasanalyse und Zytokine	43
4.6	Auswertung des Bildmaterials	44
4.7	Statistik	44
5	Ergebnisse	46
5.1	Intravitalmikroskopie	46
5.1.1	Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel	46
5.1.1.1	Permanente Leukozytenadhäsion	46
5.1.1.2	Temporäre Leukozytenadhäsion	47
5.1.2	Kapillardichten	48
5.1.2.1	Funktionelle Kapillardichte	48
5.1.2.2	Dysfunktionelle Kapillardichte	49
5.1.2.3	Nonfunktionelle Kapillardichte	50
5.1.2.4	Funktionelle Kapillardichte der Mucosa	51
5.2	Blutgasanalyse	52
5.2.1	Lactat	52
5.2.2	Glucose	53
5.2.3	Sauerstoffpartialdruck (pO ₂)	54
5.2.4	Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO ₂)	55
5.2.5	pH-Wert	56
5.2.6	Hydrogencarbonat (HCO ₃ ⁻)	57
5.3	Zytokine	58
5.3.1	Interleukin 1 alpha (IL-1 α)	58
5.3.2	Interleukin 4 (IL-4)	59
5.3.3	Interferon gamma (IFN- γ)	60
5.3.4	Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)	61
5.3.5	Monozyten Chemotaktisches Protein-1 (MCP-1)	62
5.4	Klinische Parameter	63
5.4.1	Verlauf des arteriellen Blutdruckes	63
5.4.2	Mittlerer arterieller Blutdruck	64

5.4.3	Verlauf der Herzfrequenz	65
6	Diskussion	66
6.1	Klinische Parameter	68
6.2	Leukozytenadhäsion	69
6.3	Kapillardichten	70
6.4	Blutgase	71
6.5	Zytokine	73
7	Fazit und Perspektive	75
8	Zusammenfassung	76
9	Literaturverzeichnis	77
10	Erläuternder Anhang	89

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Schematische Darstellung des Lipopolysaccharid [15]	14
Abb. 2	Schematische Signalwege des TLR-4 an der Zellmembran bis zu den Transkriptionsfaktoren im Zellkern eines Monozyten [15]	16
Abb. 3	Schema des MyD88-dependent und independent-pathway [34]	18
Abb. 4	Struktur der Src-Tyrosinkinase [89]	26
Abb. 5	Schema der Aktivierung der Src-Tyrosinkinase [91]	27
Abb. 6	Struktur PP2 [109]	29
Abb. 7	Schema der Bindungen von PP2 an Aminosäuren von Lck [110]	30
Abb. 8	Struktur DMSO	31
Abb. 9	Kanülierung der Trachea	37
Abb. 10	Kanülierung der V. jugularis int.	37
Abb. 11	Präparation der A. carotis comm.	37
Abb. 12	Kanülierung der A carotis comm.	37
Abb. 13	Abgeschlossene Halspräparation	38
Abb. 14	Mediane Laparotomie	38
Abb. 15	Identifikation des terminalen Ileums	38
Abb. 16	Positionierung der Ratte	38
Abb. 17	Positionierung des terminalen Ileums	38
Abb. 18	Fertige Positionierung zur IVM	38
Abb. 19	Präparation zur IVM der Mucosa	38
Abb. 20a	Schematische Darstellung des Aufbaus [113]	39
Abb. 20b	Schematische Darstellung des Aufbaus [113], vergrößerter Ausschnitt	39
Abb. 20c	Schematische Darstellung des Aufbaus [113], perspektivische Darstellung	40
Abb. 21	Ergebnisse permanente Leukozytenadhäsion Venolen 1. und 3. Ordnung	46
Abb. 22	Ergebnisse temporäre Leukozytenadhäsion Venolen 1. und 3. Ordnung	47
Abb. 23	Ergebnisse funktionelle Kapillardichte in cm/cm^2	48
Abb. 24	Ergebnisse dysfunktionelle Kapillardichte in cm/cm^2	49
Abb. 25	Ergebnisse nonfunktionelle Kapillardichte in cm/cm^2	50
Abb. 26	Ergebnisse funktionelle Kapillardichte Mucosa in cm/cm^2	51
Abb. 27	Ergebnisse Lactat in mmol/l	52

Abb. 28	Ergebnisse Glucose in mmol/l	53
Abb. 29	Ergebnisse pO ₂ in mmHg	54
Abb. 30	Ergebnisse pCO ₂ in mmHg	55
Abb. 31	Ergebnisse pH-Wert	56
Abb. 32	Ergebnisse HCO ₃ ⁻ in mmol/l	57
Abb. 33	Ergebnisse IL-1 α in pg/ml	58
Abb. 34	Ergebnisse IL-4 in pg/ml	59
Abb. 35	Ergebnisse IFN- γ in pg/ml	60
Abb. 36	Ergebnisse TNF- α in pg/ml	61
Abb. 37	Ergebnisse MCP-1 in pg/ml	62
Abb. 38	Verlauf des arteriellen Blutdruckes in mmHg	63
Abb. 39	Ergebnisse des mittleren arteriellen Blutdruckes im mmHg	64
Abb. 40	Verlauf der Herzfrequenz	65

Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Gruppeneinteilung	34
Tab. 2	Ablauf des Versuches in zeitlicher Abfolge	35

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of variance
AP-1	Activator protein 1
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BDNF	Brain-derived Neurotrophic factors
BE	Blutentnahme
BGA	Blutgasanalyse
Blk	B lymphocyte kinase
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CASP	Colon Ascendens Stent Peritonitis
CD14	Cluster of differentiation
cJNK	c-Jun-N-terminal-kinase pathway
c-Src	Cellular sarcoma
CCR2	Chemokine receptor type 2
CD	Cluster of differentiation
CK1 δ	Casein kinase I isoform delta
CLP	Cecal Ligation Puncture
COPD	Chronical obstructive pulmonary disease
CRE	cAMP response element
COX-2	Cyclooxygenase Typ II
DFCD	Dysfunktionelle Kapillardichte
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
EGFR	Epidermal growth factor receptor
Eph-A2	Ephrin type-A receptor 2
FCD	Funktionelle Kapillardichte
FFP	Fresh Frozen Plasma
FGF-R1	Fibroblast growth factor receptor 1
Fgr	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral oncogene
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fyn	Fibroblast yes-related non receptor kinase
GCS	Glasgow Coma Scale
GIT	Gastrointestinaltrakt

GKR	G-Protein-gekoppelt-Rezeptoren
Gpt/l	Giga-Partikel pro Liter
Hck	Hematopoetic cell kinase
HCO ₃ ⁻	Hydrogencarbonat
HES	Hydroxyethylstärke
HWZ	Halbwertszeit
ICAM-1	Intercellular-adhesion-molecule-1
ICAM-2	Intercellular-adhesion-molecule-2
IKKβ	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase
IL-4	Interleukin 4
IL-1α	Interleukin 1 alpha
IFN-α	Interferon alpha
IFN-γ	Interferon gamma
iNOS	Induzierbare NO-Synthetase
IVM	Intravitale Mikroskopie
IκB	Inhibitor of kappa B
JAK / STAT	Januskinase / Signal Transducers and Activators of Transcription
K _{ATP}	ATP-sensitive potassium channel
KDO	2-Keto-3-desoxyoctonsäure
LBP	Lipopolysaccharide binding protein
Lck	Lymphocyte Kinase
LPS	Lipopolysaccharide
Lyn	Lck / Yes novel tyrosine kinase
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MAPK	Mitogen-activated-protein-kinase
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MOV	Multiorganversagen
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NFCD	Nonfunktionelle Kapillardichte
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NO	Stickstoffmonoxid
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-Kinase-pathway

PLA2	Phospholipase A2
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PP2	(4-amino-5-[4-chlorophenyl]-7-[dimethylethyl]pyrazolo{3,4-d}pyrimidine)
PTP-ε	Protein-Tyrosin-Phosphatase-ε
qSOFA	Quick Sequential- [Sepsis-related-] Failure-Assessment-Score
RIP2	Receptor-interacting protein kinase 2
SEM	Standardfehler (engl.: standard error of mean)
SH	Src-homology
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
SOFA	Sequential-[Sepsis- related-] Failure-Assessment-Score
SRE	Sterol regulatory element
TIR	Toll-interleukin-1-receptor
TIRAP	TIR domain-containing- adaptor protein
TLR-4	Toll-Like-Rezeptor-4
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR domain-containing adaptor protein inducing IFN β
VCAM-1	Vascular-cell-adhesion-molecule-1
VCAM-2	Vascular-cell-adhesion-molecule-2
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Yes	Yamaguchi sarcoma viral oncogene
Yrk	Yes related kinase
ZVD	Zentraler Venendruck

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Sepsis beschreibt ein komplexes, lebensbedrohliches klinisches Syndrom einer Organdysfunktion, das durch eine fehlregulierte, übersteigerte Immunantwort auf eine Infektion charakterisiert ist. Aus diesem Grund wird nicht nur die Infektion bekämpft, sondern auch dem eigenen menschlichen Organismus erheblich Schaden zugefügt. Trotz aller medizinischen Fortschritte ist die Sepsis mit konsekutivem Multiorganversagen heute immer noch die häufigste Todesursache von kritisch kranken Patienten auf interdisziplinären Intensivstationen der industrialisierten Staaten [1;2].

Allein in Deutschland ist die Anzahl der Todesfälle durch eine Sepsis seit 1980 um mehr als das Dreifache angestiegen. Diese rapide Steigerung der Todesfälle ist unter anderem auf eine hohe medizinische Grundversorgung und verbesserter Diagnostik mit möglichen invasiven therapeutischen Methoden zurückzuführen. Dieses hat zur Folge, dass die Bevölkerung eine immer höhere Lebenserwartung hat und sich somit auch Multimorbiditäten häufen können.

Die Arbeitsgruppe um Fleischmann [3] veröffentlichte 2013 eine retrospektive Analyse von Fallzahlen und Mortalitätsraten von Sepsis-Patienten in Deutschland zwischen 2007 und 2013. Darin heißt es, dass die Sepsis-Fallzahlen jährlich um etwa 5,7% steigen. Waren es 2007 noch 200.535 Patienten, sind es 2013 schon 279.530 Patienten gewesen. Dieses entspricht einer statistischen Zunahme von 256 auf 335 Sepsisfällen pro 100.000 Einwohner. Zudem sei die Rate der schweren Sepsis von 27% auf 41% angestiegen. Positiv zeigte sich jedoch, dass die Letalitätsrate um 2,7% gesunken ist. Dass dieses Phänomen nicht nur auf den deutschen oder europäischen Raum begrenzt ist, hat die Arbeitsgruppe um Dombrovskiy [4] bereits 2007 erkannt, nachdem diese die steigende Hospitalisierung und Mortalitätsraten bei septischen Erkrankungen retrospektiv zwischen 1993 und 2003 in den USA analysiert hatten.

In dieser vorliegenden Arbeit soll ein neuer Ansatz für die Therapie der Sepsis untersucht werden. Manthey [5] konnte an in vitro Versuchsreihen zeigen, dass die Modulation von Tyrosinkinasen durch Inhibitoren einen positiven Effekt auf die Sepsis induzierte arterielle Hyporeaktivität besitzt. Zudem konnten Lowell et al. [6] zeigen, dass die Hemmung von Tyrosinkinasen antiinflammatorische Effekte nach sich zieht. Die Auswirkungen der Blockade der c-Src-Tyrosinkinase bei einer Endotoxinämie in vivo am Modell der Ratte werden in dieser Arbeit untersucht und analysiert.

1.2 Definition und Einteilung der Sepsis

Die Sepsis wird nach der Deutschen Sepsis-Gesellschaft und in der noch veröffentlichten S2 Leitlinie von 2010 (Gültigkeit seit 01.02.2015 abgelaufen) der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF) folgendermaßen definiert:

„Sepsis ist eine komplexe systemische inflammatorische Wirtsreaktion auf eine Infektion. Es gibt derzeit keinen Parameter, der alleine zur Diagnose der Sepsis führen kann. Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock definieren ein Krankheitskontinuum, das über eine Kombination von Vitalparametern, Laborwerten, hämodynamischen Daten und Organfunktionen definiert wird. Eine Bakteriämie findet sich in Abhängigkeit von einer antibiotischen Vorbehandlung nur bei durchschnittlich 30% von Patienten mit schwerer Sepsis oder einem septischen Schock. Insgesamt kann in ca. 30% kein mikrobiologisch gesicherter Infektionsnachweis geführt werden, obwohl eine Infektion nach klinischen Kriterien wahrscheinlich ist. Die Interpretation von mikrobiologischen Befunden ist bei kritisch kranken Patienten häufig problematisch, da oft Mikroorganismen nachgewiesen werden, die lediglich einer Kolonisation entsprechen könnten. Kritisch kranke Patienten weisen häufig ein Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) und multiple Organdysfunktion (MOD) auf, der kausale Zusammenhang mit einer Infektion ist daher oft nicht sicher nachweisbar.“ [7]

Anhand dieser Definition ist zu erkennen, dass sich an dem Begriff der Sepsis ein Bedeutungswandel im Vergleich zum letzten Jahrhundert vollzogen hat, denn die Begriffsbestimmung von Schottmüller aus dem Jahr 1914 geht davon aus, dass allein Bakterien, die in den Blutkreislauf gelangen, eine solche Reaktion auslösen können.

Jedoch konnte im Laufe des letzten Jahrhunderts beobachtet werden, dass auch nicht infektiös bedingte Erkrankungen, wie Transplantatabstoßungen, Intoxikation, Verbrennungen, Ischämien oder Polytraumata ähnliche Symptomkonstellationen hervorrufen können. 1991 wurde im Rahmen der Consensus Conference der amerikanischen Society of Critical Care Medicine und des American College of Chest Physicians die Definition der Krankheitsentität neu festgelegt. Unter anderem wurde dabei eine neue Identität definiert: die systemische Inflammationsreaktion bzw. das Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) [8].

Das SIRS wird durch das Vorliegen von mindestens zwei der folgenden Symptome gekennzeichnet:

- Körpertemperatur $\geq 38^{\circ}\text{C}$ oder $\leq 36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$
- Atemfrequenz $\geq 20/\text{min}$ oder $\text{PaCO}_2 \leq 32 \text{ mmHg}$
- Leukozyten $\geq 12.000 \text{ Gpt/l}$ oder $\leq 4.000 \text{ Gpt/l}$ oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile Granulozyten [8]

Ein weiteres wichtiges Krankheitsbild ist das Multiorganversagen (MOV). Das Multiorganversagen kann auf verschiedenen Wegen eintreten. Zum einen als Folge eines klinischen Eingriffs, zum Beispiel bei einem operativen Eingriff, zum anderen als Folge einer akuten pathophysiologischen Störung, wie zum Beispiel bei einer Sepsis [9].

Historisch gesehen ist das Syndrom des Organversagens kein unbekanntes. Bereits während des ersten Weltkrieges stellten Frontärzte fest, dass viele Soldaten dem sogenannten Wundchock erlegen waren, der auf ein Blutvolumendefizit (haemorrhagischer Schock) zurückgeführt werden konnte. In den Jahren zwischen den beiden Weltkriegen hatte sich gezeigt, dass durch die Transfusion von Blutprodukten das Problem des Volumenmangels und des haemorrhagischen Schocks gemindert werden konnte. Im Zweiten Weltkrieg wurden in größerem Maße Plasma und Blut bei Verwundeten transfundiert. Allerdings stellte sich dann ein neues Problem dar, das akute Nierenversagen, woran viele Verwundete verstarben. Dieses Problem konnte erst nach dem Koreakrieg behoben werden, indem neben Blut und Plasma auch kristalloide Lösungen infundiert wurden. Durch diese Erkenntnis konnte das akute Nierenversagen bei Soldaten und Zivilisten signifikant um das 20- bis 30-fache gesenkt werden. Jedoch trat dann wiederum ein neues Problem, die Schock-Lunge, bzw. das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) auf. Durch moderne mechanische Ventilation und das Konzept der lungenprotektiven Beatmung konnte die Letalität durch ARDS gesenkt werden. Heute ist die Letalität von kritisch kranken Patienten mit ARDS sehr hoch, da das Multiorganversagen einsetzt, sodass mehr als 75% der Patienten, die mit einem ARDS sterben auch ein Multiorganversagen entwickelt haben, also dass nicht mehr die Hypoxie, sondern die systemische hämodynamische Instabilität zum Tod führt [10]. Der Begriff des MOV wurde zum ersten Mal im Jahr 1973 von Tilney, Baily und Morgan bei Patienten mit dem progressiven Ausfall von ganzen Organsystemen nach operativen Maßnahmen nach rupturierten Bauchaortenaneurysmata beschrieben [10;11].

Zusammenfassend wird die insuffiziente Leistung von mehreren Organen als Multiorgandysfunktionssyndrom bezeichnet [9-11].

Nachdem die letzte Definition von Sepsis und dem septischen Schock aus dem Jahr 2003 stammt, wurde Anfang 2016 von einer Expertengruppe der Society of Critical Care Medicine und der European Society of Intensive Care Medicine, ein Versuch unternommen, den Begriff der Sepsis neu zu definieren (Dritte internationale Konsenskonferenz zur Definition der Sepsis und des septischer Schocks [Sepsis-3]) [12]. Die Motivation zur Neudefinition des Begriffes der Sepsis ist die Nichtexistenz eines eindeutigen Goldstandards zur Diagnosesicherung. Daher ist die genannte Task Force zum Entschluss gekommen, dass die Parameter besser definiert werden müssen. Die Sepsis ist eine lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer Dysregulation durch eine begleitende Entzündungsreaktion. Dabei ist zu beachten, dass der Begriff Sepsis als Syndrom und nicht als spezifische Erkrankung zu werten ist. Unter dem Aspekt, dass die Sepsis als Organdysfunktion betrachtet wird, würde der Begriff der „Severe Sepsis“, zu Deutsch „Schweren Sepsis“, nicht mehr notwendig sein. Vorher wurde der Begriff „Schwere Sepsis“ verwendet, wenn sepsisbedingt mindestens eine Organschädigung sekundär auftritt [13].

Nach den neuen Definitionen bezeichnet der Begriff Sepsis das Vorliegen einer Infektion mit begleitender Organdysfunktion. In diesem Zusammenhang wurde auch ein neuer Score zur Früherkennung eingeführt. Neben dem bereits bekannten und etabliertem Sequential-[Sepsis-related-] Failure-Assessment-Score (SOFA Score) wurde nun der Quick SOFA Score (qSOFA) eingeführt.

Bei dem SOFA Score werden den Organsystemen, je nach Funktionsfähigkeit, Punkte vergeben. Dabei gilt die Grundregel, je besser das Organsystem arbeitet, desto geringer ist der Punktwert. Die Funktionsfähigkeit wird an klinischen und laborchemischen Parametern festgemacht. Diese betreffen das Respiratorische System, das zentrale Nervensystem, das Herzkreislaufsystem, die Leberfunktion, die Nierenfunktion und die Gerinnung [12].

Nach dieser neuen Definition wird eine Sepsis diagnostiziert, wenn ein SOFA Score von ≥ 2 bei einem Patienten vorliegt. Ein SOFA Score von ≥ 2 hat eine Mortalitätsrate von etwa 10%, wenn das allgemeine Patientenkollektiv mit einer mutmaßlichen Infektion betrachtet wird. Nicht spezifische Parameter wie Leukozytose oder Leukozytopenie und Fieber unterstützen den Verdacht einer Infektion. Unter dieser Definition ist der Begriff der „schweren Sepsis“ nicht mehr als notwendig zu erachten.

Auch der Begriff des septischen Schocks wurde neu definiert. Dieser wird weiterhin als Untergruppe der Sepsis betrachtet, bei der es zu einer tiefgreifenden Zirkulations- und

Stoffwechselstörung kommt. Von einem septischen Schock wird gesprochen, wenn folgende Kriterien erfüllt werden:

- MAP ≤ 65 mmHg trotz Gabe von Vasopressoren
- Serumlactat > 2 mmol/L (> 18 mg/dl) trotz ausreichender Volumengabe

Unter diesen Kriterien besteht eine Krankenhausmortalität von $> 40\%$.

Durch die Konsensuskonferenz wurde zusätzlich ein Quick SOFA Score (qSOFA Score) beschrieben. Dieser besteht aus folgenden drei Parametern mit den Grenzwerten:

- systolischer Blutdruck ≤ 100 mmHg
- Atemfrequenz ≥ 22 /min
- Verwirrtheit

Der neue qSOFA Score soll nun dazu dienen, um Personal auf peripheren Stationen, in der Notaufnahme oder Notärzten ein diagnostisches Instrument zu geben, um eine potentielle Sepsis frühzeitig zu erkennen. Als potentiell gefährdet gelten Patienten, bei denen mindestens zwei Parameter außerhalb der Grenzbereiche liegen. Bei diesen Patienten sollte nach einem Organversagen gesucht und auf eine Sepsis gescreent werden [12].

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Pathophysiologie, Pathogenese der Sepsis und des Multiorganversagens

Die Pathophysiologie und Pathogenese der Sepsis sind umfangreich und noch nicht vollständig aufgeklärt. Im Folgenden werden die, für die vorliegende Arbeit, wichtigen Sachverhalte erörtert. Dazu zählen die Funktionsweise von Endotoxinen, sepsisrelevanten Zytokinen und die daraus folgende Leukozyten-Endothel-Interaktion. Im Anschluss daran wird das hier verwendete synthetische PP2 diskutiert.

2.1.1 Endotoxin / Lipopolysaccharid

Aufbau und Struktur

Lipopolysaccharid (LPS), auch als Endotoxin bezeichnet, ist ein hitzestabiler Molekularkomplex, der sich auf der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien befindet und als Antigen wirkt. Die chemische Struktur lässt sich, wie in Abb. 1 dargestellt, in folgende drei Teile unterteilen:

- Lipid A
- Core-Polysaccharid
- O-spezifischen Polysaccharidkette / O-Antigen [14]

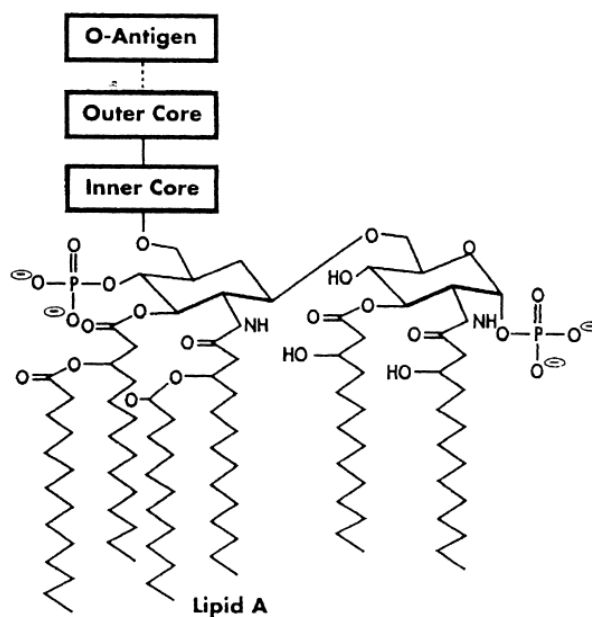


Abb. 1 Schematische Darstellung des Lipopolysaccharids [15]

Die O-spezifische Polysaccharidkette, auch als O-Antigen bezeichnet, ist der Teil des LPS-Komplexes, der nach extrazellulär zeigt. Biochemisch gesehen handelt es sich hierbei um sich repetierende Zuckereinheiten aus drei bis acht Hexose-Sequenzen, wie z.B. Glucose, Galactose oder Mannose. Möglich sind aber auch Desoxyzuckereinheiten. Dieser Bereich ist durch die verschiedenen Variationen und Längen je nach Bakterienart und Bakterienstamm unterschiedlich. Diese Unterschiede werden nutzbar gemacht, um nach Identifikation des jeweiligen O-Antigens das Bakterium serologisch zu typisieren. Darüber hinaus dient das O-Antigen auch als Rezeptor und Modulator für die Komplementaktivierung [16].

Das Core-Polysaccharid ist die Verbindung zwischen dem Lipid A und der O-spezifischen Polysaccharidkette. Sie besteht aus einer inneren und einer äußeren Kernregion. Diese Regionen bestehen jeweils aus verschiedenen Heptosen und 2-Keto-3-Desoxyoctonsäuren (KDO).

Beim Lipid A handelt es sich um den hochkonservierten Teil des LPS-Komplexes, der direkten Kontakt zur äußeren Membran der gramnegativen Bakterien hat und bei allen gramnegativen Bakterien gleich ist. Das Lipid A ist allein für die toxische Wirkung verantwortlich [17]. Damit das LPS wirken kann, muss es von gramnegativen Bakterien freigesetzt werden. Die Freisetzung kann über zwei verschiedene Wege geschehen. Entweder durch die Eliminierung, zum Beispiel durch Phagozyten, oder über die schnelle Proliferation der Bakterien, wobei Zellmembrananteile frei werden. [17;18].

LPS-Signaltransduktion

Es gibt Hinweise dafür, dass Monozyten und Makrophagen ab einer LPS-Konzentration von 5-10 pg/ml in der Lage sind, eine signifikante Menge von Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Interleukin 1 (IL-1) zu produzieren und sezernieren [19]. Damit diese geringe Konzentration zu einem signifikanten Effekt führt, muss das Lipopolysaccharid-Bindungsprotein (LBP) hinzukommen. Das LBP ist ein Akute-Phase-Protein, das in der Leber synthetisiert wird. Dieses ist essentiell für die Wirkung von LPS [14]. Bei LBP-knockout-Mäusen konnten Jack et al. [17] zeigen, dass diese resistent gegenüber einer normalerweise tödlichen LPS-Dosis (200ng intraperitoneal) waren. Auf der anderen Seite waren diese Mäuse sehr anfällig gegenüber systemischen gramnegativen bakteriellen Infektionen.

Nachdem ein Bindungskomplex zwischen LPS und LBP entstanden ist, kann dieser Komplex an das CD14-Molekül binden (cluster of differentiation 14) [18;20-23]. Bei CD14 handelt es sich um eine Struktur, die an Zellwänden von Phagozyten vorkommt und durch Phospholipide verankert ist [20;24]. Es kann auch in gelöster Form im Blutplasma, als sogenanntes soluble

CD14 (sCD14) vorkommen [20;25]. Die Struktur verfügt am amino-terminalen Ende über eine hydrophobe Tasche. Diese Tasche ist in der Lage acylierte Liganden, wie den LPS/LBP-Komplex, zu binden [26]. CD14 wird auch als Sensitizer bezeichnet. Erst durch diesen sogenannten trimolekularen Komplex aus LPS, LBP und CD14, sind Monozyten und Makrophagen in der Lage bei sehr geringen Konzentrationen effektiv Zytokine freizusetzen [27-29]. Neben den Zytokinen werden auch Lysosomen mit antimikrobiellen Proteinen, wie Lysozym, Elastase, Cathepsin G und das Bakterien permeabilisierende Protein (BPI), freigesetzt [30].

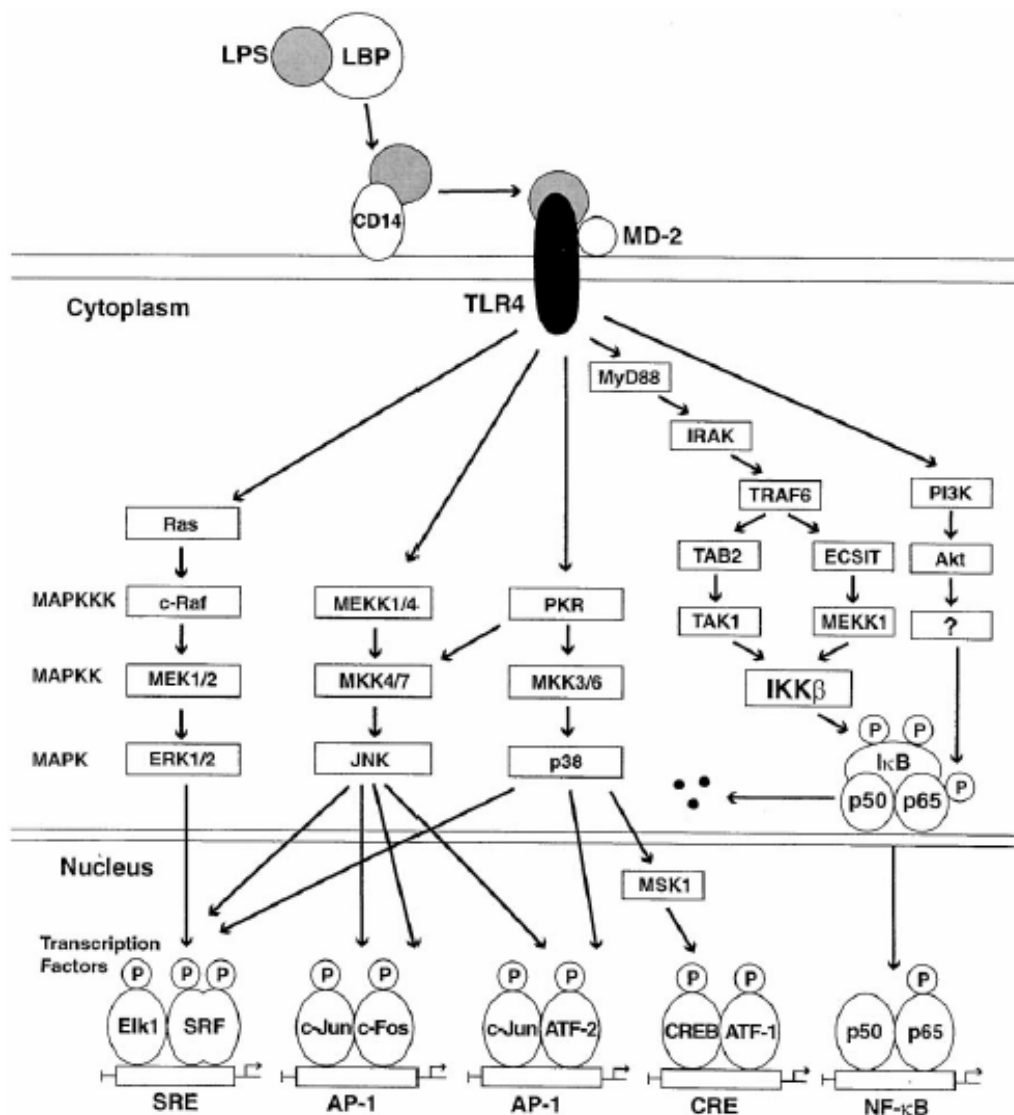


Abb. 2 Schematische Signalwege des TLR-4 an der Zellmembran bis zu den Transkriptionsfaktoren im Zellkern eines Monozyten [15]

Die Signaltransduktion des LPS/LBP/CD14-Komplexes ist vielfältig und noch nicht in Gänze erforscht. Die Abb. 2 zeigt, dass sich der trimolekulare Komplex am Toll-Like-Rezeptor-4 (TLR-4) und dem akzessorischen Protein MD-2 anlagert. Durch die Anlagerung werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert, wie unter anderem:

- Mitogen-activated-protein-kinase-pathway (MAPK),
- c-Jun-N-terminal-kinase pathway (cJNK),
- p38 pathway
- I κ B-kinase-NF κ B-pathway (IKK β)
- Phosphatidyl-inositol-3-Kinase-Weg (PI3K) [15;31]

Diese Signalwege aktivieren eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie unter anderem:

- Sterol regulatory element (SRE)
- Activator protein 1 (AP-1)
- cAMP response element (CRE)
- Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF κ B) [15;24]

Die beiden zuletzt genannten Signalwege unterscheiden sich, indem beide Wege eine Interaktion mit einem intrazellulär gelegenen Toll-interleukin-1-receptor (TIR) eingehen. Dieser TIR ist aus mehreren Domänen aufgebaut: MyD88 (myeloid differentiation primary response gene 88) und TIRAP (TIR domain-containing-adaptor protein) für den IKK β Weg, auch als MyD88-depend-pathway benannt, sowie TRIF (TIR domain-containing adaptor protein including IFN β) und TRAM (TRIF-related adaptor molecule) für den PI3K Weg, der auch als MyD88-independ-pathway bezeichnet wird. Der MyD88-dependent-pathway stimuliert die Transkription von NF κ B und von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β und IL-6. Hingegen stimuliert der MyD88-independent-pathway Interferon α und NF κ B [25;32;33].

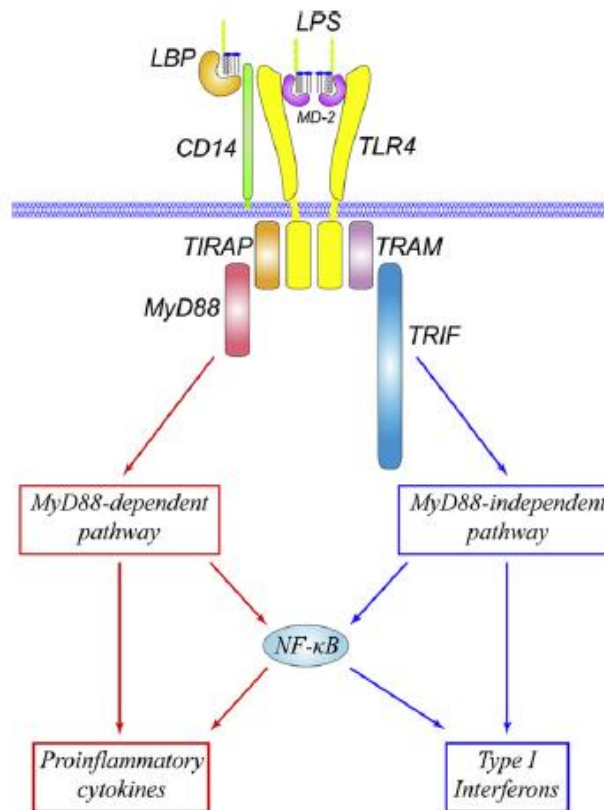


Abb. 3 Schema des MyD88-dependent und independent-pathway [34]

NFκB stellt hierbei eine Schlüsselfigur dar, da diese eine große Gruppe von hochkonservierten Proteinen ist, welche erst beim Zusammenschluss von Dimeren zu einem aktiven Transkriptionsfaktor werden. Die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors ist während einer Inflammation in jedem Organ erhöht. Weiterhin korreliert die Aktivitätshöhe mit der Mortalität bzw. dem klinischen Outcome [35]. NFκB kann durch viele verschiedene Kaskaden aktiviert werden. Dabei wirkt NFκB antiapoptotisch, also für den Zellerhalt. Weitere Wirkungen von NFκB sind, bezogen auf das hämatopoetische System, die gesteigerte Hämatopoese und deren Zelldifferenzierungen, sowie die Steigerung der Sekretion von Antikörpern inklusive IFN-γ aus Leukozyten und deren klonale Expansion. Kardiovaskulär wirkt sich NFκB vor allem positiv auf die Angiogenese aus. In der Lunge hat NFκB Auswirkungen auf die Entwicklung von Asthma, COPD und ARDS [36]. Durch die hohe Aktivität von NFκB in der Niere kann eine Nephropathie, aufgrund einer Postreperfusion-Inflammation, entstehen. Im Gastrointestinaltrakt (GIT) nimmt NFκB je nach Zusammensetzung der Dimere eine jeweils andere Rolle ein. Zum einen wirkt die NFκB-Aktivität positiv auf die Wundheilung und zum anderen ist die NFκB-Aktivität auch an der Entstehung von gastrointestinalen Ulcera oder

chronisch entzündlichen Darmerkrankungen beteiligt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass NFκB zu den wichtigsten Faktoren der angeborenen Immunität gehört [37;38].

Folgen der LPS-Signaltransduktion bis zum Multiorganversagen

Durch den Kontakt von LPS mit Zellwänden, z.B. von Endothel oder Epithelzellen, kommt es zur Bindung an Caspasen und zur Aktivierung des Inflammasoms. Dabei handelt es sich um einen Multiproteinkomplex, der über ein mehrstufiges Signalsystem in der Lage ist, eine immunogene Apoptose einzuleiten [13]. Die Aktivität der Caspasen und die Apoptoseraten können während der Sepsis durch Hemmung der Src-Tyrosinkinasen gesteigert werden [39]. Zum anderen kommt es durch die Wirkung des LPS zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1, IL-6 und TNF-α. Diese haben einer Reihe von Wirkungen auf die einzelnen Organsysteme [40].

In mehreren Arbeiten [41-43] konnte gezeigt werden, dass unter dem Einfluss des Sepsismodells die Mikrozirkulation (Gefäße mit einem Durchmesser von <100µm) und folglich auch der effektive Blutfluss deutlich reduziert wird. Dies äußert sich durch eine erhöhte Dichte von Gefäßen mit verminderter oder erloschener Perfusion. Als Hauptursache werden hierfür die Hypotension und das Versagen der Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur vermutet. Lundy et al. [43] haben mehrere Gründe für die Vasodilatation und Vasopressorresistenz aufgeführt. Zum einen wird der ATP abhängige Kalium-Kanal (K_{ATP}) genannt. Dieser wird durch einen intrazellulären Mangel an ATP, sowie eine intrazelluläre Erhöhung von Protonen und Lactat aktiviert. Folglich kommt es zu einem Efflux von Kalium. Die daraus resultierende Hyperpolarisation der Zelle verhindert den Calciuminflux und somit auch die Kontraktion. Als nächster Punkt wird die gesteigerte Aktivität von iNOS angeführt, welche durch Zytokine wie TNF-α, IFN-γ und IL-1β induziert wird. Das NO aktiviert über cGMP die Myosinphosphatase, welche eine Vasodilatation zur Folge hat und gleichzeitig ein Grund für die Vasopressorresistenz ist. Als letzter Punkt wird der Vasopressinmangel aufgeführt. Vasopressin wirkt, über eine Hemmung des cGMP, vasokonstriktorisch. Dabei wird postuliert, dass bei einem initialen Schockereignis Vasopressin hochdosiert sezerniert wird, was einen hohen Plasmaspiegel zur Folge hat. Allerdings werden die Vorräte an Vasopressin in der Neurohypophyse damit schnell aufgebraucht und diese hohen Plasmaspiegel fallen rasch wieder ab. Dementsprechend fehlt die effektive Hemmung des cGMP [44].

In der Lunge kann es zu einem Acute respiratory distress syndrome (ARDS) kommen. Durch die Einwanderung von Leukozyten und die Freisetzung der Zytokine entstehen Schädigungen von Alveolarzellen und Endothelzellen [45]. Zusätzlich wird die Barrierefunktion der beiden

Zellarten derart geschädigt, dass Plasmaproteine und Flüssigkeit aus den Gefäßen ins Interstitium und in den Alveolarraum eindringen können. Dies hat zur Folge, dass das Surfactant seine Funktion zur Oberflächenspannungssenkung verliert. Da Surfactant fehlt, kollabieren die Alveolen und es entstehen Atelektasen. In den Bereichen der Minderbelüftung kommt es durch den Euler-Liljestrand-Mechanismus zur Vasokonstriktion. Es bilden sich arteriovenöse Shunts und es resultiert ein Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstandes. Der gesamte Prozess hat eine kardiale Belastung, Hypoxie, Hyperkapnie und Dyspnoe zur Folge. Oyaizu et al. [46] konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Inhibition der Src-Tyrosinkinasen durch PP2 einem reperfusionsbedingten akuten Lungenversagen vorbeugt, welches durch das Abklemmen eines Lungenflügels induziert wurde. Dieses konnte unter anderem daran festgemacht werden, dass ein besserer $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Index ermittelt und weniger inflammatorische Zellen in der histologischen Aufarbeitung der Lunge gesehen worden sind. Im Gastrointestinaltrakt befindet sich die größte endogene Quelle für Endotoxine. Unter physiologischen Bedingungen stellt diese Quelle kein Problem dar, da die Mucosa eine Barriere bildet [47]. Erst wenn durch Hypoxie und oder Minderperfusion die Mucosa geschädigt wird und die Permeabilität sich dadurch erhöht, können Bakterien und Endotoxine aus dem Darmlumen in den systemischen Kreislauf gelangen [48;49]. Um diese Permeabilität zu senken und die mucosale Perfusion aufrecht zu erhalten, gab es bereits zahlreiche Versuchsreihen. Dabei konnten Birnbaum et al. [50] zeigen, dass die Gabe von Faktor XIII (Fibrin-Stabilisierender-Faktor) einen protektiven Einfluss auf die mucosale Perfusionsdichte hat. Weiterhin ist eine gute Perfusion des Darmes wichtig und notwendig. Nur so kann ausreichend Sauerstoff zu den Zellen gelangen um den hohen Metabolismus zu gewährleisten. Zudem konnten Drazenovic et al. [51] zeigen, dass die effektive perfundierte Kapillardichte unter einer Endotoxinämie deutlich geringer ist.

Eine Ischämie des Pancreas führt zur unkontrollierten Freisetzung von Pancreasenzymen wie Lipase, Trypsinogen oder α -Amylase. Durch die freiwerdenden Enzyme kann auch das Pancreas selbst angehaut werden. Es bilden sich Kolliquationsnekrosen. Die freiwerdenden Triglyceride des umliegenden Gewebes, binden über eine Verseifungsreaktion Calcium, wodurch es sekundär zu einer Hypocalciämie kommen kann.

In der Leber geht die Endotoxinämie mit einer Reduktion der Perfusion der A. hepatica einher, um dem schockbedingten erhöhten portalvenösen Druck entgegen zu wirken. Damit verbunden ist jedoch eine folgende Hypoxämie. In Zellkulturen konnte auch gezeigt werden, dass Endotoxine eine direkte Wirkung auf Kupffer-Sternzellen haben. Diese inhibieren die hepatozelluläre Proteinsynthese [16].

Die Regulationsmechanismen der Nieren reagieren, mit dem Ziel der Zentralisation, auf Hypotension mit Vasokonstriktion der zuführenden Gefäße. Durch die Gefäßkonstriktion kommt es zu Oligo- bis Anurie. Bei zu langer Vasokonstriktion kann ebenso ein akutes prärenales Nierenversagen entstehen. Durch die verminderte Blutfiltration und mangelnde Exkretion von harnpflichtigen Substanzen, steigen diese im Blut an und führen unter anderem zu einer Elektrolytverschiebung bzw. -Störung (wie eine Hyperkaliämie) und einer Überwasserung mit folgender onkotisch bedingter Ödembildung.

Bei einer systemischen Endotoxinämie lässt sich am Herzen ein erhöhter Allgöwer-Schockindex mit einem niedrigen systolischen Blutdruck und einer hohen Herzfrequenz nachweisen. Erhöht ist der Index, wenn der Quotient $\frac{\text{Herzfrequenz}}{\text{systolischem Blutdruck}}$ größer 1 ist. Zusätzlich kommt es linksventriculär zu einer Dilatation bei normalem Füllungsdruck, sodass das endsystolische und enddiastolische Volumen steigen. Endotoxine selbst haben keinen Einfluss auf die Kontraktionsfähigkeit der glatten Gefäßmuskulatur [52].

2.1.2 Zytokine

2.1.2.1 Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)

Bei dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, also ein endogenes Pyogen, welches das Inflammationsgeschehen antreibt. TNF- α , auch Cachectin genannt, wird in großem Umfang durch Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sezerniert [53]. Diese Sezernierung geschieht nur, wenn ein Stimulus vorhanden ist. Ein solcher Stimulus kann zum Beispiel das Lipopolysaccharid (LPS) sein [54], das sich mit dem Lipopolysaccharid-Binding-Protein verbindet, und so den LPS/LPB-Komplex bildet, der wiederum an den CD14-Rezeptor bindet, welcher an der Zelloberfläche der Leukozyten sitzt. Dadurch kommt es zu einer Signaltransduktion, wobei, mit Hilfe des Transkriptionsfaktors NF κ B, die Synthese von TNF- α gesteigert wird [55-57].

Mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 6 bis 7 Minuten ist TNF- α nun in der Lage eine Vielzahl von Ereignissen auszulösen [58]. Zu den wichtigsten Ereignissen gehört die Erzeugung von Symptomen, die im septischen Schock vorzufinden sind. Dazu zählen Hypotension, Tachycardie, Tachypnoe und die metabolische Azidose [59]. Weiterhin wird durch TNF- α eine Koagulations-Kaskade induziert [59;60]. Hinzukommt eine signifikante Steigerung der Aktivierung von NF κ B [61]. Zudem tritt eine gesteigerte Phagozytoseaktivität von

Makrophagen und Monozyten auf, wodurch die Produktion der Sauerstoffradikale erhöht wird [59]. Weiterhin werden auch Lysozyme und Peroxide freigesetzt [62]. Dennoch scheint die Anwesenheit von TNF- α , als auch von IL-1, während einer Sepsis notwendig zu sein. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Nutzung von TNF- α -Antagonisten mit einer erhöhten Mortalität assoziiert war [63].

2.1.2.2 Interleukin 1 alpha (IL-1 α)

Wie TNF- α ist auch Interleukin 1 alpha (IL-1 α) ein proinflammatorisches Zytokin, welches vorrangig von Monozyten und Makrophagen, aber auch von Endothelzellen und Fibroblasten synthetisiert und sezerniert wird [64;65]. Die Arbeitsgruppe um Dai Fukumura [66] hat Hinweise gefunden, dass IL-1 ein wichtiger Mediator ist, der für intestinale Mucosaschäden unter LPS-induzierter Endotoxämie mit verantwortlich ist. In der Funktion und der Wirkungsweise ähneln sich TNF- α und IL-1. Sie sind verantwortlich für die Synthese von Prostaglandin E₂ (PGE₂), aus dem Zellmembranbestandteil Arachidonsäure durch Cyclooxygenase Typ II (COX-2). Dinarello et al. [53;64] konnten nachweisen, dass PGE₂, das im vorderen Hypothalamus gebildet und ausgeschüttet wird, für die Entstehung von febrilen Temperaturen mitverantwortlich ist. Ebenso wie TNF- α ist auch IL-1 für die Aktivierung der Phospholipase A₂ (PLA₂), der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) und für die Chemotaxis von Leukozyten inklusive der Endothelaktivierung für eine Leukozyten-Endothel-Interaktion mit verantwortlich [59]. Molekularbiologisch existiert IL-1 in zwei Isoformen. Zum einen als IL-1 α , das hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen produziert wird und daher die Hauptaufgabe des Barrierschutzes innehat. Zum anderen existiert die Isoform IL-1 β , das vorrangig von Monozyten als Antwort auf exogene Pyogene, wie zum Beispiel LPS, sezerniert wird [64].

2.1.2.3 Interferon gamma (IFN- γ)

Auch bei dem Glykoprotein Interferon gamma (IFN- γ) handelt es sich um ein proinflammatorisches Zytokin, wie Doherty et al. [58] herausgefunden haben, nachdem sie TNF- α über spezifische Antikörper blockierten und die Wirkung inhibierten. Die Arbeitsgruppe um Thomas Held [67] fand in dem Zusammenhang heraus, dass unter Vorbehandlung von IFN- γ eine sonst nicht letale Dosis von LPS unter experimentellen Bedingungen an Mäusen tödlich verlaufen kann. Weiterhin gibt es Hinweise, wonach es eine Interaktion zwischen LPS-

induzierter NF κ B-Aktivierung und dem JAK / STAT-Komplex (Januskinase / Signal Transducers and Activators of Transcription) Signaltransduktionswege geben muss. Außerdem wurde angenommen, dass durch die IFN- γ -Vorbehandlung die Bindungsfähigkeit von NF κ B an die DNS und die Abspaltung von Inhibitor of kappa B (I κ B) gesteigert wird, wodurch NF κ B eine bessere Wirkung erzielen kann. Eine weitere Funktion des IFN- γ ist die Steigerung der iNOS-Aktivität, die ebenfalls zur Erhöhung der Letalität bei einer Endotoxinämie beiträgt [68].

2.1.2.4 Interleukin 4 (IL-4)

Im Gegensatz zu den bisher erläuterten Zytokinen, handelt es sich beim Interleukin 4 (IL-4) um ein antiinflammatorisches Zytokin, das ebenfalls ein entscheidender Parameter im Überleben der schweren Sepsis zu sein scheint [69]. Grundsätzlich handelt es sich beim IL-4 um ein Glykoprotein, das von aktivierten CD8-positiven T-Lymphozyten, Mastzellen und basophilen Granulozyten synthetisiert und sezerniert wird. Bei den bisher identifizierten Effekten vom IL-4 handelt es sich zum einen um die Induktion von Differenzierung und Proliferation von T-Helfer-Zellen vom Typ 2 und zum anderen um die Steigerung der IgE-Sekretion von B-Zellen. Weiterhin fördert IL-4 die Proliferation von Fibroblasten und die Synthese von extrazellulärer Matrix. Zusätzlich wird unter IL-4 auch noch die Expression der Cyclooxygenase Typ II (COX-2) gesteigert [70]. Die Arbeitsgruppe um C. Marie et al. [40] stellte in vitro an humanen polymorphonukleären Zellen fest, dass IL-4 die LPS-induzierte Sekretion von IL-8 signifikant, einem potenten inflammatorischen Zytokin, senken kann. Diese inhibitorische Aktivität findet hierbei auf Transkriptionsebene statt. Ein weiterer Aspekt auf molekularer Ebene ist, dass bei der mRNA, durch alternatives Splicen, vier Exons ausgeschnitten werden. Das zweite Exon wird dabei als IL-4- δ -2 bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, dass IL-4- δ -2 als IL-4-Antagonist wirkt. Dieser Effekt wurde mit rekombinatem humanen IL-4- δ -2 gezeigt [69]. Die Arbeitsgruppe um Wu Huang-Pin [69] konnte zudem eine hohe IL-4-mRNA Expression während einer schweren Sepsis nachweisen, welche mit einer höheren Überlebensrate korreliert. Hingegen schien die IL-4-Konzentration im Blutplasma keinen Einfluss auf das Überleben einer schweren Sepsis zu haben.

2.1.2.5 Monozyten Chemotaxis Protein-1 (MCP-1)

Das Monozyten Chemotaxis Protein-1 (MCP-1) gehört zu der großen Gruppe der Chemokine, genauer in die Gruppe der γ -Chemokine. CCR2 (chemokine receptor type 2) ist der Rezeptor für MCP-1, der vor allem inflammatorische Funktionen induziert [71]. MCP-1 wird von vielen Zellen produziert und sezerniert. Dazu gehören unter anderem Endothel-, Epithel-, glatte Muskel- und Microgliazellen, Astrozyten, Fibroblasten, Adipozyten, B-Lymphozyten und Monozyten. Bei der Synthese unterscheidet man die konstitutive und Induktionssynthese, die durch oxydativen Stress, Wachstumsfaktoren oder auch durch Zytokine vorangetrieben wird. Es hat sich gezeigt, dass MCP-1 eines der wichtigsten Chemokine für die Rekrutierung von Monozyten ist [71]. Weiterhin ist bekannt, dass MCP-1 bei der Differenzierung der T-Lymphozyten eine wichtige Rolle zukommt [72]. Die Arbeitsgruppe um Gomes [73] konnte zudem zeigen, dass MCP-1 ebenfalls bei der Kontrolle des Gleichgewichts zwischen pro- und antiinflammatorischen Reaktionen eine wichtige Rolle spielt. Weiterhin konnten Gomes et al. zeigen, dass bei Mäusen, die einen MCP-1 Mangel haben, die Migration von Leukozyten (vor allem Monozyten) deutlich verringert war, nachdem eine peritoneale Sepsis durch eine Ligatur und Punktion des Caecums verursacht wurde. Des Weiteren zeigte sich eine verringerte Konzentration von antiinflammatorischem Interleukin 10, was mit einer erhöhten Mortalität korreliert.

2.1.3 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Die zytokinbedingte Aktivierung der zirkulierenden Leukozyten mit anschließender Migration in das Interstitium und chemotaktisch gesteuerter Fortbewegung zum Inflammationsfokus, zählt zu den Kernmechanismen der zellulären Immunantwort. Dabei ist es irrelevant, ob die Ursache eine Infektion, immunologische Reaktion, Ischämie, Reperfusion oder ein Trauma ist. Obgleich dieser Vorgang möglicherweise eine gewisse organschädigende Wirkung hat, ist er dennoch wichtig für die anschließende Wundheilung [74;75].

Die erste Phase ist die Migration. Dieser Vorgang beinhaltet eine Interaktion zwischen den Leukozyten und dem Endothel der postkapillären Venolen in den von der Inflammation betroffenen Geweben. Die Interaktion ist durch eine temporäre Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelzellen gekennzeichnet. Durch diese repetitiven, kurzzeitigen Adhäsionen zwischen Leukozyten und Endothel entsteht der Eindruck von „rollenden“ Leukozyten entlang des Endothels mit einer Geschwindigkeit von $\leq 50\mu\text{m/s}$. Aufgrund des Rollens werden diese

Leukozyten auch als Roller bezeichnet. Es kommt aufgrund der erhöhten Scherkräfte zu einer Deformität dieser. Ein solcher Vorgang stellt einen weiteren Hinweis dafür dar, dass Adhäsionskräfte zwischen Leukozyten und Endothel vorhanden sind [75;76].

Das Rollen der Leukozyten ist vor allem durch Selektine, einer Gruppe von transmembranen Adhäsionsmolekülen, möglich. In den Leukozyten befinden sich die L-Selektine. Für Lymphozyten sind die L-Selektine auch für das Homing-Phänomen verantwortlich. Die L-Selektine sind ständig auf der Leukozytenoberfläche präsentiert. Auf Seite des Endothels stehen zwei verschiedene Selektine. Zum einen P-Selektin, welches in den Palade-Weibel-Körperchen bereits vorproduziert ist und nach Stimulation durch Thrombin oder Histamin durch Exozytose an die Zelloberfläche gelangt [77;78]. Zum anderen E-Selektine, die durch Stimulation von Zytokinen, wie IL-1, TNF- α oder LPS, neu synthetisiert werden und ebenfalls durch Exozytose an die Oberfläche der endothelialen Zellmembran gelangen. Zwischen der Verbindung von L-Selektin mit P-Selektin oder E-Selektin besteht nur eine temporäre schwache Bindung [79;80]. Für eine feste Haftung ist eine weitere Gruppe von Adhäsionsmolekülen notwendig und zwar die Gruppe der Integrine. Als Integrine werden Proteine bezeichnet, die aus zwei heterogenen Untereinheiten, einer α - und einer β -Untereinheit, bestehen. Auch diese sind bereits präformiert und auf der Oberfläche von Leukozyten präsentiert, aber inaktiv. Anwesende Chemokine binden an G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GKR). Diese beinhalten eine endogene Kinase und drauffolgend werden die Integrine über Signalwege phosphoryliert, wodurch sie in den aktiven Zustand gelangen (inside-out-signaling) [81;82]. Die Interaktionsmoleküle auf der Zellmembran des Endothels sind die intercellular-adhesion-molecule-1 und -2 (ICAM-1/ICAM-2) sowie die vascular-cell-adhesion-molecule-1 und -2 (VCAM-1/VCAM-2). Diese gehören zu einer Immunglobulin-Superfamilie für Adhäsionsmoleküle. Die ICAM-1 und ICAM-2 bzw. VCAM-1 und VCAM-2 Expression wird maßgeblich durch die Stimulation von IL-1, TNF- α und LPS ausgelöst. Nach der Bindung von Integrinen mit ICAM-1 bzw. VCAM-1 kommt es zu einem Signal ins Zellinnere der Leukozyten, wodurch die Migration beginnen kann [83]. Diese Leukozyten mit permanenter Adhäsion werden auch als Sticker bezeichnet [79]. Neben der Leukozytenadhäsion spielt VCAM-1 auch eine entscheidende Rolle bei der Arteriosklerose und bei der Metastasierung von Tumoren [75].

Sowohl die Anzahl der Roller als auch der Sticker in den postkapillären Venolen ist durch Endotoxine, wie zum Beispiel LPS, signifikant steigerbar [84]. Hingegen ist diese durch vascular-endothelial-growth-factor (VEGF) und Stickstoffmonoxid (NO) signifikant verringerbar [85].

Die Rekrutierung von Leukozyten in ein Inflammationsgebiet ist wichtig und notwendig, da das Risiko von rezidivierenden bakteriellen Entzündungen mit tödlichem Ausgang besteht, wie es bei dem Leukozyten-Adhäsionsdefekt-Syndrom beschrieben ist. Hingegen gibt es Hinweise, dass die Hemmung der Leukozytenadhäsion bei einem ischämischen Reperfusionsschaden ein besseres Outcome zeigt [81]. Eine zu lange oder zu hoch konzentrierte Stimulation mit Chemokinen, wie bei einer Sepsis oder einer Endotoxinämie, sorgt für eine exzessive Aktivierung der GKP-Kinase, das zu einer Desensibilisierung führen kann. Dies hat zur Folge, dass weniger Leukozyten das Inflammationsgebiet erreichen [86].

2.2 Src-Tyrosinkinase

2.2.1 Aufbau

Die Src-Tyrosinkinase-Familie besteht aus der c-Src-Kinase (oft auch nur als Src bezeichnet), die als erste der Familie bereits in den 70er Jahren identifiziert wurde und somit als Grund-/Hauptstruktur zu betrachten ist. Src stellt ein Akronym dar, das sich aus „cellular sarcoma“ zusammensetzt. Angelehnt an die Src-Struktur wurden im Weiteren die Kinasen Lyn, Fyn, Lck, Hck, Fgr, Blk, Yrk und Yes identifiziert [87;88]. Bei den Src Kinasen handelt es sich um zytosolische Proteine, die mit der Zellmembran in einer Assoziation stehen [89].

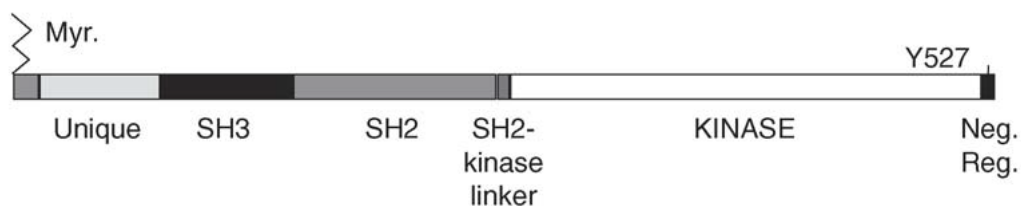


Abb. 4 Struktur der Src-Tyrosinkinase [89]

Wie in Abb. 4 dargestellt, ist die Src-Tyrosinkinase aus vier Domänen aufgebaut. In der Abbildung wird eine Domäne jeweils als Src-homology (SH) bezeichnet. Die SH-1 Domäne hat zwei Funktionen. Sie dient zum einen der Autophosphorylierung und zum anderen der Kinasefunktion. Daher wird diese auch als Kinase-Domäne bezeichnet. Die SH-2- und SH-3-Domäne beinhaltet Bindungsstellen für die SH-1-Domäne, wenn sich diese im inaktiven Zustand befindet. Weiterhin sind sie zusammen mit dem C-Terminus für die Regulation der Kinase zuständig. Die SH-4-Domäne, auch als Unique bezeichnet, enthält Myristoylierungsstellen. Damit ist die SH-4-Domäne für die Verankerung an der Zellmembran

im aktivierten Zustand verantwortlich. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Myristoylierungsstellen für onkogene Mutationen mit verantwortlich sind [90]. Myristoylierung ist der Prozess, bei dem Myristinsäure an den N-terminalen Glycinrest von Proteinen angehängt wird.

Am C-Terminus ist das Tyrosin, das an Stelle 527 steht, phosphoryliert (Y527). Darüber hinaus besteht an dieser Stelle eine Verbindung zur SH-2-Domäne. Es hat sich gezeigt, dass die Phosphorylierung an Y527 der Hauptgrund für die Inaktivität darstellt [87]. Weiterhin besteht eine Verbindung zwischen der Kinase-Domäne und der SH-3-Domäne.

Der Übergang zum aktiven Zustand ist gekennzeichnet durch eine Dephosphorylierung von Y527, durch die Protein-Tyrosin-Phosphatase CD45 und einer folgenden Autophosphorylierung von Tyrosin, das an der Stelle 416 steht (Y416) [88]. Das führt dazu, dass sich die Verbindungen zwischen der Kinase und den SH-3- und SH-2-Domänen sowie dem C-Terminus lösen.

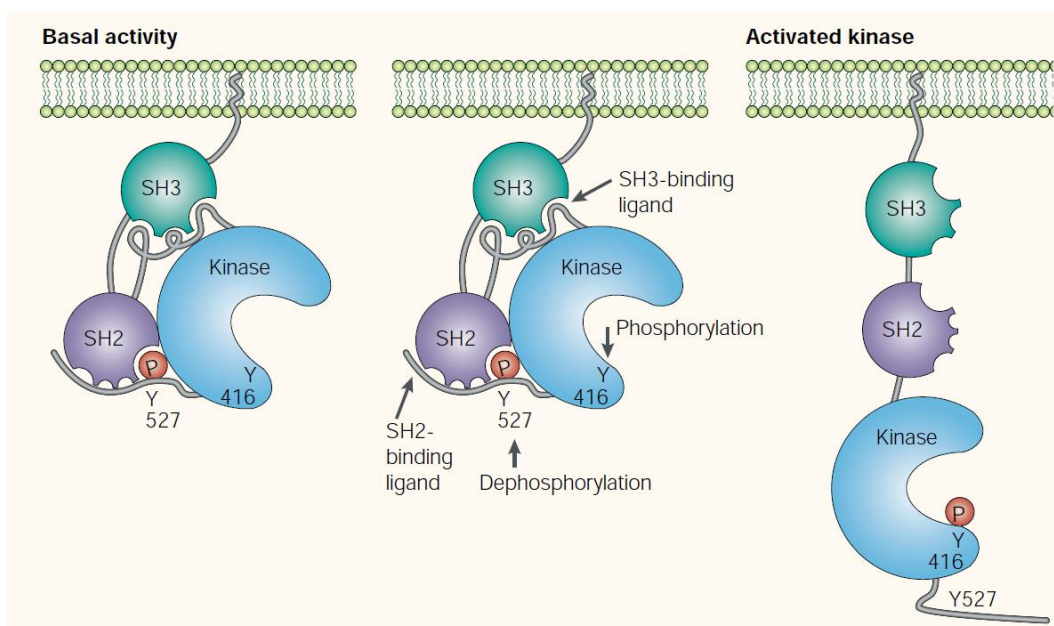


Abb. 5 Schema der Aktivierung der Src-Tyrosinkinase [91]

Die Abb. 5 zeigt schematisch, dass die Dephosphorylierung von Y527 und die Phosphorylierung von Y416, eine Änderung der Raumstruktur zur Folge hat. Die aktive Src-Kinase ist selbst in der Lage, andere Proteine durch Phosphorylierung zu aktivieren [91-93]. Um wieder den inaktiven Zustand des Moleküls zu erreichen, wird durch CD45 eine Dephosphorylierung (Y416) und durch eine C-terminale-Kinase eine Phosphorylierung (Y527) herbeigeführt [94].

2.2.2 Funktionsweise

Die Überführung aus dem inaktiven in den aktiven Zustand kann durch viele verschiedene extrazelluläre Stimuli geschehen, zum Beispiel durch membranöse β -adrenerge Rezeptoren oder den Epidermal growth factor receptor (EGFR). Die Aktivierung der Src-Tyrosinkinasen ist durch unterschiedliche Signalkaskaden möglich. Hierbei ist zu beachten, dass die Zielproteine der Src-Kinase in Abhängigkeit zur Signalkaskade stehen. Je nach Signalkaskade werden andere Proteine aktiviert [95]. Im Lauf der Zeit konnten unter dem Gesichtspunkt viele verschiedene Zielproteine, wie auch viele Hinweise auf Auswirkungen der Src-Familie gefunden werden. Unter anderem wurde gezeigt, dass die Src-Familie eine Rolle in der osteoklastenbedingten Knochenresorption trägt, da eine Blockade der Kinase eine verminderte Osteoklastenaktivität zur Folge hat und dementsprechend auch ein verminderter Knochenabbau nachweisbar ist [96]. Ein großer Einsatzbereich der Src-Familie konnte in der Tumorproliferation, -migration und -metastasierung bei verschiedenen Tumorentitäten [97-100], aber auch in der Entwicklung und des Fortschreitens des Morbus Alzheimer [101], gezeigt werden. Weil c-Src in Tumorzellen hoch überexprimiert ist, wurde diese Kinase als eine der ersten Protoonkogene identifiziert und bezeichnet [102-103]. Ein weiterer Einsatzbereich und für die vorliegende Arbeit auch der wichtigste Bereich, ist das Inflammations- und Sepsisgeschehen. Es wird behauptet, dass die Src-Kinasen in Monozyten und Makrophagen essentiell für die Immunantwort bei Gewebeerstörung oder anderen Pathogenen wie LPS sind. Dies sollte unter anderem darauf beruhen, dass die Synthese von iNOS und TNF- α gesteigert wird [104]. Zusätzlich durch die Src-Aktivität wird auch NF κ B aktiviert bzw. vermehrt synthetisiert. Dadurch wird das Inflammationsgeschehen beschleunigt [36]. Außerdem korreliert die Neutrophilenadhäsion mit der Fgr- und Lyn-Aktivität und die c-Src-Aktivität mit der Angiogenese [88]. Die Arbeitsgruppe um Zeljka Korade-Mirnic [105] hat gezeigt, dass die Src-Tyrosinkinasen an der Adhäsion und Migration von Leukozyten beteiligt sind und weiterhin einen großen Einfluss auf den Zellzyklus und die Phagozytose haben. Ein Beispiel dafür konnten Hui Jia et al. [106] zeigen. Diese publizierten, dass durch das Vorhandensein von LPS die Funktion von Lyn gesteigert wird. Dadurch kann Caspase-8 phosphoryliert werden, was zur Folge hat, dass die Caspase-8-induzierte Apoptose reduziert wird. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass nach pulmonaler Ischämie die Expression der Src-Kinasen und das Leukozytenrecruitment steigen, was einen Gewebeschaden nach sich zieht [46]. Wang et al. [107] haben außerdem gezeigt, dass die Myozyten durch eine LPS-induzierte Phosphorylierung des Creatinin-Transporters durch die Src-Tyrosinkinase, mehr Creatinin zur Verfügung haben,

wodurch ihr Stoffwechsel erhöht ist. Erst durch eine vorherige orale Zufuhr von Creatinin kann dieser Effekt reduziert werden [108]. Dies sind Hinweise dafür, dass die Src-Kinase-Familie ein hohes und breites Einsatzspektrum besitzt und dennoch gezielt arbeitet. Im Wissen um dieses breite Spektrum sind schon große Fortschritte in der Therapie von verschiedenen Pathologien gelungen, wie zum Beispiel die Funktionsweise des Bisphosphonats Alendronat, das die Protein-Tyrosin-Phosphatase- ϵ (PTP- ϵ) hemmt, was eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Osteoklasten spielt. Somit ist der PTP- ϵ -Hemmer Alendronat eine Therapieoption bei der Osteoporose [101].

2.3 PP2

Der Src-Familien-Tyrosinkinase-Inhibitor PP2 (4-amino-5-[4-chlorophenyl]-7-[dimethylethyl]pyrazolo{3,4-d}pyrimidine) wurde in den 90er Jahren von Pfizer (Central Research, Groton, Connecticut, USA) beschrieben.

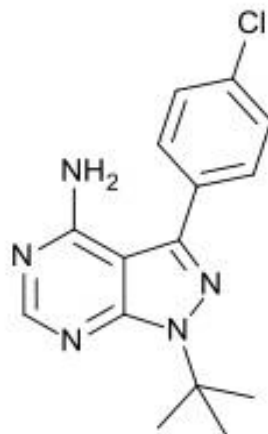


Abb. 6 Struktur PP2 [109]

Die Studie befasste sich mit den Effekten von PP2 auf die T-Zell-Rezeptor induzierte T-Zell-Aktivierung durch Hemmung der Tyrosinkinasen Lck, Fyn und c-Src. Es wurde publiziert, dass es durch diese Inhibition zu einer selektiven Inhibition der IL-2-Gene in den T-Zellen, jedoch nicht zur Hemmung der IL-2-Rezeptor-Gene kommt [109].

Die inhibitorische Wirkung von PP2 auf die Src-Kinasen beruht auf einer kompetitiven Bindung an einer hydrophoben Tasche, wie in der Abb. 7 dargestellt, welche sich in der Nähe der ATP-Bindungsstelle befindet. Diese Region wird auch als „gatekeeper-site“ bezeichnet. Die Bindung besteht dabei zum einen aus Van-der-Waals-Kräften mit mehreren Liganden und zum anderen aus Wasserstoffbrückenbindungen. Die Konstellation der Aminosäuren der „gatekeeper-site“ ist einzigartig für die Src-Tyrosinkinase-Familie [110].

In Abb. 7 wird die schematische Bindung von PP2 an Lck gezeigt, gestrichelte Linien stellen die Wasserstoffbrückenbindungen dar, Halbkreise symbolisieren die Van-der-Waals-Liganden [110].

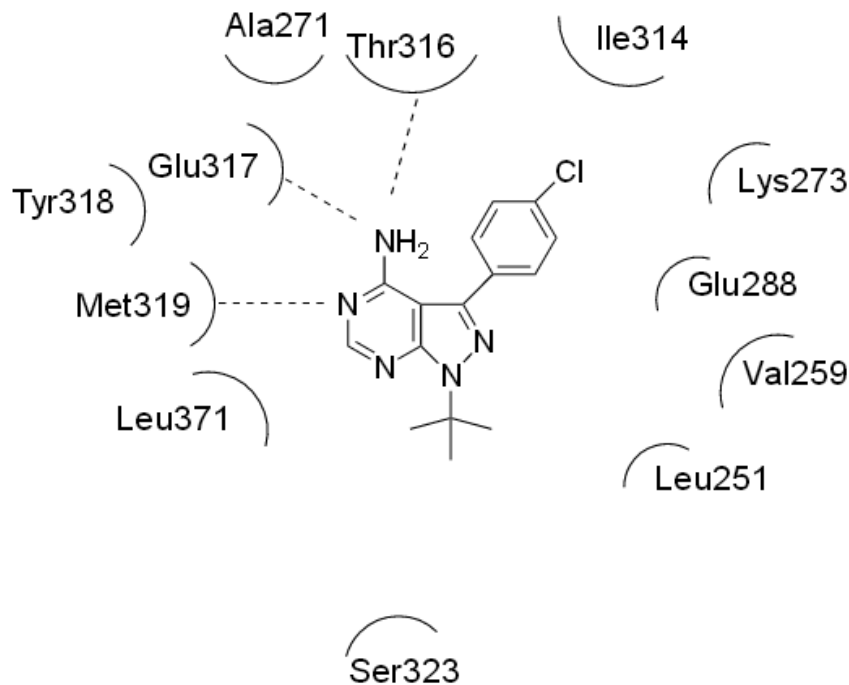


Abb. 7 Schema der Bindungen von PP2 an Aminosäuren von Lck [110]

Bain et al. [102] konnten in einer großen Protein-Assay-Studie Hinweise liefern, dass PP2 die Kinasen CK1 δ , Lck, RIP2, Eph-A2, FGF-R1 und Src effektiv hemmt, wodurch die Kinasen eine Restaktivität von unter 10% haben. Andere Kinasen der Familie wurden dabei nicht getestet. Jedoch ist damit auch verbunden, dass PP2 spezifisch, aber nicht hochspezifisch nur auf die Src-Tyrosinkinase-Familie wirkt. Aus diesem Grund und im Zuge der fortschreitenden Kinom-Analyse und -Identifikation werden hochspezifische Inhibitoren für die einzelnen Src-Kinasen der Familie entwickelt [103].

Dennoch hat sich die Rezeptorblockade der Src-Kinasen mit PP2 in der Literatur bereits etabliert. Damit konnten sowohl die Funktion der Kinasen und als auch die therapeutischen Möglichkeiten bei der Blockierung ermittelt werden [89]. Zum Beispiel haben Lu Kong et al. [98] nachweisen können, dass bei Blockierung von Src durch Anwendung von PP2 die Proliferationsrate gesenkt wird. Die Senkung der Proliferationsrate bei Anwendung von PP2 konnte unter anderem auch beim Neuroblastom und beim duktalem Pankreaskarzinom festgestellt werden [99;100]. Bei letzterem zeigte sich eine Verminderung der Migration und Invasion [100]. Auch in der Blutdruckregulierung scheinen die c-Src-Tyrosinkinasen eine Rolle

zu spielen. So haben Han et al. zeigen können, dass die c-Src-Aktivität im Nucleus paraventricularis deutlich erhöht war, nachdem an den Ratten (Sprague Dawley, männlich) die rechte A. renalis partiell geklippt wurde, um eine renale Hypertonie zu induzieren. Diese erhöhte Aktivität wurde als ein verbesserter kardial-sympathisch-afferenter Reflex interpretiert [111].

Anhand der Feststellung, dass die Src-Expression in Makrophagen, durch Stimulation mittels LPS, bei der Sekretion von NO und TNF- α eine entscheidende Rolle spielt, lässt sich ableiten, dass der Src-Tyrosinkinase-Familie eine wesentliche Rolle in der Entstehung und Therapie der Sepsis zukommt [104]. Die genannte Reaktion läuft über den CD14⁺- und TLR4-Rezeptorweg ab. Aber auch andere Zellen, wie hepatische Kupffer-Sternzellen, sind nach Stimulation mit LPS zur Zytokinsynthese fähig. Auch in diesem Fall lässt sich durch die Src-Blockierung mittels PP2 eine Reduktion der Synthese erreichen [112]. Die Arbeitsgruppe um Takeshi Oyaizu [46] konnte an Ratten (Sprague Dawley, männlich), unter Verwendung von PP2 in der Dosis von 0,2mg/kg Körpergewicht, eine deutliche Reduktion des akuten Lungenversagens nach einer Reperfusionischämie nachweisen. Zudem konnte die Arbeitsgruppe eine Minderung der pulmonalen Infiltration von Leukozyten und der MCP-1 Konzentration im Serum nachweisen. In Anbetracht dieser Tatsache, wird in der vorliegenden Arbeit ebenfalls die Konzentration von 0,2mg/kg KG PP2 verwendet. Eine Publikation über Veränderungen der Mikrozirkulation des terminalen Ileums unter Verwendung von PP2 während einer Endotoxinämie am Modell der Ratte, ist bisher nicht veröffentlicht worden.

2.4 Dimethyl Sulfoxid

Dimethyl Sulfoxid (DMSO) ist ein schwaches Antioxidans, welches in der Lage ist, freie Radikale zu binden und so die Effekte und Schädigungsmöglichkeiten zu vermindern bzw. zu minimieren. Chang et al. [37;61] haben festgestellt, dass DMSO auch die Aktivität von NF κ B beeinflussen kann. Allerdings sind für signifikante Effekte sowohl als Antioxidans, als auch für die Wirkung an NF κ B eine Wirkdauer von mehr als 3 Stunden und eine ausreichende Dosierung notwendig.

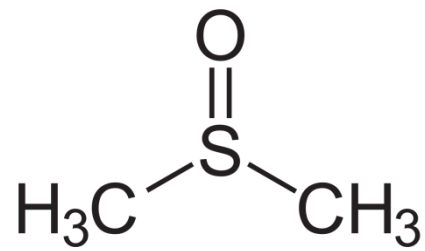


Abb. 8 Struktur DMSO

Weiterhin ist DMSO ein gutes Lösungsmittel und ein Trägerstoff für andere Substanzen. Diesen Eigenschaften werden in der therapeutischen Anwendung von perkutanen und intravenösen Arzneimitteln genutzt, sowie auch in den hier durchgeführten Versuchen. In der Literatur ist beschrieben, dass DMSO keine Auswirkungen auf Lebensfähigkeit oder andere Zelleigenschaften hat [46;96].

3 Zielsetzung und Arbeitshypothese

Bisher wurde PP2 in der Forschung angewandt um die Funktion der Src-Tyrosinkinasefamilie zu untersuchen. Jedoch versuchten einige Forschungsgruppen anhand von Experimenten an Versuchstieren, für Eigenschaft der Src-Inhibition, eine klinische Anwendung zu finden. Dies trifft vor allem für die Tumorthherapie zu [98-100].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Auswirkung des synthetischen Src-Tyrosinkinasefamilien-Inhibitor PP2 auf die Mikrozirkulation des terminalen Ileums in einem endotoxiämischen Ratten-Modell zu untersuchen und mittels Intravitalmikroskopie nachzuweisen. Aus dieser Konstellation ergeben sich folgende Arbeitshypothesen:

- 1) PP2 vermindert die LPS induzierte Leukozytenadhärenz
- 2) PP2 erhöht, unter endotoxiämischen Bedingungen, die funktionelle Kapillardichte (FCD) und verringert dabei dysfunktionelle und nonfunktionelle Kapillardichte (DFCD, NFCD) in den Muskelschichten und der Mucosa
- 3) PP2 verbessert die Blutgasparameter (Lactat, Glucose, pO₂, pCO₂, pH, HCO₃⁻)
- 4) PP2 senkt die LPS induzierte Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 α , IFN- γ , TNF- α) und hebt die Konzentration von IL-4 und MCP-1 im Serum
- 5) PP2 verbessert die klinischen Parameter während des Versuches (Verlauf des arteriellen Blutdruck, mittlerer arterieller Blutdruck, Verlauf der Herzfrequenz)

Dabei werden die temporäre und permanente Leukozytenadhärenz, sowie die Kapillardichte der Lamina muscularis longitudinalis und circularis in den Venolen der 1. und 3. Ordnung, als primäre Endpunkte definiert. Als sekundäre Endpunkte werden die Blutgasparameter und die Zytokinkonstellation sowie die klinischen Parameter definiert.

4 Methodik

4.1 Versuchstiere

Insgesamt wurden in der Studie 40 männliche Lewis Ratten mit einem Gewicht von 250 ± 40 g im Alter von 6 bis 7 Wochen verwendet. Die Ratten wurden bei der Charles River (WIGA) GmbH (in Sulzfeld, Deutschland) bestellt und an das BioTechnikum Greifswald GmbH geliefert, in der die Versuchstiere für eine Woche vor Versuchsbeginn gehalten wurden. Die Versuche an den Lewis Ratten orientierten sich an den Richtlinien für die Durchführung von Tierversuchen gemäß § 7, 8 sowie 9 des Tierschutzgesetzes und wurden vom zuständigen Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fischerei Mecklenburg-Vorpommern genehmigt (Aktenzeichen: 7221.3-1.1-035/12). Die Versuche wurden zwischen November 2012 und März 2013 durchgeführt.

4.2 Gruppeneinteilung

In der Studie wurden die Versuchstiere in vier Gruppen (je n=10) eingeteilt. Gruppe I und II wurden mit 20%igem Dimethyl Sulfoxid (DMSO), die Gruppen III und IV mit PP2 (4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(dimethylethyl)pyrazolo[3,4-d]pyrimidine) mit einer Dosierung von 0,2mg/kg Körpergewicht einmalig behandelt. Diese Dosierung wurde bereits bei der Forschungsgruppe um Takeshi Oyaizu [46] verwendet und zeigte dabei eine effektive Wirkung. Die Gruppen II und IV wurden zusätzlich mit Lipopolysaccharid (LPS) Escherichia coli, Serotyp O26:B6, 500000 EU (endotoxin units/mg) mit einer Konzentration von 5mg/kg KG behandelt, wohingegen den Gruppen I und III NaCl 0,9% als Placebo appliziert wurde. An allen Versuchstieren wurden die gleiche technische Präparation und Operation durchgeführt. Die Gruppe I mit 20%igem DMSO ist als Kontrollgruppe anzusehen, da 20%iges DMSO als Lösungsmittel für PP2 diene.

Gruppe	DMSO	PP2	NaCl 0,9%	LPS
<u>I</u>	<u>X</u>		<u>X</u>	
<u>II</u>	<u>X</u>			<u>X</u>
<u>III</u>		<u>X</u>	<u>X</u>	
<u>IV</u>		<u>X</u>		<u>X</u>

Tab. 1 Gruppeneinteilung

4.3 Versuchsmodell

4.3.1 Versuchsaufbau

Der allgemeine Versuchsablauf war für alle Versuchsgruppen identisch. Die Präparation des Collums dauerte zwischen 20 und 25 Minuten. Die Präparation beinhaltete eine Tracheotomie und das invasive Einlegen von Kathetern. Im Anschluss folgte die erste Blutentnahme (BE1). Es folgte eine 15 minütige Ruhephase bevor die Endotoxinämieinduktion mittels LPS-Applikation bzw. die Applikation des Placebos NaCl 0,9% erfolgte. Diese Applikation ist als Versuchsbeginn anzusehen und entspricht dem Zeitpunkt T=0. 15 Minuten später (T=15) wurden PP2 bzw. Placebo / NaCl 0,9% intravenös verabreicht. Die Applikationen erfolgten jeweils über die Vena jugularis interna. 90 Minuten (T=90) nach der Applikation von LPS / Placebo wurde die mediane Laparotomie vorgenommen, das terminale Ileum freigelegt und mobilisiert. Nun erfolgte die Umlagerung auf die Vorrichtung für die intravitale Mikroskopie (IVM). Die IVM inklusive Videoaufnahmen begann zum Zeitpunkt T=120 Minuten nach Versuchsbeginn und hatte eine Dauer von 20 bis maximal 30 Minuten. Für die IVM wurden Rhodamin und FITC verabreicht. Zum Zeitpunkt T=150 Minuten erfolgte die zweite Blutabnahme (BE2). Nach erfolgreicher Abnahme wurde ein Herzkreislaufstillstand durch 2 bis 4ml einer zweimolaren Kaliumlösung herbeigeführt [27;113].

Zeitpunkt	Aktion
	Anästhesie
	Präparation
T=-15	BE1
T=0	NaCl 0,9% / LPS
T=15	PP2 / DMSO
	Ruhe
T=90	Laparotomie
T=120	Rhodamin / FITC
	IVM
T=150	BE2
	Tod

Tab. 2 Ablauf des Versuches in zeitlicher Abfolge

4.3.2 Anästhesie, Monitoring und operative Technik

Die Narkose erfolgte mit einer intraperitonealen Injektion von Pentobarbital in einer Dosierung von 60mg/kg KG. Die Narkosetiefe wurde mittels eines leichten Schmerzreizes (zwickeln mit einer Pinzette in den Schwanz) überprüft. Eine ausreichende Anästhesie wurde nach 10 bis 15 Minuten erreicht. Nun konnte das Versuchstier auf einer Wärmedecke in Rückenlage mit Klebeband kurzzeitig fixiert werden, um eine präzise Arbeitsweise zu gewährleisten. Zusätzlich wurde eine rektale Temperatursonde eingeführt. Diese Kombination diente der Regulierung und Aufrechterhaltung sowie Kontrolle der Körperkerntemperatur. Diese betrug während des gesamten Versuches jeweils $37,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Nach der Rasur, Desinfektion des Gebietes und einem 1,5 - 2cm langen medianen Halsschnitt, konnte die Präparation des Collums erfolgen. Zuerst wurde die Trachea mobilisiert und freigelegt, dann mit einem Skalpell (Klinge Nr.11) horizontal angeschnitten. Das nun sichtbare Lumen konnte mit einer 16G Braunüle® kanüliert werden (Abb.9). Mit der Tracheotomie wurde einer Verlegung der oberen Atemwege vorgebeugt. Danach erfolgte die Freilegung der Vena jugularis interna. Diese wurde kranial ligiert, mit einer chirurgischen Gefäßschere partiell eröffnet und mit einem Portex® Polythene Katheter (Außendiameter: 0,61mm, Innendiameter 0,28mm) kanüliert (Abb.10). Es folgte die Mobilisierung und Freilegung der Arteria carotis externa, dabei wurde auf die Abpräparation des Nervus vagus, der in der Regel direkt medio-dorsal vom Gefäß aus lag, geachtet (Abb.11). Vor der Kanülierung mittels Portex® Polythene Katheter (Außendiameter: 0,96mm, Innendiameter 0,58mm) musste die Arteria carotis externa kranial und kaudal mit gefäßchirurgischen Clips (Aesculap®) geklippt werden. Nach der Kanülierung wurde der kraniale Clip durch eine Ligatur ersetzt. Der kaudale Clip verblieb zum Schutz des Katheters auf Gefäßwand und Katheter (Abb.12). Über den arteriellen Katheter erfolgte ein kontinuierliches Monitoring des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) sowie der Herzfrequenz. Über beide Katheter wurden 16ml/kg KG NaCl 0,9% Lösung (B Braun Melsung AG) appliziert, 1/3 über den arteriellen und 2/3 über den venösen Katheter. Nach Abschluss der Collum-Präparation (Abb.13) wurde die erste arterielle Blutabnahme (BE1) durchgeführt. Hiermit beginnt der eigentliche Versuch mit dem Zeitpunkt T=0. Die LPS- bzw. Placeboapplikation, ebenso wie die Applikation des PP2 bzw. Placebo erfolgte über den venösen Katheter. Zum Zeitpunkt T=90 Minuten erfolgte nach Rasur und Desinfektion der Bauchhaut mit anschließender medianer Laparotomie durch einen 4,0 – 4,5cm langen Schnitt (Abb.14). Anschließend wurde wie nach Bohlen et al. [114] das terminale Ileum mit Hilfe von Wattestäbchen aufgesucht, mobilisiert und platziert, dass das terminale Ileum auf

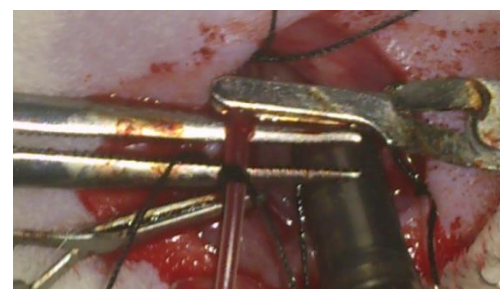
dem IVM-Platz sofort hervor luxiert werden konnte (Abb.15). Beim Luxieren wurde das terminale Ileum nicht direkt mit den Wattestäbchen berührt, sondern entweder durch Zug am Colons oder Mesenterium zum Vorschein gebracht. Nun erfolgte die Umlagerung auf die vorbereitete Halterung zur Intravitalmikroskopie (Abb.16). Nach Umlagerung auf den IVM-Platz konnte das bereit liegende terminale Ileum auf die Halterung gezogen werden (Abb.17). Anschließend wurde ein Objektträger aufgelegt und die Hanging-Drop-Leitung installiert [113]. Das luxierte Darmstück befand sich in einem Becken mit angewärmter (ca. $37 \pm 1^\circ\text{C}$) NaCl 0,9% Lösung. Dieses Becken wurde von der Hanging-Drop-Leitung gespeist (Abb.18). Zum Zeitpunkt T=120 wurden Rhodamin (1,5 ml/kg KG einer 0,05%igen Lösung) und Fluoresceinisothiocyanat / FITC (1 ml/kg KG einer 0,5%igen Lösung) intravenös verabreicht, um die Leukozyten bzw. die Gefäßwände unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen [115-118]. Nun konnte mit der Intravitalmikroskopie der Venolen 1. und 3. Ordnung begonnen werden. Für die IVM der Mucosa wurde die Wand des terminalen Ileums mit einem Elektrokauter eröffnet. Die hier verwendete Vorgehensweise wurde von der Arbeitsgruppe um Bohlen et al. abgewandelt [114] und hatte sich in anderen Versuchsreihen bereits gut etabliert [116-118]. Der gegebenenfalls vorhandene Kot wurde mit Wattestäbchen entfernt (Abb.19). Nun erfolgte die Mikroskopie der Mucosa. Zum Zeitpunkt T=150 erfolgt die zweite arterielle Blutabnahme (BE2).



Abb. 9 Kanülierung der Trachea

Abb. 10
Kanülierung der V. jugularis int.

Abb. 11 Präparation der A. carotis comm.

Abb. 12
Kanülierung der A. carotis comm.

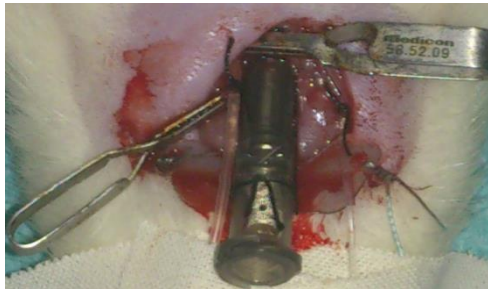


Abb. 13 Abgeschlossene Halspräparation

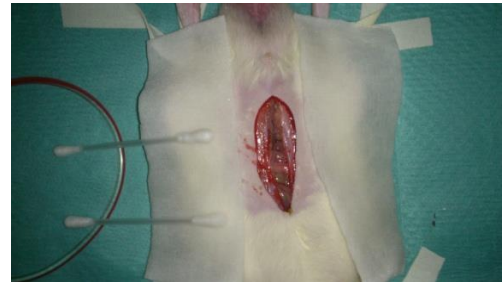


Abb. 14 Mediane Laparotomie



Abb. 15
Identifikation des terminalen Ileums



Abb. 16
Positionierung der Ratte



Abb. 17
Positionierung des terminalen Ileums



Abb. 18
Fertige Positionierung zur IVM

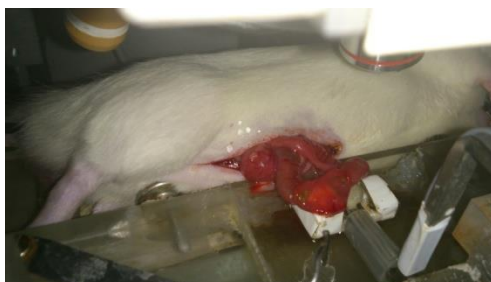


Abb. 19
Präparation zur IVM der Mucosa

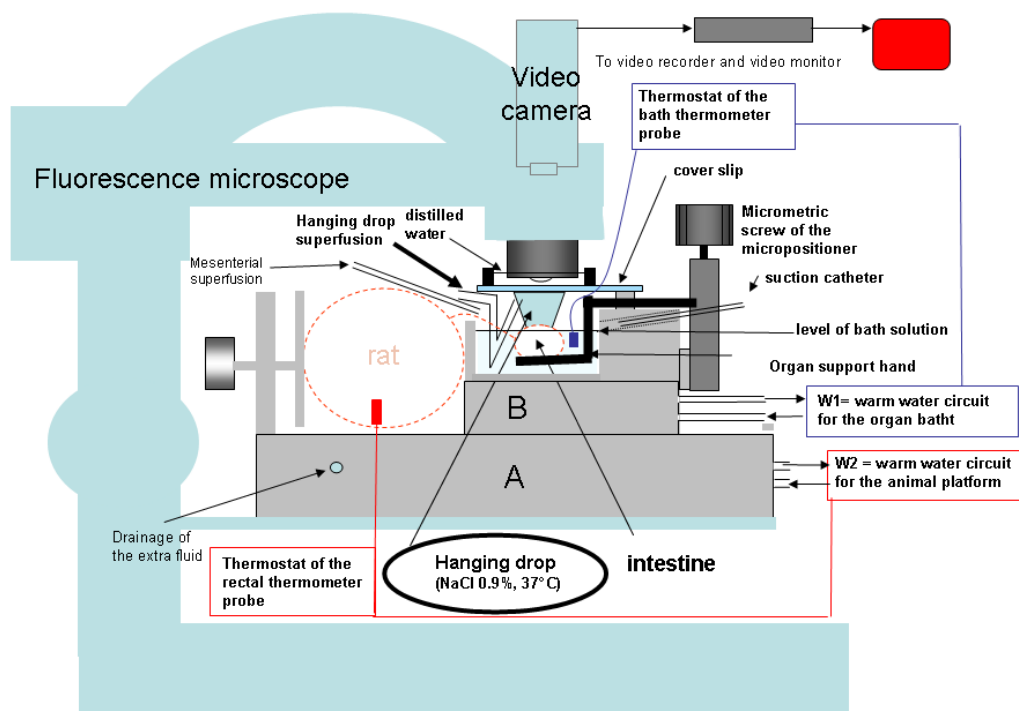


Abb. 20a Schematische Darstellung des Aufbaus [113]

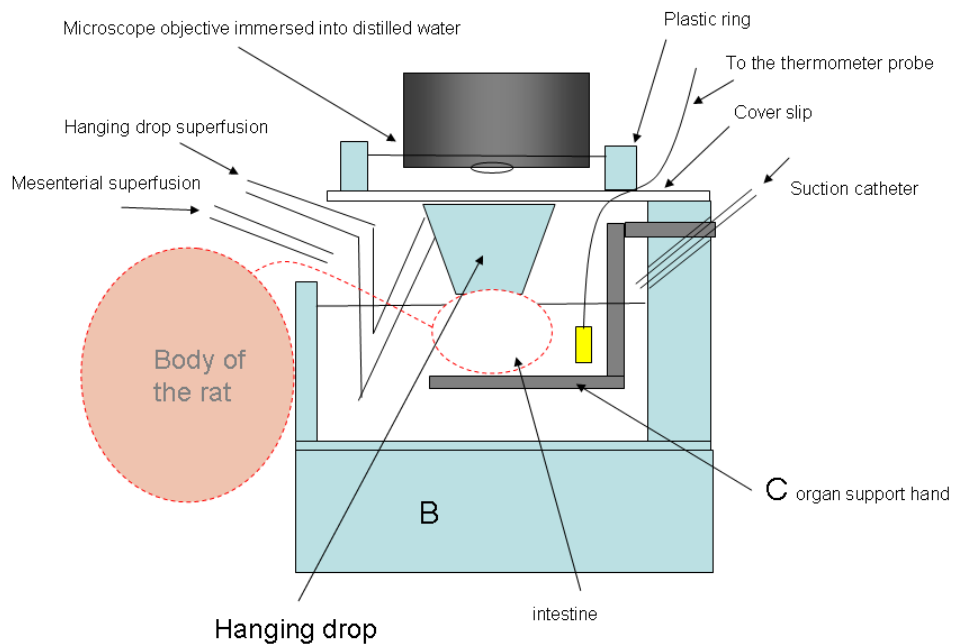


Abb. 20b Schematische Darstellung des Aufbaus [113], vergrößerter Ausschnitt

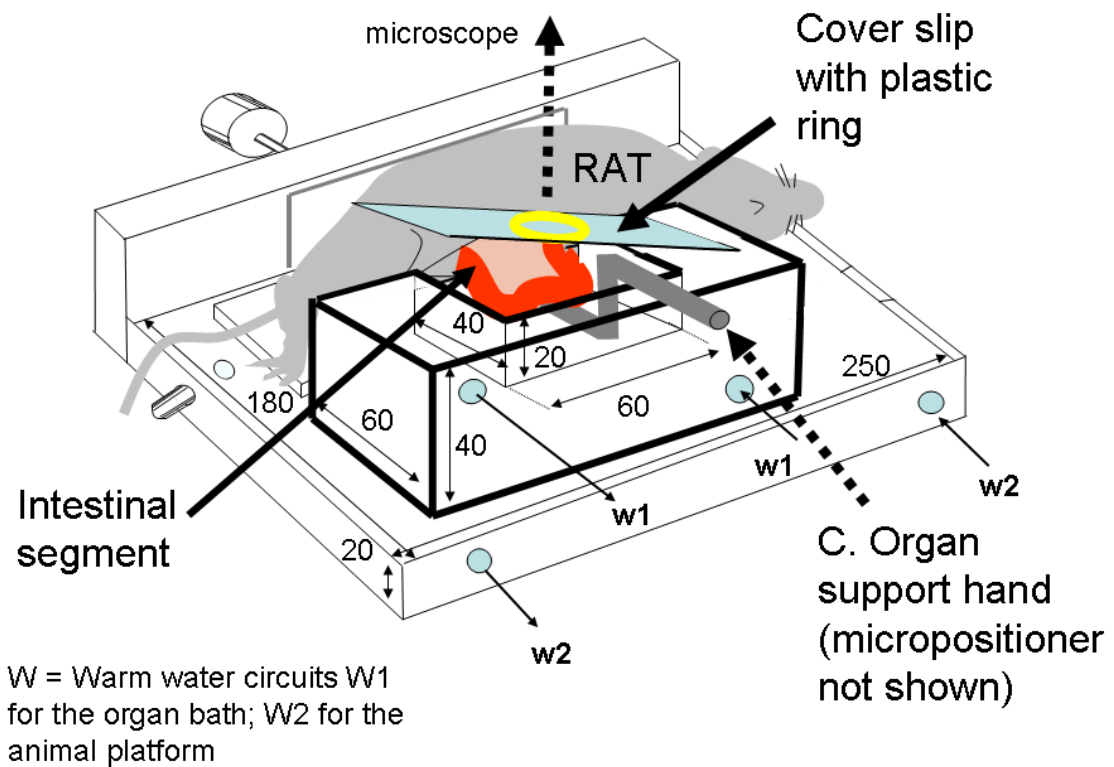


Abb. 20c Schematische Darstellung des gesamten Aufbaus [113], perspektivische Darstellung

In den Abb. 20a - 20c zeigt sich der schematische Aufbau des Halterungsapparates mit dem Intravitalmikroskop, inklusive der Hanging-Drop-Leitung, wie sie von der Arbeitsgruppe um Dragan Pavlovic [113] entwickelt wurde.

4.4 Intravitalmikroskopie (IVM)

4.4.1 Technik

Die intravitale Fluoreszenz-Video-Mikroskopie erfolgte mit den nachfolgenden technischen Materialien:

- Epifluoreszenzmikroskop Axiotech Vario, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Lichtquelle HBO 50, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Objektiv 20x/0,5; Achromplan, Carl Zeiss, Jena, 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 6G
- Videokamera: AVT-BC 12, AVT-Horn, Aalen, Deutschland
- Videorekorder: NV-HS8830, Panasonic, Großbritannien
- Monitor: PM9-5B, Ikegami Electronics GmbH, Deutschland

Die IVM erfolgte unter einer 500fachen Vergrößerung.

4.4.2 Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel

Zur Auswertung der Leukozyteninteraktion im Endothel wurden sechs Venolen 1. Ordnung (V1) und sechs Venolen 3. Ordnung (V3) verwendet. Die V1 hatten dabei einen Durchmesser von $145,8\mu\text{m} \pm 12,97\mu\text{m}$ und die V3 von $47,0\mu\text{m} \pm 7,72\mu\text{m}$ (Angaben jeweils in MW \pm SEM). Zur Darstellung der Leukozyten wurde Rhodamin 6G (1,5 ml / Kg KG einer 0,05%igen Lösung, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) verwendet. Die Definition und Abgrenzung der Venolen ist von Gore und Bohlen [119] übernommen worden. In Kombination mit dem Filtersatz Nr. 20, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Anregung: BP 546/12, Frequenzteiler: 560, Emission: BP 575-640) konnten die Leukozyten als helle rundliche Zellen sichtbar gemacht werden. Die Verwendung von Rhodamin 6G hat sich in vielen Studien mit intravitaler Mikroskopie bewährt, zudem publizierten Saetzler et al., dass Rhodamin 6G im Gegensatz zu anderen Leukozyten-Fluoreszenzstoffen keinen Vasospasmus nach sich zieht [78].

Permanente Adhäsion

Definition: Anzahl der Leukozyten, die in einem Beobachtungszeitraum von 30 Sekunden an einer umschriebenen Fläche des Endothels haften. Für die Berechnung der Endotheloberfläche wird eine Zylinderstruktur des Gefäßes angenommen [75;76].

$$[\text{adhärente Leukozyten}] = \text{Zellen} / \text{mm}^2$$

Temporäre Adhäsion

Definition: Anzahl der Leukozyten, die in einem Beobachtungszeitraum von 30 Sekunden einen festgesetzten Gefäßdiameter rollend passieren. Das Vorbeigehen geschieht typischerweise mit einer Geschwindigkeit von ca. 50µm/s [75;76].

$$[\text{Roller-flow}] = \text{Zellen} / \text{min}$$

Durch ein Objektmikrometer konnte später am Computer eine maßstabsgerechte Größe-/Längenbestimmung an den Gefäßen vorgenommen werden, in denen die Leukozyten-Endothel-Interaktionen untersucht und ausgewertet wurden.

4.4.3 Kapillardichten

Die Analyse des Kapillarnetzes bzw. der Kapillardichte erfolgte in mehreren Schichten: zum einen in der Lamina muscularis circularis, zum anderen in der Lamina muscularis longitudinalis. Zusätzlich wurde das Stratum mucosae untersucht. Auch hierbei ist die Einteilung von Gore und Bohlen zur Anwendung gekommen [119]. Zur Auswertung wurden jeweils sechs Blickfelder verwendet, die per Video / VHS Kassette aufgezeichnet worden sind. Das aufgezeichnete Material wurde zu einem späteren Zeitpunkt, zusammen mit den Aufzeichnungen der Venolen mit Hilfe der Videobildanalyse-Software CapImage® (Dr. H. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) am Computer ausgewertet.

Das Kapillarnetz wurde in drei Perfusionszustände unterteilt:

- Funktionelle (FCD)
- Dysfunktionelle (DFCD)
- Nonfunktionelle Kapillaren (NFCD)

Jedoch wurde im Stratum mucosae nur die FCD bestimmt. Zur Darstellung und Differenzierung des Kapillarnetzes wurde Fluoresceinisothiocyanat / FITC (1 ml /Kg KG einer 0,5%igen Lösung, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) verwendet [120; 121]. In Kombination mit dem Filtersatz Nr. 10, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Anregung: BP 450-490,

Frequenzteiler: 510, Emission: BP 515-565) fluoreszierten die Kapillaren hell, wohingegen die Erythrozyten blieben dunkel. So konnte zwischen einer Perfusion bzw. einer Teil- oder Nicht-Perfusion differenziert werden [118].

Funktionelle Kapillardichte

Definition: Die funktionelle Kapillardichte (FCD) sind Kapillaren mit sichtbarer Erythrozytenperfusion (erkennbar als Hell- [FITC-Dextran-markiertes Plasma] / Dunkel-[Erythrozyten] Kontrast) [113] über einen Zeitraum von 30 Sekunden. In dem definierten Zeitraum muss die Erythrozytenperfusion dem reinen Plasmafluss überwiegen [122].

$$[FCD] = \text{cm} / \text{cm}^2$$

Dysfunktionelle Kapillardichte

Definition: Die dysfunktionelle Kapillardichte (DFCD) sind Kapillaren, die im Beobachtungszeitraum einen größeren reinen Plasmafluss als eine Erythrozytenperfusion aufweisen. Jedoch muss mindestens ein Erythrozyt die Kapillare gezielt durchquert haben [122].

$$[DFCD] = \text{cm} / \text{cm}^2$$

Nonfunktionelle Kapillardichte

Definition: Die nonfunktionelle Kapillardichte (NFCD) sind Kapillaren, bei denen ein deutliches Stehen der Erythrozyten in dem Beobachtungszeitraum, keine gezielte Kapillardurchquerung oder eine Pendelbewegung der Erythrozyten sichtbar ist [122].

$$[NFCD] = \text{cm} / \text{cm}^2$$

4.5 Laborparameter, Blutgasanalyse und Zytokine

Zum Beginn des Versuches (T=0) und am Ende des Versuches (T=150) wurden jeweils 1 ml arterielles Blut aus dem arteriellen Katheter mit einer Monovette® (66x11 mm, 2 ml LH, Inhalt: Calcium-balanciertes Heparin 50 IU Heparin/ml Blut, SARSTEDT AG&Co, Nümbrecht, Deutschland) entnommen. Das Blut diente zur Analyse von pH-Wert, Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂), Sauerstoffpartialdruck (pO₂), Hydrogencarbonat (HCO₃⁻) sowie Glucose und Lactat-Konzentration. Sie wurde mithilfe eines automatischen Blutgasanalysators (ABL90Flex, Radiometer, Brønshøj, Dänemark) durchgeführt. Aus dem verbliebenen Blut in der Monovette® wurden 0,80 ml Blut in ein EDTA-Röhrchen

(Microvette® 500 K3E, Inhalt: Tri-Kalium-EDTA, SARSTEDT AG&Co, Nümbrecht, Deutschland) gefüllt und für 15 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert (Desaga, DESASPEED LC-1, Sarstedt-Gruppe, Deutschland). Die gewonnenen Serumproben wurden in Eppendorfgläsern (Reagiergefäße 0,5 ml, SARSTEDT AG&Co, Nümbrecht, Deutschland) bei -80 °C konserviert. Zu einem späteren Zeitpunkt erfolgte hieraus die Bestimmung der Zytokine TNF- α , IL-1 α , IFN- γ und IL-4 und MCP-1 mit einem Zytokin-Kit-System (Rat Cytokines 5plex FlowCytomix Multiplex, BMS826FF von eBioscience, Wien, Österreich). Die Auswertung erfolgte über die Software FlowCytomix Pro 3.0 (Fraunhofer FIT und eBioscience).

4.6 Auswertung des Bildmaterials

Die Auswertung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen und der Kapillardichten erfolgte am Computer mit der Videoanalyse-Software CapImage® (Dr. H. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland). CapImage® hat sich als computergestütztes multifunktionales Bildanalyzesystem bei der Auswertung dynamischer gefäßmikroskopischer Befunde in der Mikrozirkulationsforschung bewährt [116-118].

Die technische Ausrüstung bestand aus

- IBM-kompatiblem PC mit einer Ip-8/AT Bildverarbeitungskarte (Matrox Electronics Systems GmbH, Unterhaching, Deutschland)
- Monitor (PM9-5B, Ikegami Electronics GmbH, Deutschland)
- Videorekorder (JVC CTL Time Code Video Cassette Recorder)

Die Videoaufnahme erfolgte in Echtzeit mit 25 Bildern pro Sekunde, welche aufgenommen und digital wiedergegeben werden konnten. Im Programm CapImage® wurde vor Nutzung der Bildanalysefunktion zunächst der Vergrößerungsmaßstab definiert, dies erfolgte durch ein Objektmikrometer. Die Standbilder lieferten, unter Beachtung der zusätzlichen Manipulation, die genauen Maße durch die Videobild-Datenverarbeitung, mit denen das Programm die Vergrößerung, der zur Auswertung genutzten Videobilder, vornehmen konnte.

4.7 Statistik

Die Analyse und Darstellung der Ergebnisse erfolgt über das Statistikprogramm GraphPad-Prism 5.1 (GraphPad Software, San Diego, USA). Zunächst wurde eine deskriptive Statistik erstellt (Mittelwert, Varianz, Standardabweichung, Standardfehler). Im Anschluss erfolgte die Testung auf eine Normalverteilung mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests.

Beim Vorliegen einer Normalverteilung wurde im Anschluss der einfaktorielle Mittelwertvergleich mittels „Ein-Weg-Varianzanalyse“ (Analysis of variance, ANOVA) vorgenommen. Beim Auftreten einer Signifikanz schloss sich eine post-hoc-Testung mit dem Newman-Keuls Multiple Comparison Test an. Zeigte sich keine Normalverteilung, folgte nach dem Kolmogorov-Smirnov-Test eine nichtparametrische Varianzanalyse mittels Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn´s Multiple Comparison Test.

Bei mehrfaktoriellem Design, wie bei der Analyse mehrerer Gruppen, wurde eine Zwei-Weg-Varianzanalyse mit Messwertwiederholungen (two-way repeated measures-ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-post-Test durchgeführt. Der einfaktorielle Mittelwertvergleich der Messwerte innerhalb der einzelnen Gruppen zu den verschiedenen Messzeitpunkten wurde mittels one-way-ANOVA mit anschließendem Newman-Keuls Multiple Comparison Test durchgeführt.

Für alle Untersuchungen wurden die Signifikanzniveaus von $p < 0.05$, $p < 0.01$ bzw. $p < 0.001$ festgesetzt. Alle hier aufgeführten Diagramme zeigen in der Darstellung Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) an.

5 Ergebnisse

5.1 Intravitalmikroskopie

5.1.1 Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel

5.1.1.1 Permanente Leukozytenadhäsion

Unter der Endotoxinämie lässt sich eine signifikante Steigerung der permanenten Leukozytenadhäsion, sowohl in den Venolen 1. als auch 3. Ordnung erkennen. Diese permanente Adhäsion ist unabhängig von der Applikation von PP2 bzw. DMSO. Zwischen Gruppe I (V1 $7,27 \pm 5,59$; V3 $9,89 \pm 5,40$) und Gruppe II (V1 $43,83 \pm 13,96$; V3 $122,20 \pm 61,87$) zeigt sich je eine Signifikanz von $p < 0.01$. Zwischen Gruppe II und Gruppe III (V1 $9,80 \pm 10,61$; V3 $9,62 \pm 5,09$) besteht eine Signifikanz von ebenfalls $p < 0.01$. Zwischen Gruppe III und Gruppe IV (V1 $51,38 \pm 16,25$; V3 $118,40 \pm 62,85$) ergibt sich eine Signifikanz von $p < 0.001$. Und auch zwischen Gruppe I und IV lässt sich eine Signifikanz von $p < 0.001$ erkennen. Zwischen den beiden Endotoxinämiegruppen und den Kontrollgruppen findet sich kein signifikanter Unterschied.

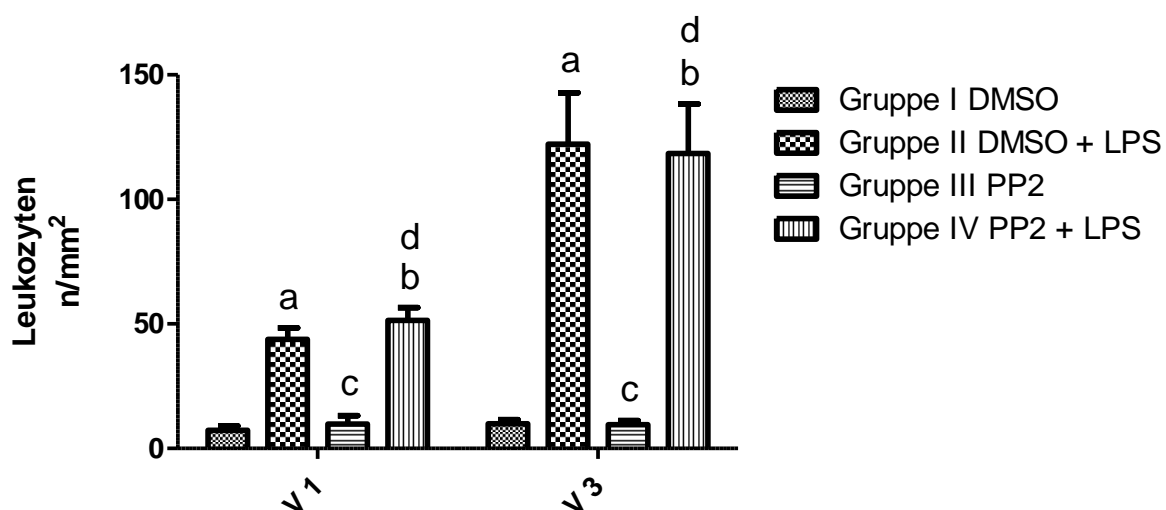


Abb. 21 Ergebnisse permanente Leukozytenadhäsion in den Venolen 1. und 3. Ordnung
Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0.01$ vs. DMSO;

b = $p < 0.001$ vs. DMSO;

c = $p < 0.01$ vs. DMSO LPS;

d = $p < 0.001$ vs. PP2

5.1.1.2 Temporäre Leukozytenadhäsion

In diesem Teilversuch zeigt sich, dass unter dem Einfluss von PP2 und LPS in der Gruppe IV (V1 $5,63 \pm 3,22$; V3 $3,03 \pm 0,46$) eine signifikante Steigerung von $p < 0,01$ der temporären Leukozytenadhäsion im Vergleich zur Gruppe III (V1 $1,93 \pm 2,07$; V3 $1,13 \pm 1,39$) erfolgt, welche nur mit PP2 behandelt wurde. Dies trifft sowohl in den Venolen 1. als auch 3. Ordnung zu. Hingegen konnte kein Unterschied zwischen der DMSO- Kontrollgruppe und der DMSO-LPS- Gruppe nachgewiesen werden. Weiterhin zeigt sich kein Unterschied zwischen den Nicht-Endotoxinämiegruppen. Es ist jedoch eine Erhöhung zwischen der Gruppe IV und der Gruppe II (V1 $2,63 \pm 1,09$; V3 $1,56 \pm 1,08$) mit einer Signifikanz von $p < 0,01$ zu erkennen. (Gruppe I V1 $1,33 \pm 1,75$; V3 $0,47 \pm 0,526$).

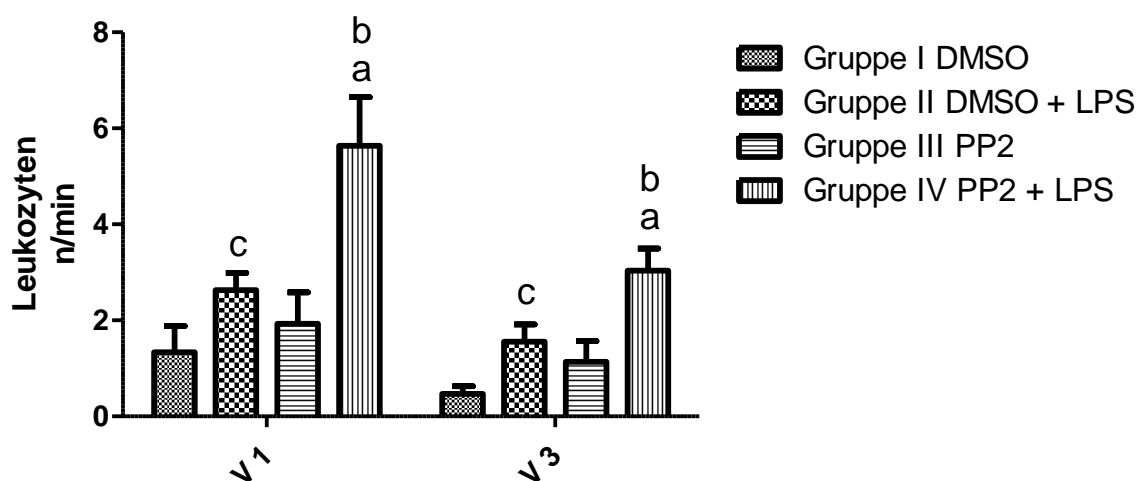


Abb. 22 Ergebnisse temporäre Leukozytenadhäsion in den Venolen 1. und 3. Ordnung

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0,001$ vs. DMSO;

b = $p < 0,01$ vs. PP2;

c = $p < 0,01$ vs. PP2 + LPS;

5.1.2 Kapillardichten

5.1.2.1 Funktionelle Kapillardichte

Hierbei zeigt sich, dass LPS und PP2 eine negative Auswirkung auf die funktionelle Kapillardichte (FCD) haben, sowohl in der Lamina longitudinalis als auch in der Lamina circularis. Gruppe I (Longitudinalis $87,20 \pm 15,75$; Circularis $77,48 \pm 8,14$) weist eine, im Vergleich zu Gruppe II (Longitudinalis $58,53 \pm 11,32$; Circularis $46,32 \pm 9,45$), für beide Kapillardichten signifikante Änderung von $p < 0.001$ auf. Zwischen Gruppe II und Gruppe III (Longitudinalis $82,41 \pm 14,49$; Circularis $65,69 \pm 6,49$) ergibt sich ebenfalls eine Signifikanz von $p < 0.001$. Die Gruppe IV (Longitudinalis $30,50 \pm 13,60$; Circularis $34,50 \pm 9,65$) zeigt in der longitudinalen Kapillardichte zu allen anderen Gruppen einen signifikanten Unterschied von $p < 0.001$. Für die circulaire Kapillardichte lässt sich im Vergleich zur Gruppe I und III ebenfalls eine Signifikanz von $p < 0.001$ erkennen. Zudem stellt sich im Vergleich zur Gruppe II eine Signifikanz von $p < 0.01$ heraus.

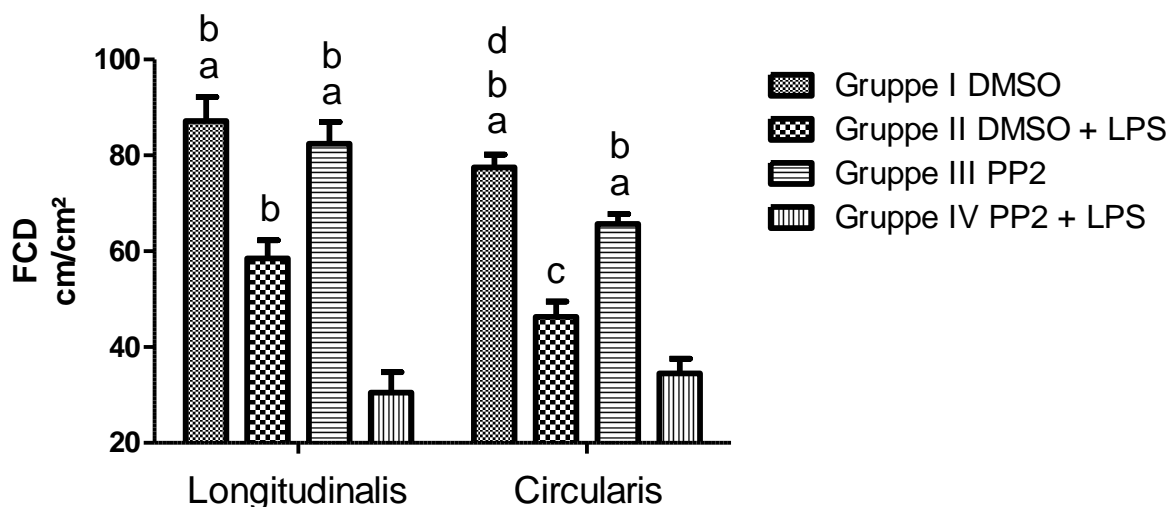


Abb. 23 Ergebnisse funktionelle Kapillardichte in cm/cm^2

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0.001$ vs. DMSO + LPS;

b = $p < 0.001$ vs. PP2 + LPS;

c = $p < 0.01$ vs. PP2 + LPS;

d = $p < 0.01$ vs. PP2

5.1.2.2 Dysfunktionelle Kapillardichte

In den Ergebnissen der dysfunktionellen Kapillardichte (DFCD) zeigt sich, dass der Einsatz von LPS, unabhängig von der Verwendung von PP2, eine signifikante Veränderung hervorruft. Gruppe III (Longitudinalis $3,10 \pm 2,81$; Circularis $8,01 \pm 8,88$) weist im Vergleich zu Gruppe II (Longitudinalis $35,00 \pm 8,77$; Circularis $33,04 \pm 14,58$) und Gruppe IV (Longitudinalis $45,63 \pm 11,72$; Circularis $42,36 \pm 6,99$) für beide Kapillardichten eine signifikante Veränderung von $p < 0.001$ auf. Weiterhin besteht im Vergleich von Gruppe I (Longitudinalis $6,417 \pm 6,03$; Circularis $3,915 \pm 4,52$) zu Gruppe II und IV eine signifikante Veränderung von $p < 0.001$. Darüber hinaus lässt sich zwischen Gruppe III und Gruppe II eine Signifikanz von $p < 0.001$ der longitudinalen Kapillardichte und $p < 0.05$ der circularären Kapillardichte erkennen.

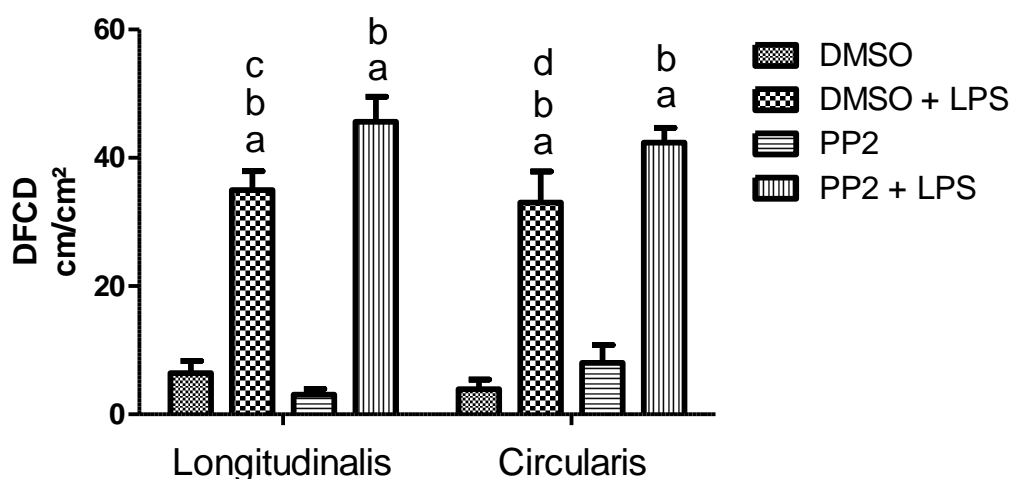


Abb. 24 Ergebnisse dysfunktionelle Kapillardichte in cm/cm^2

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe $n = 10$ Tiere;

a = $p < 0.001$ vs. PP2;

b = $p < 0.001$ vs. DMSO;

c = $p < 0.001$ vs. PP2 + LPS;

d = $p < 0.05$ vs. PP2 + LPS;

5.1.2.3 Nonfunktionelle Kapillardichte

Im Gegensatz zu DFCD, zeigt sich bei der nonfunktionellen Kapillardichte (NFCD) nur ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit und ohne LPS, welcher unabhängig von der Verwendung von PP2 ist. Aus den Ergebnissen von Gruppe IV (Longitudinalis $28,79 \pm 19,95$; Circularis $26,88 \pm 11,46$) resultiert im Vergleich zur Gruppe I (Longitudinalis $1,07 \pm 1,65$; Circularis $2,31 \pm 1,99$) und Gruppe III (Longitudinalis $2,17 \pm 2,46$; Circularis $2,61 \pm 3,28$) für beide Kapillarnetze in einer Signifikanz von $p < 0.001$. Gruppe II (Longitudinalis $16,70 \pm 17,58$; Circularis $25,03 \pm 16,14$) weist im Vergleich zur Gruppe I und III in der longitudinalen Kapillardichte eine Veränderung von $p < 0.05$ und in der Lamina circularis eine signifikante Veränderung von $p < 0.001$ auf.

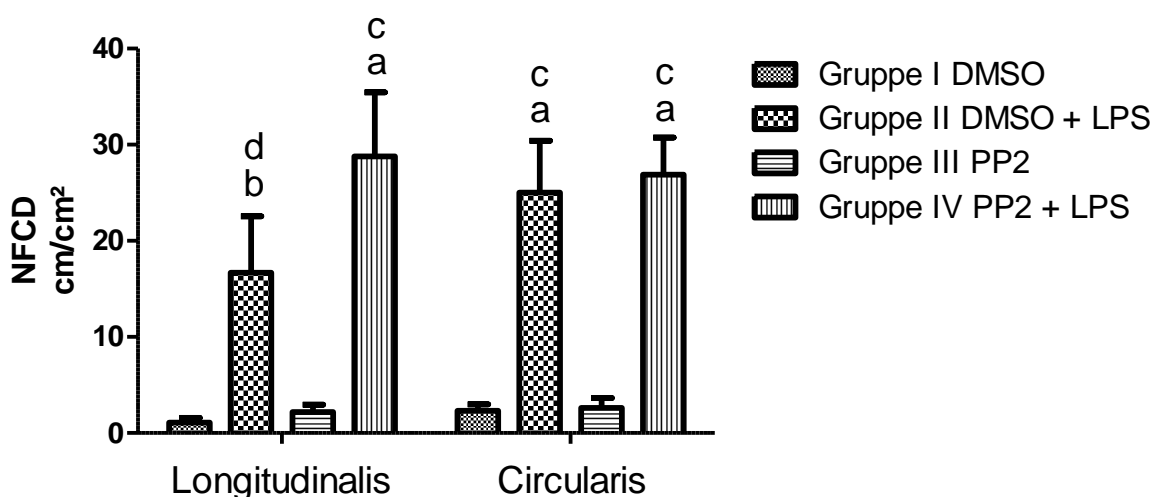


Abb. 25 Ergebnisse nonfunktionelle Kapillardichte in cm/cm^2

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0.001$ vs. DMSO;

b = $p < 0.05$ vs. DMSO;

c = $p < 0.001$ vs. PP2;

d = $p < 0.05$ vs. PP2

5.1.2.4 Funktionelle Kapillardichte der Mucosa

Bei einer Dosierung von 0,2mg PP2/kg KG kann nach 120min Endotoxinämie mit 5mg LPS/kg KG keine Änderung der funktionellen Kapillardichte in den Villi intestinales der Mucosa verzeichnet werden (Gruppe I $252,60 \pm 34,16$; Gruppe II $240,60 \pm 31,77$; Gruppe III $252,10 \pm 37,99$; Gruppe IV $251,90 \pm 46,77$).

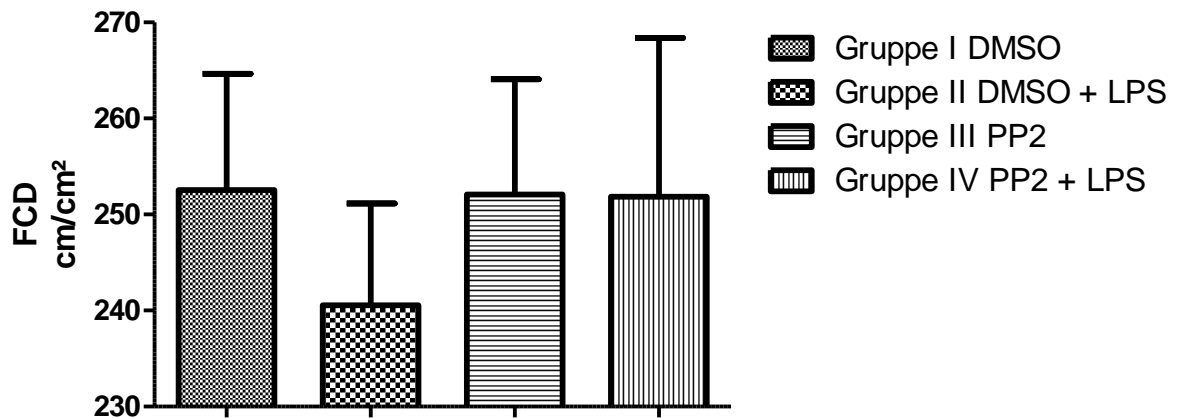


Abb. 26 Ergebnisse funktionelle Kapillardichte Mucosa in cm/cm^2
Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

5.2 Blutgasanalyse

5.2.1 Lactat

In der ersten Probe (BE 1) können keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden, was auch zur eigenen Qualitätskontrolle dient. Hingegen können in der zweiten Blutentnahme (BE 2) signifikante Unterschiede festgestellt werden. Dabei zeigt sich, dass unter PP2 und LPS die Lactatwerte am höchsten (Gruppe IV $1,98 \pm 0,29$) und unter DMSO und LPS die zweithöchsten Werte gemessen werden (Gruppe II $1,70 \pm 0,33$). Zudem ist die Höhe des Lactates der Gruppe PP2 und LPS signifikant höher ($p < 0,05$) als die Gruppe DMSO + LPS. Die Lactatwerte der Gruppe ohne LPS sind hingegen gesunken (Gruppe I $0,72 \pm 0,21$; Gruppe III $0,78 \pm 0,30$). Im Vergleich der beiden Blutentnahmen zeigt sich ein signifikanter Abfall des Lactats in den Gruppen I ($p < 0,001$) und III ($p < 0,01$). Ein Anstieg des Lactats kann in der mit LPS behandelten Gruppe II ($p < 0,01$) und Gruppe IV ($p < 0,001$) nachgewiesen werden.

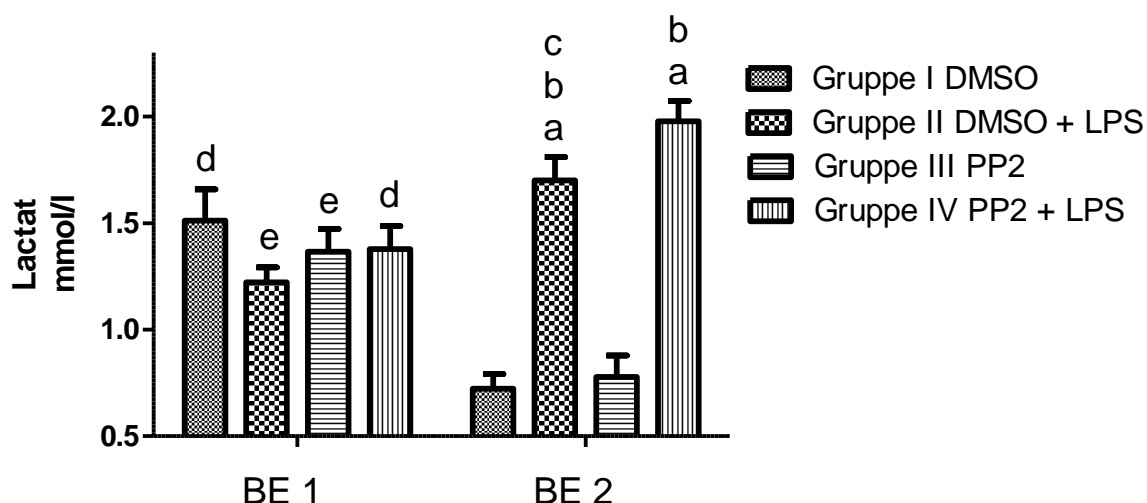


Abb. 27 Ergebnisse Lactat in mmol/l

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0,001$ vs. DMSO;

b = $p < 0,001$ vs. PP2;

c = $p < 0,05$ vs. PP2 + LPS;

d = $p < 0,01$ zur BE2;

e = $p < 0,001$ zur BE2

5.2.2 Glucose

Bei der Auswertung der Glucosewerte in der BE 1 und BE 2 zeigt sich, dass es zum gleichen Abnahmezeitpunkt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben gibt (Gruppe I $7,33 \pm 1,49$) (Gruppe III $7,50 \pm 1,36$). Nur zwischen den mit LPS behandelten Gruppen stellt sich ein Unterschied zwischen der ersten und zweiten Probe (jeweils $p < 0,05$) (Gruppe II $6,04 \pm 1,64$; Gruppe IV $5,97 \pm 1,48$).

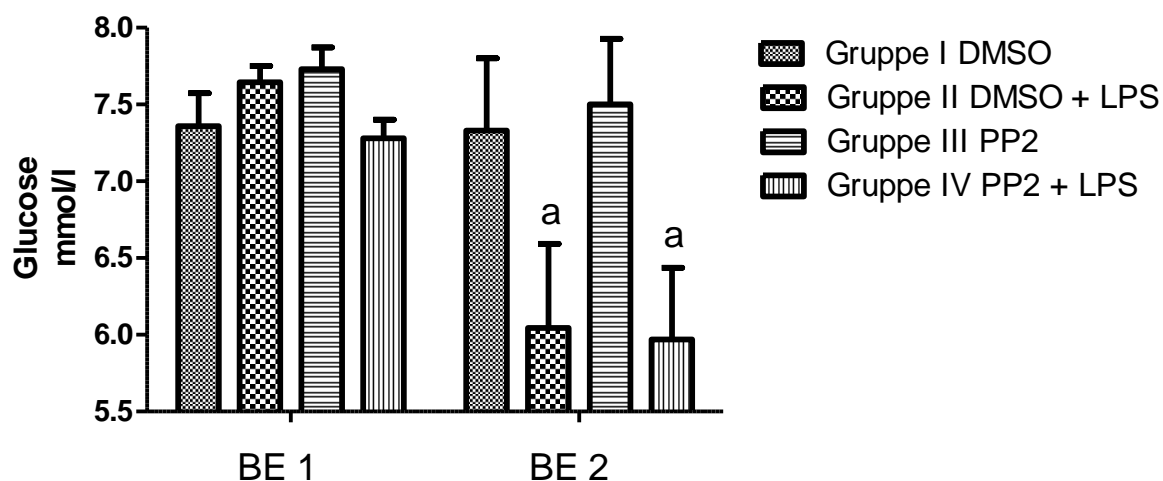


Abb. 28 Ergebnisse Glucose in mmol/l

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0,05$ zur BE 1

5.2.3 Sauerstoffpartialdruck (pO₂)

Hierbei kann eine interessante Konstellation erkannt werden. Bei beiden Gruppen mit DMSO zeigt sich, gegenüber den mit PP2 behandelten Gruppen, eine Steigerung des arteriellen pO₂. Jedoch ist diese Steigerung nicht signifikant (Gruppe I 72,33±8,33; Gruppe II 71,82±6,82). Der Vergleich der beiden Blutentnahmen einer Gruppe erbringt ebenfalls keine signifikanten Änderungen nach dem hier verwendeten Versuchsablauf (Gruppe III 65,53±6,13; Gruppe IV 64,21±7,75).

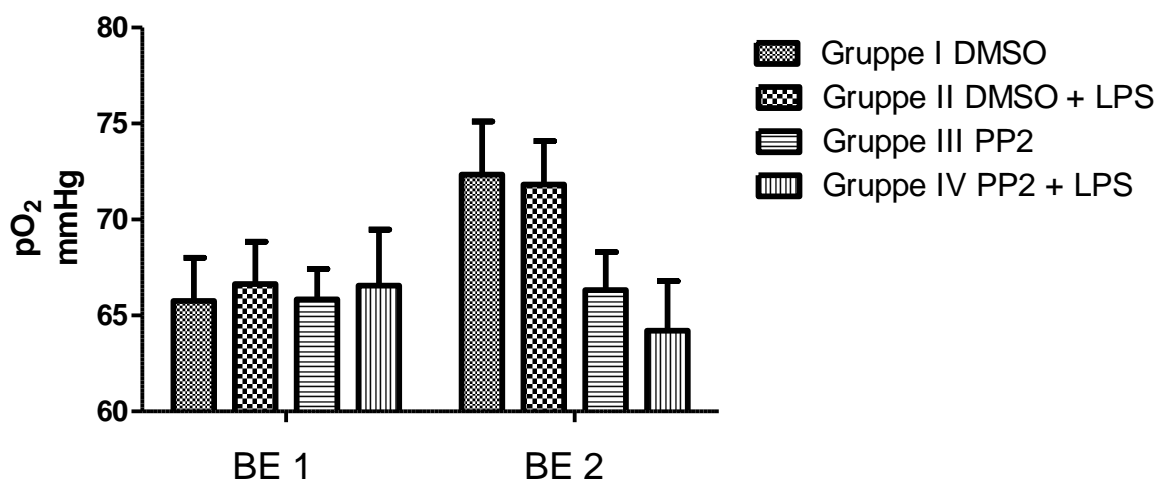


Abb. 29 Ergebnisse pO₂ in mmHg

Angaben in Mittelwert ± SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

5.2.4 Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO₂)

In Gegensatz zum pO₂ hat sich der pCO₂ entgegengesetzt zu der zweiten Blutentnahme (BE 2) verändert. Hierbei sind die Werte aller Gruppen signifikant in einen hypokapnischen Bereich abgesunken. Die mit LPS behandelten Gruppen zeigen, jeweils im Vergleich zur ersten Blutentnahme (BE 1), ein Absinken mit $p < 0.001$, (Gruppe II $24,70 \pm 6,90$; Gruppe IV $25,32 \pm 4,81$) ebenso die Gruppen ohne LPS mit $p < 0.05$ (Gruppe I $35,22 \pm 6,04$; Gruppe III $34,31 \pm 6,05$). Die Werte der zweiten Blutentnahme weisen untereinander eine Signifikanz mit $p < 0.01$ auf. Die Applikation von LPS spielt dabei keine Rolle.

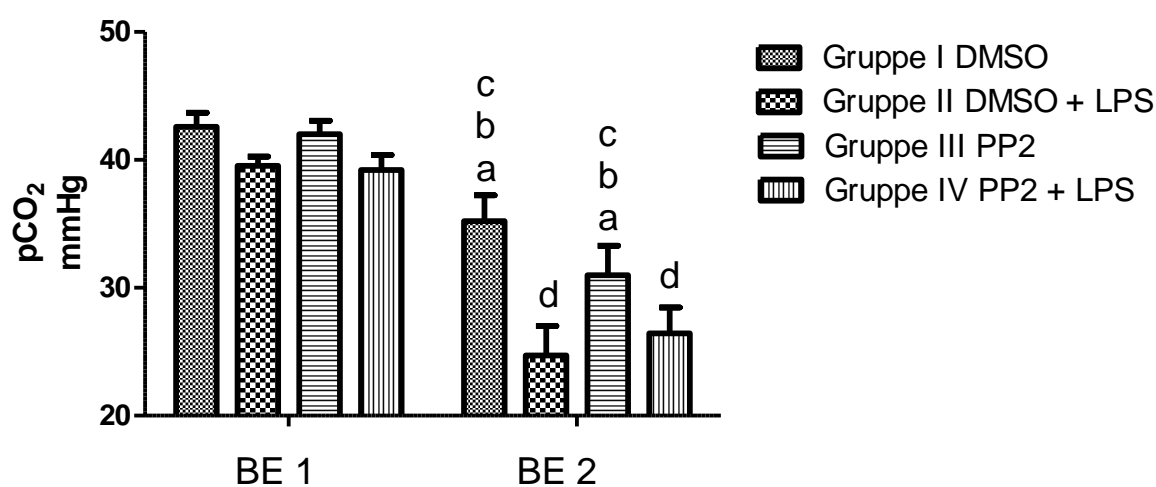


Abb. 30 Ergebnisse pCO₂ in mmHg

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0.01$ vs. DMSO + LPS;

b = $p < 0.01$ vs. PP2 + LPS;

c = $p < 0.05$ vs. BE1;

d = $p < 0.001$ vs. BE1

5.2.5 pH-Wert

Bei der Betrachtung der pH-Werte lassen sich keine signifikanten Veränderungen erkennen. Das betrifft sowohl die Werte zwischen den Gruppen, als auch die Werte innerhalb einer Gruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Lediglich in der zweiten Blutabnahme, in den mit LPS behandelten Gruppen, lässt sich ein basischer Trend, jedoch ohne Signifikanz, erkennen. (Gruppe I $7,429 \pm 0,031$; Gruppe II $7,373 \pm 0,0714$; Gruppe III $7,448 \pm 0,635$; Gruppe IV $7,484 \pm 0,106$).

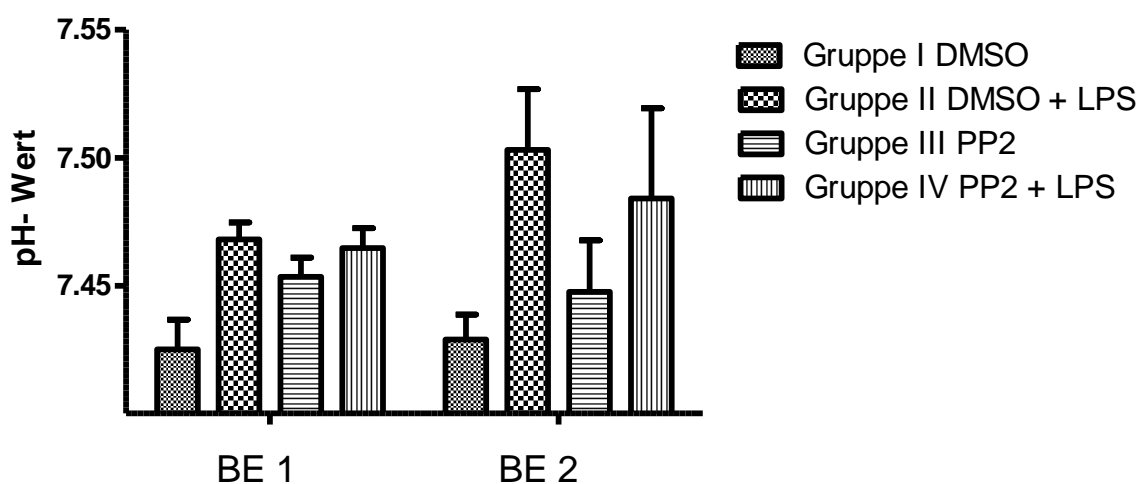


Abb. 31 Ergebnisse pH-Wert

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

5.2.6 Hydrogencarbonat (HCO_3^-)

Das Hydrogencarbonat (HCO_3^-) verhält sich, in der vorliegenden Versuchsreihe, wie ein Äquivalent zum pCO_2 . Dieses äußert darin, dass die mit LPS behandelten Gruppen in der zweiten Blutentnahme (BE 2) einen signifikant geringeren HCO_3^- Wert, im Vergleich zur DMSO-Kontrollgruppe haben (Gruppe I $23,46 \pm 4,01$; Gruppe II $18,86 \pm 2,31$; Gruppe IV $19,33 \pm 1,43$). Die Signifikanz beträgt dabei $p < 0,05$. Die Differenz zwischen den Gruppen III und IV ist nicht signifikant (Gruppe III $22,22 \pm 4,73$). Weiterhin sind auch hier die Werte in der BE 2 aller Gruppen geringer als die jeweiligen Werte der BE 1. Dabei zeigen die Gruppen I und III einen Unterschied mit $p < 0,01$ und die Gruppen II und IV mit $p < 0,001$.

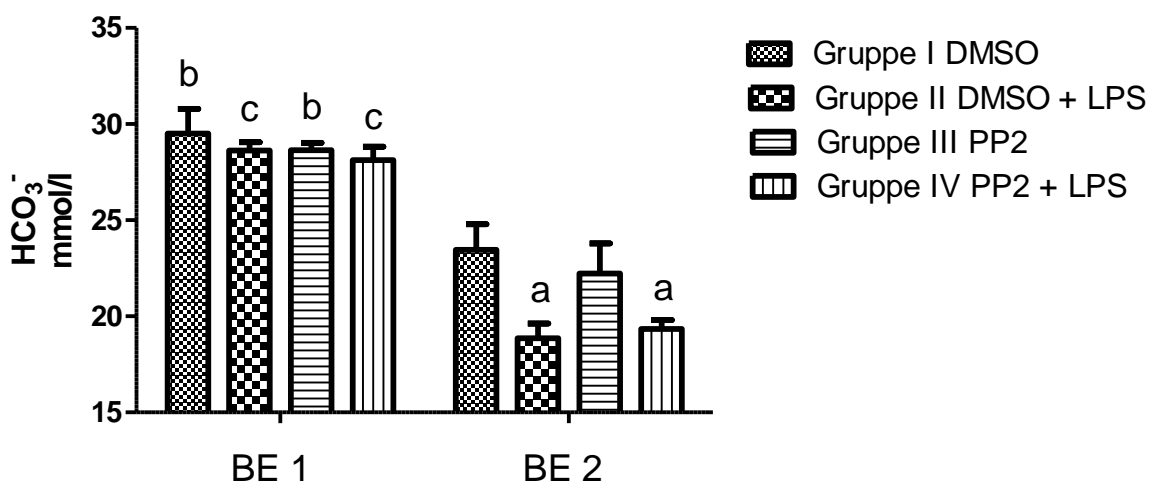


Abb. 32 Ergebnisse HCO_3^- in mmol/l

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0,05$ vs. DMSO;

b = $p < 0,01$ vs. BE2;

c = $p < 0,001$ vs. BE2

5.3 Zytokine

5.3.1 Interleukin 1 alpha (IL-1 α)

Alle Gruppen zeigen untereinander keinen Unterschied hinsichtlich der ersten Blutentnahme (BE 1). In der zweiten Blutentnahme (BE 2) besteht hingegen ein signifikanter IL-1 α -Anstieg ($p < 0.001$) in den beiden Gruppen bei denen LPS appliziert worden ist (Gruppe I und III), im Gegensatz zu den beiden Gruppen, die kein LPS erhalten haben (Gruppe II und IV). Allerdings gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen der BE 2 der Gruppen IV (4739 ± 2108) und II (4777 ± 2410). In den nicht mit LPS behandelten Gruppen ergibt sich kein signifikanter Unterschied, weder bei der ersten noch bei der zweiten Blutentnahme (Gruppe I $1,944 \pm 4,89$). Auch die Zugabe von PP2 spielt dabei keine signifikante Rolle (Gruppe III $12,03 \pm 33,88$).

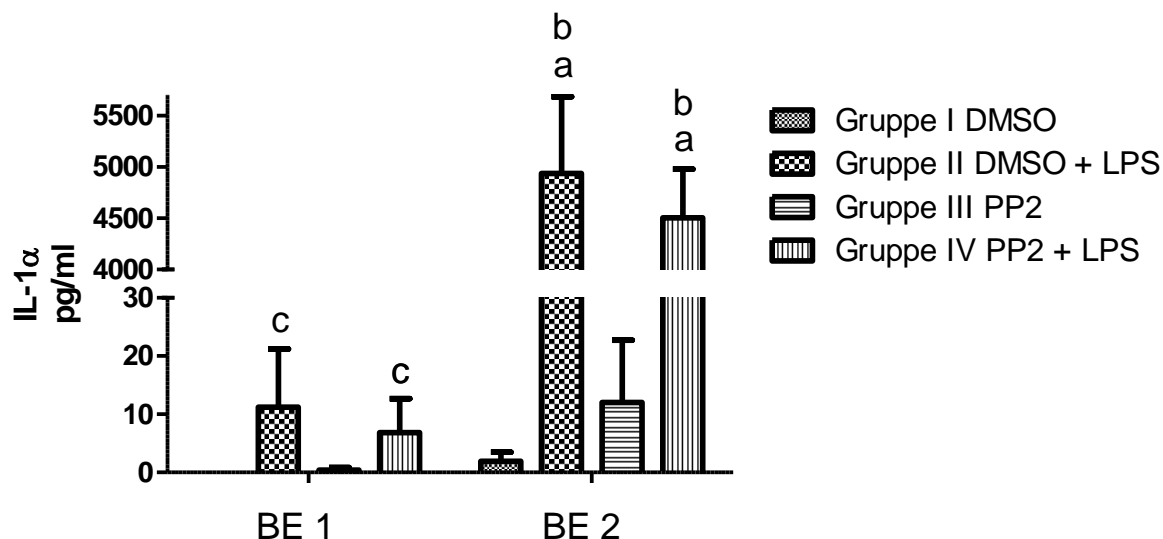


Abb. 33 Ergebnisse IL-1 α in pg/ml

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0.001$ vs. DMSO;

b = $p < 0.001$ vs. PP2;

c = $p < 0.001$ vs. BE 2

5.3.2 Interleukin 4 (IL-4)

In den Ergebnissen der IL-4-Analyse zeigt sich nur eine Signifikanz zwischen der Gruppe mit DMSO und LPS (Gruppe II $5,99 \pm 10,55$) gegenüber der Gruppe mit PP2 und LPS (Gruppe III 0 ± 0). Jedoch sollte hierbei angemerkt werden, dass weder in der ersten noch in der zweiten Probe der Gruppe III IL-4 nachgewiesen werden konnte. Eine signifikante Differenz zwischen der ersten und zweiten Blutentnahme, kann in keiner Gruppe aufgezeigt werden (Gruppe I $0,10 \pm 0,30$) (Gruppe IV $2,80 \pm 5,65$).

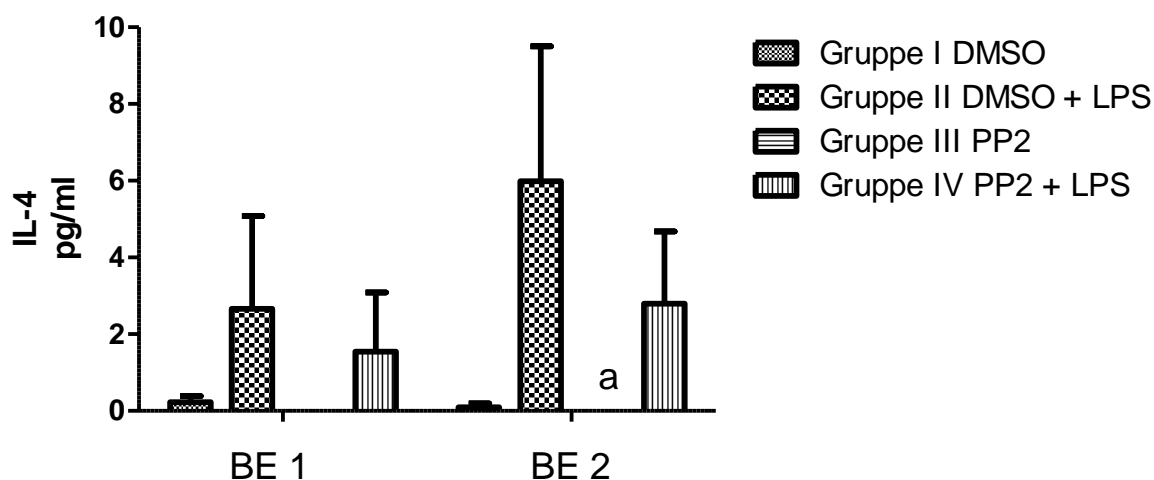


Abb. 34 Ergebnisse IL-4 in pg/ml

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0.05$ vs. DMSO + LPS

5.3.3 Interferon gamma (IFN- γ)

In Hinblick auf das Zytokin Interferon Gamma konnte ein signifikanter Anstieg des IFN- γ jeweils in der zweiten Blutentnahme (BE 2), in denen mit LPS behandelten Gruppen festgestellt werden. Gruppe II ($550,0 \pm 229,30$) hat im Vergleich zur Gruppe I ($1,29 \pm 3,54$) und Gruppe III ($0,65 \pm 1,46$) einen Unterschied von $p < 0.01$. Zwischen Gruppe I und IV ($591,60 \pm 171,40$) zeigt sich ein Unterschied von $p < 0.001$. PP2 hat hierbei keinen direkten Einfluss auf die Höhe des IFN- γ . Auch die alleinige Verwendung von DMSO hat keinen Anstieg zur Folge.

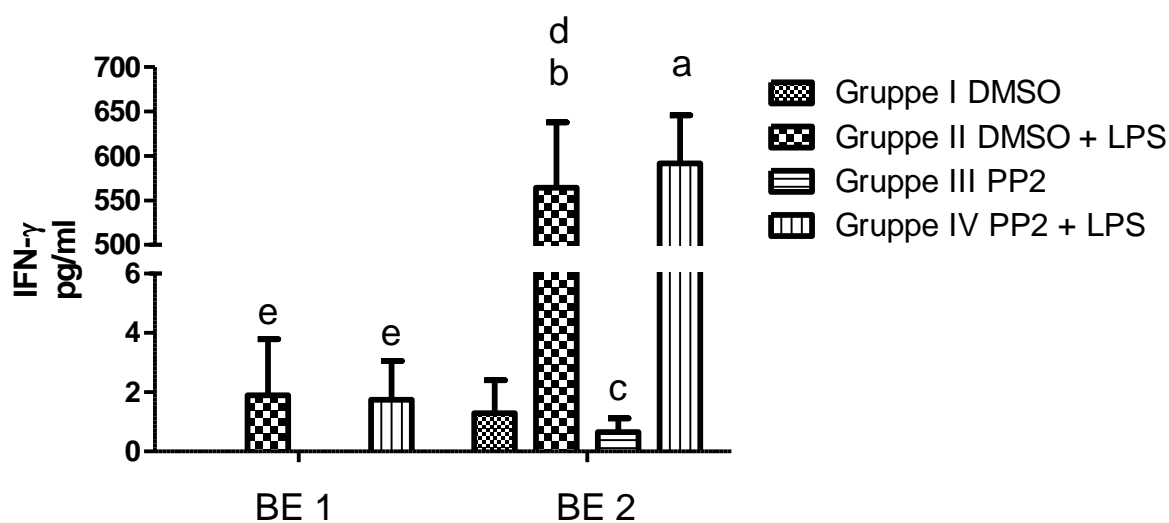


Abb. 35 Ergebnisse IFN- γ in pg/ml

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0.001$ vs. DMSO;

b = $p < 0.01$ vs. DMSO;

c = $p < 0.001$ vs. PP2 + LPS;

d = $p < 0.01$ vs. PP2;

e = $p < 0.001$ vs. BE 2

5.3.4 Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α)

Wie erwartet ist in der zweiten Blutentnahme (BE 2) jeweils ein Anstieg der TNF- α -Konzentration zu verzeichnen. In den Gruppen I (85,30 \pm 90,50) und III (58,26 \pm 89,43) zeigt sich eine Differenz mit $p < 0.05$. In den Gruppen II (442,40 \pm 261,80) und IV (406,90 \pm 222,70) kann ein signifikanter Anstieg von $p < 0.001$ beobachtet werden. Außerdem lässt sich erkennen, dass die mit LPS behandelten Gruppen II und IV einen signifikanten Unterschied ($p < 0.001$) jeweils zu den Gruppen I und III aufweisen. Eine signifikante Differenz zwischen Gruppe I und III oder zwischen II und IV besteht nicht.

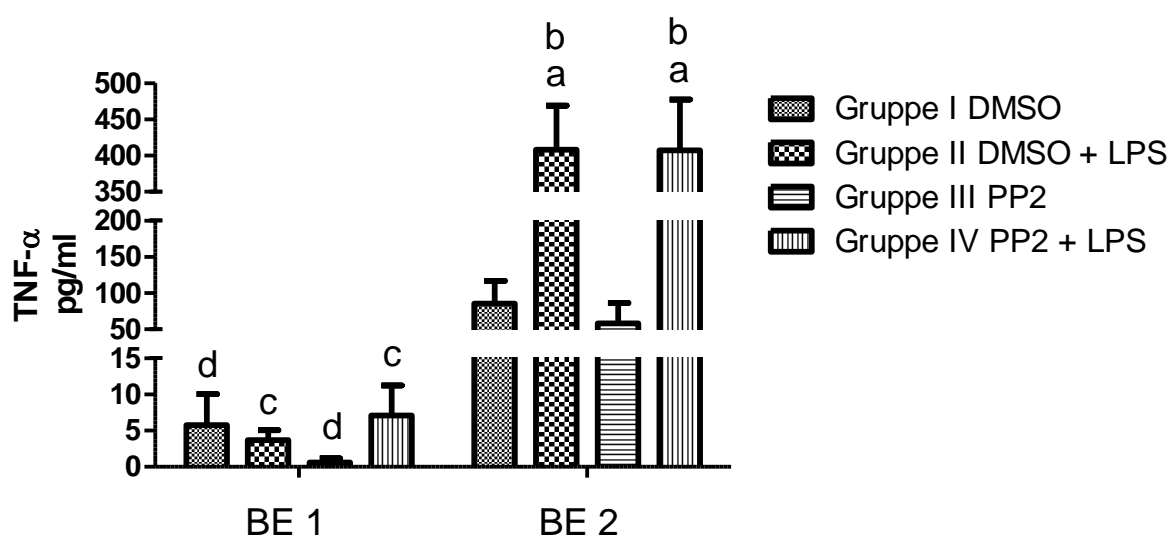


Abb. 36 Ergebnisse TNF- α in pg/ml

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0.001$ vs. DMSO;

b = $p < 0.001$ vs. PP2;

c = $p < 0.001$ vs. BE 2;

d = $p < 0.05$ vs. BE 2

5.3.5 Monozyten Chemotaktisches Protein-1 (MCP-1)

Im Gegensatz zu den Konzentrationen von TNF- α zeigt sich eine Senkung des MCP-1-Spiegels unter Verwendung von LPS. Jedoch sind diese Senkungen nicht signifikanter Natur (Gruppe II $130,60 \pm 171,0$; Gruppe IV $153,60 \pm 150,90$). Die nicht mit LPS behandelten Gruppen zeigen hingegen einen Anstieg der MCP-1-Konzentration. Allerdings sind auch diese nicht signifikanten Ausmaßes (Gruppe I $187,40 \pm 241,70$; Gruppe III $184,90 \pm 242,70$). Die einzigen signifikanten Ergebnisse ergeben sich unter LPS-Nutzung im Vergleich zum Ausgangswert. Dabei hat die Gruppe II einen Abfall der Konzentration mit $p < 0.05$ und die Gruppe IV mit $p < 0.01$ zu verzeichnen.

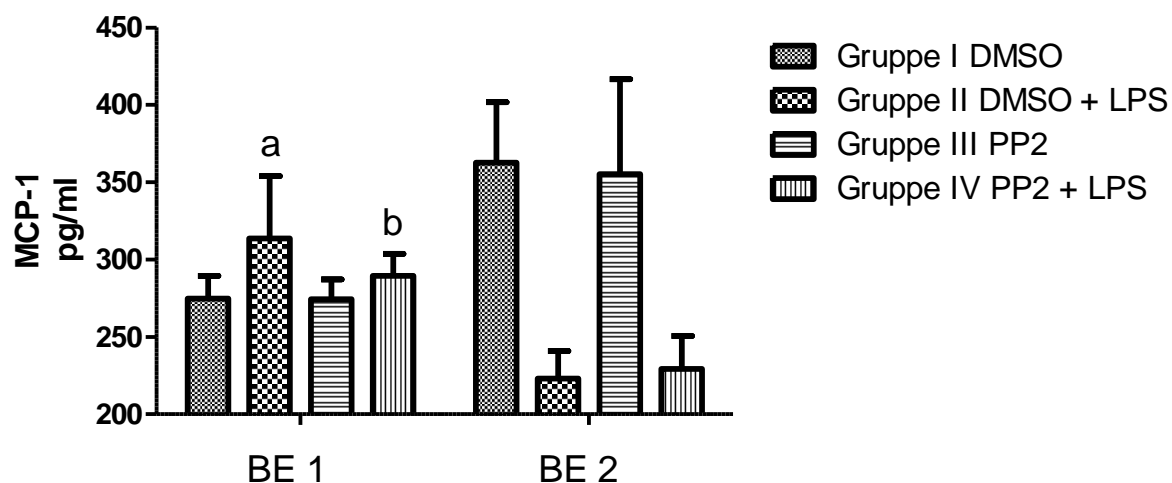


Abb. 37 Ergebnisse MCP-1 in pg/ml

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0.05$ vs. BE 2;

b = $p < 0.01$ vs. BE 2

5.4 Klinische Parameter

5.4.1 Verlauf des arteriellen Blutdruckes

Beim arteriellen Blutdruck ist zu beobachten, dass in beiden Gruppen bei denen LPS appliziert wurde, ein signifikanter und zügiger Abfall des arteriellen Blutdruckes innerhalb von 15 Minuten stattfindet. Dabei zeigt sich, dass unter PP2 der Abfall noch rasanter abläuft. Dennoch sind keine signifikanten Unterschiede des arteriellen Blutdrucks zwischen den mit PP2 und ohne PP2 behandelten Gruppen festzustellen. In den beiden nicht mit LPS behandelten Gruppen zeigt sich ein nahezu identischer Blutdruckabfall zwischen Minute 60 und 90. Zwischen Minute 90 und 105 ist in allen vier Gruppen ein Blutdruckanstieg zu verzeichnen. Anschließend sinkt der Blutdruck nicht signifikant unterschiedlich in beiden mit LPS behandelten Gruppen bis zum Ende des Versuches wieder ab. In den beiden LPS unbehandelten Gruppen hingegen fällt der Blutdruck nur minimal ab, wobei sich zwischen ihnen kein signifikanter Unterschied zeigt.

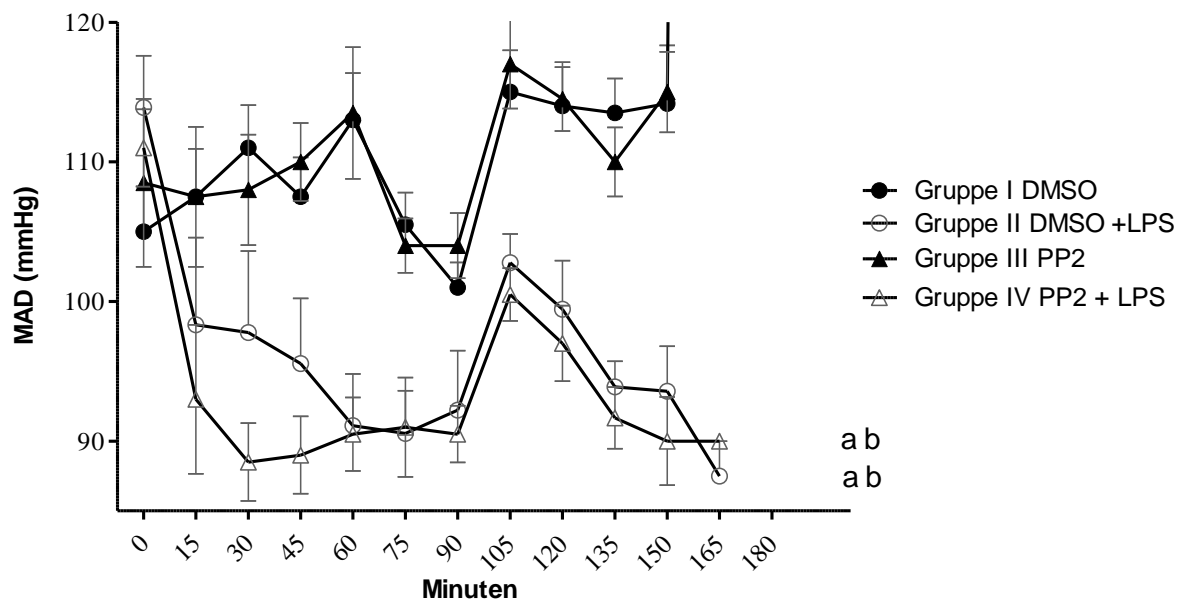


Abb. 38 Verlauf des arteriellen Blutdruckes in mmHg

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0.05$ vs. DMSO;

b = $p < 0.001$ vs. PP2

5.4.2 Mittlerer arterieller Blutdruck

Wird die Summe aller gemessenen arteriellen Blutdrücke betrachtet, so zeigt sich, dass die Nutzung von LPS einen hoch signifikanten ($p < 0.001$) Einfluss auf die Senkung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAD) (Gruppe II $96,73 \pm 12,18$), im Vergleich zu einer nicht mit Endotoxin belasteten Gruppe (Gruppe I $110,0 \pm 9,372$), hat. Der Einfluss von PP2 auf die Veränderung des Blutdrucks ist nicht signifikant (Gruppe III $109,6 \pm 9,911$). Mit einer eher geringen Tendenz senkt die Verwendung von PP2 den MAD unter Endotoxinämie noch weiter (Gruppe IV $93,91 \pm 10,84$).

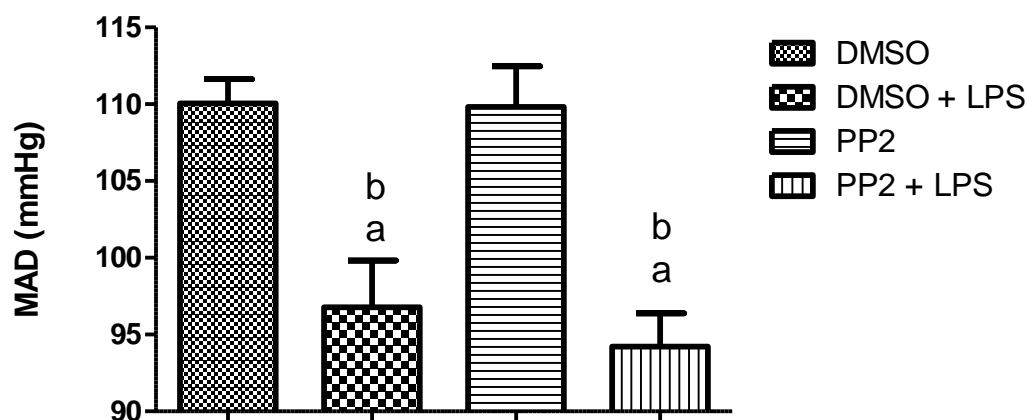


Abb. 39 Ergebnisse des mittleren arteriellen Blutdruckes in mmHg

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0.001$ vs. DMSO;

b = $p < 0.001$ vs. PP2

5.4.3 Verlauf der Herzfrequenz

In den gemessenen Herzfrequenzwerten ist zu erkennen, dass die beiden Gruppen, denen LPS appliziert worden ist, einen nahezu stetigen Anstieg der Herzfrequenz aufweisen. Im Gegensatz dazu haben die anderen beiden Gruppen bis zur Messung bei Minute 90 eine eher gleichbleibende Herzfrequenz, wobei die Gruppe mit PP2-Applikation immer eine geringere Frequenz aufzeigt. Dieser Unterschied ist jedoch nicht von signifikanter Natur. Interessant ist bei den beiden Gruppen ohne LPS, dass diese bei Minute 105 einen steilen Frequenzanstieg erleben, der danach aber wieder zügig abfällt. Dieser Abfall der Frequenz kann bei den Gruppen mit LPS nicht erkannt werden. Gegenteilig steigt die Frequenz bei Diesen noch weiter an.

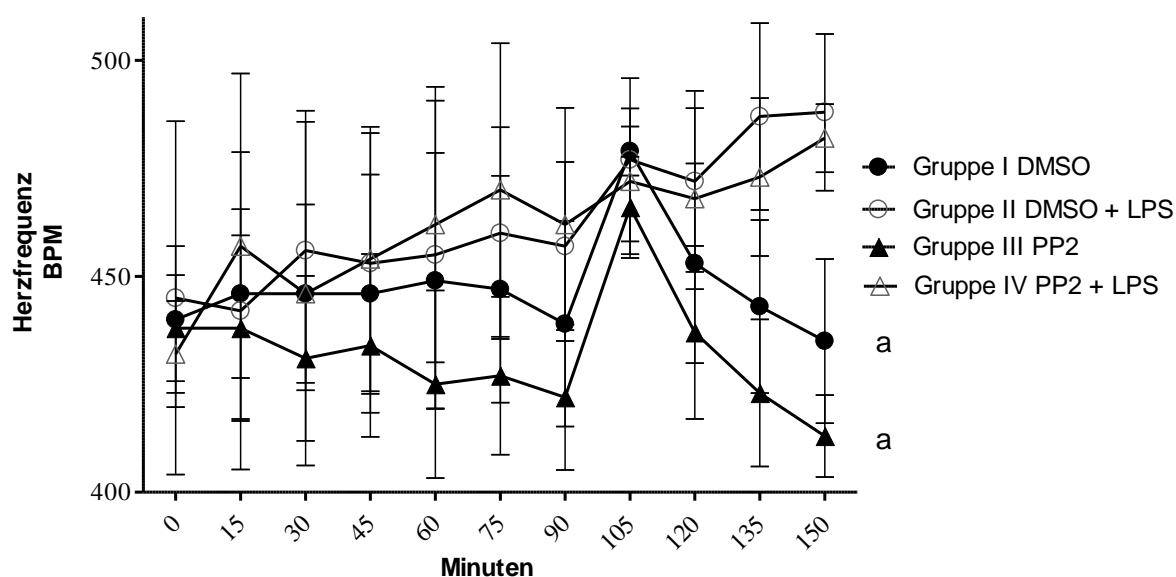


Abb. 40 Verlauf der Herzfrequenz

Angaben in Mittelwert \pm SEM; Gruppe n = 10 Tiere;

a = $p < 0.001$ vs. PP2 + LPS

6 Diskussion

Als Hauptgründe für die Entwicklung einer Sepsis, als Folge der akuten Inflammationsreaktion, werden die Störung der Mikrozirkulation und die Aktivität der Src-Tyrosinkinasefamilie gesehen [88]. Daher ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss des synthetisch hergestellten Src-Tyrosinkinaseinhibitors PP2 auf die intestinale Mikrozirkulation und die Veränderung der Inflammationsparameter am endotoxiämischen Tiermodell zu evaluieren.

In dieser vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von PP2 eine Steigerung der temporären Leukozytenadhäsion unter endotoxiämischen Bedingungen bewirkt. Weiterhin wurde deutlich, dass die Verwendung von PP2, sowohl mit als auch ohne Endotoxinämie, eine Verringerung der funktionellen Kapillardichte zur Folge hat. Dieses Geschehen betrifft sowohl die Lamina longitudinalis als auch die Lamina circularis. Die Kapillardichte der Mucosa ist davon jedoch nicht betroffen. Im Bereich der Blutgasanalyse zeigt sich bei Verwendung von PP2 ein Anstieg der Lactatkonzentration unter Endotoxinämie. Weitere untersuchte Parameter zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Ergebnisse der klinischen Parameter ergeben, dass PP2, unter nicht endotoxiämischen Bedingungen, die durchschnittliche Herzfrequenz senkt.

Im Folgenden werden die einzelnen Ergebnisse dieser Arbeit im Vergleich zur Literatur, soweit entsprechende vorliegt, diskutiert.

Die vorliegende Arbeit ist die erste, die sich explizit mit der Mikrozirkulation des terminalen Ileums der Ratte, unter endotoxiämischen Bedingungen, sowie der Nutzung von PP2 als Src-Tyrosinkinaseinhibitor, befasst. Die hier verwendete Dosierung von PP2 mit 0,2mg/kg KG beruht auf der Publikation von Oyaizu et al. [46]. Dieser konnte unter dieser Dosierung eine deutliche Reduktion des akuten Lungenversagens nach einer pulmonalen ischämischen Reperfusion nachweisen. In dieser Studie wurde ebenfalls das PP2 in 20% DMSO gelöst.

Unter diesem Aspekt ist noch keine endgültige Aussage über das Potenzial von PP2 zu treffen. Zur Stärkung der Effekte ist möglicherweise eine Steigerung oder Senkung der Dosierung von PP2 nötig. Vielleicht ist es auch notwendig erst das PP2 und dann das LPS zu applizieren, um eine Effektsteigerung zu erzielen.

Die vorliegende Dissertation ist eng mit der Dissertation von Daniel André Sprecher [122] verbunden, jedoch besteht keine direkte Verbindung zwischen den Arbeiten von Sprecher und

der hier vorliegenden Arbeit. Sprecher untersuchte den Einfluss des Brain-derived Neurotrophic factors (BDNF) auf die intestinale Mikrozirkulation und die Leukozyten-Endothel-Interaktion während einer Endotoxinämie am in vivo Modell Ratte. Dabei nutzte er den Brain-derived Neurotrophic factor als einen Tyrosinkinase-Agonisten, wohin die vorliegende Arbeit PP2 als einen Tyrosinkinase-Antagonisten nutzt. Ziel beider Arbeiten ist es die Effekte der Tyrosinkinasen auf die intestinale Mikrozirkulation durch agonistische und antagonistische Modulation zu untersuchen.

6.1 Klinische Parameter

Unlängst haben viele Studien [116-118;122-124] gezeigt, dass Endotoxine aus einem *Escherichia coli* Stamm, bereits bei niedriger Dosierung, das Bild eines septischen Geschehens auslösen können. Zu den dabei nachzuweisenden Parametern gehören Tachykardie, Hypotonie und eine erhöhte Körperkerntemperatur. Diese Parameter stehen in Abhängigkeit zur Applikationsart (intravenös, intraarteriell oder intraperitoneal), Applikationsdauer (Bolus oder Dauerinfusion) und Höhe der verabreichten Dosis.

Zur Erzielung des septischen Geschehens wurde, in Bezug auf das Lipopolysaccharid, eine Versuchsanordnung gewählt, die bereits in mehreren Arbeiten (LPS-Bolus von 5mg/kg KG) verwendet und etabliert worden ist [116-118;122-124].

An den Ergebnissen lässt sich bei den mit LPS behandelten Versuchsgruppen, im Gegensatz zu den unbehandelten Gruppen, bereits nach wenigen Minuten eine signifikante Senkung des Blutdrucks erkennen. Diese Hypotonie korreliert mit den Ergebnissen aus der oben genannten Literatur.

In Bezug auf die Herzfrequenz lässt sich bei den LPS-behandelten Gruppen ein im Versuchsverlauf stetiger Anstieg erkennen. Bei den unbehandelten Gruppen bleibt die Herzfrequenz relativ konstant, mit Ausnahme bei der Messungen zum Zeitpunkt T=105 und bei T=120. Diese erhöhten Frequenzen können als vitale Schmerzreaktion auf die Laparotomie und Mobilisation am terminalen Ileum gedeutet werden. Die Verläufe der Herzfrequenzen zeigten hierbei dennoch keine signifikanten Unterschiede. Die steigende Herzfrequenz wurde bereits in anderen Untersuchungen festgestellt [116-118].

Die vorliegende Arbeit bestätigte erneut, dass durch Verwendung von LPS der Schockindex steigt [14]. Die zusätzliche Applikation von PP2 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Senkung des Index.

Die von Leu et al. [104] postulierten Ergebnisse, bei denen durch LPS die Expression von c-SRC und die Produktion von NOS gesteigert wird, was eine Blutdrucksenkung und eine Herzfrequenzsteigerung zur Folge hat, konnte in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesen werden. Das hingegen die Nutzung von PP2 diesen Prozess stark hemmen soll, konnte jedoch nicht signifikant nachgewiesen werden, obwohl im Vergleich zu der Arbeit von Leu et al. eine 25-fach höhere Dosis des PP2 verwendet wurde.

Aus dem mittleren arteriellen Blutdruck, in Kombination mit dem Wissen, dass die Versuchstiere eine ständige Volumenzufuhr erhielten, können Rückschlüsse auf Mikrozirkulation und die Leukozytenadhärenz geschlossen werden. Die Volumenzufuhr

erfolgte zum Ausgleich der pentobarbitalinduzierten Vasodilatation der venösen Kapazitätsgefäße. Es ist beschrieben, dass die Geschwindigkeit des Blutflusses in den postkapillären Venolen und den damit verbundenen Scherkräften, entscheidend für die Adhärenz der Leukozyten verantwortlich ist. Zusammenfassend gilt, dass bei hoher Flussgeschwindigkeit höhere Scherkräfte entstehen, die die Leukozytenadhärenz erschweren [125].

6.2 Leukozytenadhäsion

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der adhärenenten Leukozyten (Roller und Sticker) fällt auf, dass es nur signifikante Unterschiede zwischen den LPS-behandelten und -unbehandelten Gruppen gibt. Einen Unterschied zwischen den PP2-behandelten und -unbehandelten Gruppen konnte hier nicht festgestellt werden. Werden die Höhe der Mittelwerte vorheriger Arbeiten mit demselben Modell verglichen [116-118;122-123] fällt auf, dass die Werte in der vorliegenden Arbeit um den Faktor 3 bis 10 kleiner sind und weniger Leukozyten mit temporärer und permanenter Adhärenz aufweisen. Die vergleichsweise verminderten Werte der Leukozyten betreffen alle Gruppen in der vorliegenden Arbeit. Eine mögliche Erklärung dafür wäre die Verwendung von DMSO, dass alle Versuchstiere erhalten haben.

Die Arbeitsgruppe um Cheow Chang [61] hat nachgewiesen, dass DMSO im endotoxiämischen Modell der Ratten einen positiven Effekt auf die Inhibition der ICAM-1-Expression und die NF κ B-Aktivierung hat. Ein weiterer Punkt, der diese These stützt, ist der, dass Sauerstoffradikale [126] und Stickstoffmonoxid [127,128] einen negativen Einfluss auf die Wirkung von Katecholaminen haben. Diese sorgen in den peripheren Gefäßen für eine Vasokonstriktion, die nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille zu einer erhöhten Flussgeschwindigkeit führt. Durch die erhöhte Flussgeschwindigkeit erhöhen sich die Scherkräfte, was wiederum eine verminderte Leukozytenadhärenz zur Folge hat. Dem spricht entgegen, dass die Menge an DMSO, die für diese Effekte notwendig ist, toxisch wäre [129]. Eine Arbeit, die einen direkten Zusammenhang zwischen DMSO und der Leukozytenadhäsion aufklärt, ist bisher nicht publiziert worden.

Wie im veröffentlichten Review von Okutani et al. [130] soll durch die Hemmung der Src-Kinase-Familie der JAK/STAT-Pathway blockiert werden, sodass weniger Leukozyten an den Endothelwänden adhären und so die Inversion dieser Leukozyten verringert wird. Zudem korrelieren auch die Expression von Lyn und Fgr mit der Leukozytenadhäsion und -Migration. Dieser bereits postulierte Zusammenhang konnte in dieser Arbeit nicht dargestellt werden.

Piccardoni et al. [77] haben nachgewiesen, dass durch Src-Tyrosinkinase die P-Selektine der Leukozyten stimuliert werden. Umgekehrt konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass durch ihre Inhibition die Leukozytenadhäsion gesenkt wird.

Auch zum direkten Einfluss von PP2 auf die Leukozytenadhärenz ist bisher keine Arbeit veröffentlicht worden.

6.3 Kapillardichten

Wie bereits etliche andere Versuchsreihen [116-118;122-124] zeigen konnten, ruft die Applikation von Endotoxinen eine Veränderung der intestinalen Mikrozirkulation hervor. Unter anderem zeigten Wagner und Knöck [118;123], dass es durch die Applikation von LPS zur deutlichen Abnahme der funktionellen Kapillardichte und zu einem Anstieg der dysfunktionellen und nonfunktionellen Kapillardichte kommt. Dieser Zusammenhang konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bestätigt werden. Dies trifft sowohl für die Lamina muscularis, als auch für die Lamina circularis und die Mucosa zu.

Die Gruppe um Brackett [131] hat zwar nicht die direkte Veränderung der intestinalen Perfusion untersucht, jedoch schlussfolgerte sie aufgrund der verbesserten kardiovaskulären und respiratorischen Parameter, dass die Vorbehandlung mit DMSO einen protektiven Effekt nach der LPS-Applikation haben muss. Werden die hier erarbeiteten Ergebnisse betrachtet und mit Brackett verglichen, dann ist die protektive Wirkung des DMSO nicht in der intestinalen Mikrozirkulation zu finden. Denn hier zeigen die mit LPS behandelten Gruppen eine deutliche Verschlechterung der intestinalen Mikrozirkulation. Dennoch ist die Arbeitsgruppe von Goode [132] der Ansicht, dass freie Radikale in der Pathogenese der Sepsis eine entscheidende Rolle spielen und dementsprechend auch die Verwendung von Antioxidantien notwendig ist.

In der Literatur werden etliche Wege postuliert, welche zu einer Minderperfusion der intestinalen Mikrozirkulation führen. Von großer Bedeutung scheint hierbei die verminderte oder gehemmte Vasokonstriktion mit folgender Vasodilatation zu sein, welche eine Ödembildung nach sich zieht und die Mikrozirkulation daher noch weiter verschlechtert. Einer der wichtigsten Faktoren ist die induzierte NO-Synthetase (iNOS) [133;134], die unter anderem durch Src-Tyrosinkinase aktiviert wird und NO synthetisiert, welches zu einer Hemmung der Vasokonstriktion führt [132]. Diese Aussage steht jedoch im Kontrast zu den hier gewonnenen Ergebnissen. Hierbei scheint die Blockade der Src-Tyrosinkinase durch PP2 keinen positiven Einfluss auf die intestinale Mikrozirkulation zu haben. Die vorliegende Arbeit zeigt eine signifikante Verschlechterung der funktionellen Kapillardichte und einen signifikanten Anstieg

der dysfunktionellen Kapillardichte. Einen Unterschied zwischen den Gruppen mit und ohne Endotoxin konnte in Bezug auf die nonfunktionelle Kapillardichte nicht festgestellt werden. In der mucosalen Kapillardichte zeigte sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Ergebnisse hinsichtlich Untersuchungen zwischen der intestinalen Mikrozirkulation und der Verwendung von PP2 wurden bisher nicht veröffentlicht.

6.4 Blutgase

Während eines septischen oder endotoxiämischen Vorganges unterliegt der Respirationstrakt, wie auch das kardiovaskulären System, einer weitreichenden Beeinträchtigung. Die ersten Symptome einer respiratorischen Einschränkung oder gar respiratorischen Insuffizienz sind eine Hyperventilation, eine Hypokapnie und eine dem Mangel an Hydrogencarbonat folgende respiratorische Alkalose [135]. Nach dem aktuellen Sequential-Organ-Failure-Assessment-(SOFA) Score zeigt sich ein respiratorisches Versagen anhand eines fallenden $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Quotienten [12].

Als Ursache für diese Insuffizienz werden Mediatoren, wie $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ und andere Zytokine genannt. Dabei ist sie unabhängig davon, wo der Fokus der Inflammation zu finden ist [136]. Ein weiterer Punkt für die Notwendigkeit eines funktionierenden respiratorischen Systems ist der Säure-Basen-Haushalt, welcher durch die Respiration beeinflusst wird.

Bei septischen Verläufen zeigen sich zudem ein Anstieg der Lactat- und ein Abfall der Glucose-Konzentrationen als Zeichen einer inadäquaten Perfusion. Dass dabei die Höhe der Lactatkonzentration mit der Mortalität assoziiert ist, hat bereits Lee D. Cady [137] in den 70er Jahren postuliert.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Lactatkonzentration unter der Verwendung von LPS. Zusätzlich zeigte sich, dass die Zugabe von PP2 zum LPS die Lactatkonzentration signifikant steigert. Vor der Applikation von LPS zeigten sich Lactatkonzentrationen aller vier Gruppen im Mittel von 1,35 mmol/l ($\pm 1,25$ SEM). Zum Zeitpunkt T=120 Minuten zeigten sich in der zweiten Blutentnahme hingegen deutliche Unterschiede. Bei den nicht endotoxiämischen Gruppen zeigten sich signifikante Senkungen und bei den endotoxiämischen Gruppen signifikante Anstiege. Zudem war bei der mit PP2 und LPS behandelten Gruppe, im Vergleich zur Gruppe, die nur PP2 erhalten hat, ein diskreter nicht signifikanter Anstieg zu verzeichnen. Gleiches trifft auf den Vergleich zwischen den nicht endotoxiämischen Gruppen zu. In Anbetracht des Reviews von Okutani [130] von 2006, das berichtet, dass eine Hemmung der Src-Tyrosinkinase die LPS-induzierte Gefäßpermeabilität reduziert und so die Perfusion verbessern und Gewebsschäden reduzieren soll, kann die hier

vorliegende Lactaterhöhung mit diesem Review nicht in Einklang gebracht werden. Im Gegenteil, die zu erwartende Senkung der Lactatkonzentration, aufgrund der vermuteten verbesserten Perfusion und folgender Verringerung der Gewebshypoxie, ist nicht eingetreten. Die Erhöhung der Lactatkonzentration lässt sich über den Pasteur-Effekt erklären. Dieser besagt, dass bei einer Hypoxämie die aerobe Glycolyse in die anaerobe Glycolyse übergeht und somit mehr Glucose notwendig ist, um den Zellstoffwechsel mit energiereichen Molekülen, in Form von ATP, zu versorgen. Bei diesem Vorgang wird Glucose enzymatisch in Lactat umgewandelt.

Ähnliches zeigen die Ergebnisse der Glucosekonzentration. Durch eine verminderte Perfusion entsteht im folgenden Gewebe eine Hypoxämie, wodurch die aerobe Glycolyse in die anaerobe Glycolyse übergeht. Dabei entsteht aus einem Molekül Glucose ein Molekül Lactat, was einen hohen Glucoseverbrauch zur Folge hat. Der Abfall der Glucosekonzentration war in den LPS applizierten Gruppen signifikant im Vergleich zur jeweils ersten Blutentnahme. Jedoch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede untereinander oder im Vergleich zu den nicht endotoxiämischen Gruppen.

Die Ergebnisse der Blutgasanalyse von $p\text{CO}_2$ entsprechen dem physiologischen Bereich und sind mit ähnlichen Arbeiten vergleichbar [116;118;122-124]. Ein Augenmerk sei darauf gerichtet, dass die zweite Blutentnahme immer einen signifikanten Abfall im Vergleich zur ersten Blutentnahme zeigt. Der arterielle $p\text{O}_2$ -Wert liegt im Vergleich zu anderen Arbeiten jedoch bedeutend niedriger. Dies trifft sowohl für die erste, als auch die zweite Blutentnahme zu. In der ersten Blutentnahme waren die $p\text{O}_2$ -Werte zwischen 66 und 67 mmHg. In der zweiten Blutentnahme zeigte sich, dass die Gruppen ohne PP2 einen höheren $p\text{O}_2$ -Wert haben, als die mit PP2 behandelten Gruppen. Allerdings waren diese Unterschiede in nicht signifikanter Höhe. Dennoch könnte daraus auf eine negative Wirkung des PP2 oder sogar eine positive Wirkung des DMSO geschlossen werden. Dies würde dann im Gegensatz zu den Ergebnissen von Brackett stehen [131]. Weiterhin hat die Arbeitsgruppe um Bohlen [138] publiziert, dass unter einer Zunahme von $p\text{O}_2$ die submucosalen (Lamina circularis et longitudinalis) Gefäße dilatieren. Allerdings erweitern sich die mucosalen Gefäße auch unter der Abnahme von $p\text{O}_2$, um dadurch die Perfusion zu erhöhen. Dieser Zusammenhang konnte hier nur teilweise gezeigt werden. Die Gruppen ohne PP2 haben im Vergleich zu den Gruppen mit PP2 tendenziell einen höheren, allerdings nicht signifikant höheren, $p\text{O}_2$ -Wert. Jedoch ist die funktionelle Kapillardichte von der Gruppe ohne PP2 höher als die der Gruppen mit PP2. Bei Betrachtung der mit LPS applizierten Gruppen, kann die vorliegende Arbeit die Ergebnisse von Bohlen et al. [138] nicht bestätigen. Es zeigen sich, sowohl in der Lamina circularis als auch

longitudinalis, signifikant höhere funktionelle Kapillardichten, die für eine höhere Perfusion sorgen. Jedoch ist diesem Fakt hinzu zufügen, dass Bohlen bei der Arbeit den pO_2 unter nicht endotoxiämischen Bedingungen betrachtet hat.

Die Betrachtung des pH-Wertes zeigt, dass es bei den LPS behandelten Gruppen einen diskreten nicht signifikanten Anstieg gibt, sodass sich der pH-Wert in den Bereich der Alkalose verschiebt. Dieser alkalische pH-Wert steht in Korrelation mit der Hypokapnie und dem signifikant geringeren Hydrogencarbonat, das die mit LPS-behandelten Gruppen II und IV aufweisen. Auch diese Werte sind mit den Ergebnissen ähnlicher Versuchsreihen zu vergleichen [116;118;122-124].

6.5 Zytokine

Durch die Verwendung von LPS kommt es über mehrere Signaltransduktionen zu einer Freisetzung von $IFN-\gamma$. Dadurch wird eine inflammatorische Kaskade ausgelöst. Einen Zusammenhang zwischen LPS und der $IFN-\gamma$ Konzentration, hat bereits die Arbeitsgruppe um Thomas Held [67] Ende der 90er Jahre beschrieben. Diese Korrelation zwischen Gabe von Lipopolysaccharid und einem Anstieg der Interferon gamma Konzentration konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Wird davon ausgegangen, dass die Verwendung von PP2 den JAK/STAT Pathway hemmt oder gar blockiert, wäre ein Unterschied zwischen den Gruppen, beiden denen PP2 verwendet wurde und denen, bei den kein PP2 verwendet wurde, zu erwarten gewesen. Der Nachweis eines solchen Unterschiedes blieb jedoch aus.

Die von Okutani et al. [130] in einem Review von 2006 beschriebene Expressionssteigerung von c-Src, Hck und Lyn durch LPS, wodurch mehr $TNF-\alpha$ synthetisiert wird, konnte in der Gruppe III deutlich gezeigt werden. Im Umkehrschluss hätte dies allerdings auch bedeutet, dass durch die Blockade mittels PP2 diese Effekte verringert oder gar aufgehoben werden könnten. Dieser Teil der Hypothese konnte für $TNF-\alpha$ nicht gezeigt werden.

Weiterführend ist durch Charles Dinarello [59;64;65] bekannt, dass durch LPS die IL-1-Synthetase stimuliert wird, sodass mehr $IL-1\alpha$ von Makrophagen und Monozyten produziert und sezerniert wird. Ein deutlicher Anstieg der Interferon- 1α Konzentration konnte in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesen werden.

Bei Patienten mit einer Sepsis konnte nachgewiesen werden, dass bei einer schweren Sepsis eine hohe Konzentration von IL-4 im Serum vorhanden ist. Dabei konnte auch nachgewiesen werden, dass Sepsis-Überlebende eine höhere IL-4-mRNA Konzentration in peripheren

mononukleären Zellen haben, als die Patienten die an der Sepsis verstorben sind. Das Plasmalevel von IL-4 allein gibt jedoch keinen Anhalt auf die Überlebenswahrscheinlichkeit [69]. In der vorliegenden Arbeit hat sich gezeigt, dass unter der Wirkung von LPS die Konzentration des IL-4, im Vergleich zu den Gruppen, welche kein LPS erhalten haben, um mehr als den Faktor 100 erhöht ist. Ein direkter Zusammenhang zwischen Src-Kinasen und IL-4 ist bisher nicht beschrieben.

In Bezug auf eine Infektion ist die Notwendigkeit der Anwesenheit von Monozyten unbestritten. Damit eine Migration zum Ort des Geschehens möglich ist, besteht die Notwendigkeit von chemotaktischen Proteinen, wie MCP-1. Wie bekannt, wird die Synthese und Sekretion von MCP-1 durch IL-1 α , IFN- γ , TNF- α und LPS gesteigert [73;105]. Eine Erhöhung der MCP-1-Konzentration unter septischen Bedingungen, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Im Gegenteil, es konnte keine Erhöhung, sondern ein signifikanter Abfall der MCP-1-Konzentration in den mit LPS-behandelten Gruppen nachgewiesen werden und das trotz steigenden Konzentrationen von IL-1 α , IL-4, IFN- γ und TNF- α . Ein Einfluss von PP2 lässt sich hieraus jedoch nicht erkennen oder ableiten. Ein Zusammenhang zwischen Src-Kinase oder Verwendung von PP2 und der Konzentration von MCP-1 bzw. deren Effekte ist ebenfalls bisher noch nicht beschrieben worden.

Von einer unsachgemäßen Arbeitsweise kann ebenfalls nicht ausgegangen werden, da der Verlauf der Konzentrationsanstiege von IL-1 α , IL-4, IFN- γ und TNF- α eindeutig auf ein Infektionsgeschehen hinweisen. Weiterhin ist PP2 bisher nicht in einer experimentellen septischen Versuchsreihe untersucht worden.

7 Fazit und Perspektive

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intravenöse Gabe von PP2 unter Endotoxinämie zu einer deutlichen Verschlechterung der kapillaren Perfusion und einer Steigerung der temporären Leukozytenadhäsion führt. Diese Ergebnisse stehen in einem Kontrast zu der bisherigen Literatur. Da bisher keine Studie veröffentlicht wurde, die zu anderen Ergebnissen kommt, müssen die hier gewonnenen Ergebnisse kritisch betrachtet werden.

Weiterhin darf nicht vernachlässigt werden, dass Versuche *in vitro* und *in vivo* diversen Grenzen unterliegen und nicht ohne Weiteres auf andere Spezies oder den Menschen übertragen werden können. Als wichtigster Punkt hierbei ist der zeitliche Versuchsablauf im Versuchsmodell zu betrachten. Bei diesem Modell wirken sowohl Endotoxin als auch PP2 für einen relativ kurzen Zeitraum. Auch dem Organismus steht nur diese Zeit zur Verfügung, um auf jene Reize zu reagieren. Dieser Zeitraum entspricht nicht den Gegebenheiten des pathophysiologischen Ablaufes einer vergleichbaren humanen Sepsis [122].

Ein weiterer Punkt ist der technische Ablauf. Auch wenn die Anästhesie und die operative Technik standardisiert wurden, sind diese als mögliche Fehlerquelle nicht vollständig auszuschließen [122].

Um zu erklären, warum die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit mit denen in der Literatur beschriebenen Ergebnissen differieren, sollten weitere Versuchsreihen durchgeführt werden. Durch weitere Versuchsreihen lässt sich ein mögliches Potenzial der Src-Tyrosinkinase-Hemmung in Bezug auf das therapeutische Fenster und die daraus entstehenden Möglichkeiten zur Verbesserung der Mikrozirkulation prüfen. Unter anderem sollte dabei die Dosierung aber auch Zeitpunkt und die Zeitabstände der Applikation verändert werden. Möglicherweise erweist sich auch die Gabe von PP2 vor der Endotoxinämie als vorteilhaft. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse sollten auch andere Sepsismodelle, wie CASP (Colon Ascendens Stent Peritonitis) oder CLP (Cecal Ligation and Puncture) angewendet werden und im Anschluss Überlebensstudien an Versuchstieren vorgenommen werden. Sollten diese Ergebnisse einen positiven Effekt nachweisen können, könnten auch humane Versuchsreihen in Erwägung gezogen werden.

8 Zusammenfassung

Das klinische Bild der Sepsis, des septischen Schockes und des Multiorganversagens sind nach wie vor Krankheitsbilder, wie sie auf Intensivstationen vorzufinden sind und häufig mit einer hohen Letalität assoziiert sind. Die Störung bzw. das Versagen der Mikrozirkulation ist und bleibt einer der Hauptmechanismen als Ursache dafür [1]. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, einen auf Zellebene beschriebenen Weg auf ein in vivo Tiermodell zu übertragen. Der bereits beschriebene Weg besagt, dass die Hemmung der Src-Tyrosinkinase durch das synthetische PP2, eine Reduktion der proinflammatorischen Zytokine zur Folge hat. Dieses sollte die Mikrozirkulation verbessern. In der vorliegenden Versuchsreihe wurde dafür ein bereits gut etablierter Versuchsablauf der experimentellen Endotoxinämie mit anschließender Intravitalmikroskopie am Tiermodell Ratte verwendet [113;116-118,122-124].

In der vorliegenden Arbeit hat sich gezeigt, dass sich unter experimenteller Endotoxinämie sowie unter der Verwendung von PP2 bei einer Dosierung von 0,2mg/kg KG, die Mikrozirkulation signifikant verschlechtert. Dies wird bei Betrachtung der funktionellen Kapillardichten besonders deutlich. Im Vergleich der beiden endotoxiämischen Gruppen kann bei der Gruppe, die PP2 erhalten hat, ein Abfall der FCD von 47,8% für die Lamina longitudinalis und 25,5% für die Lamina circularis zu der Gruppe, die kein PP2 erhalten hat, festgestellt werden. Folglich ist es umgekehrt bei der Betrachtung der DFCD. Hierbei kann bei der Gruppe, welche LPS und PP2 erhalten hat, ein Anstieg von 30,27% für die Lamina longitudinalis bzw. 28,2% für die Lamina circularis, im Vergleich zu der Gruppe, der nur LPS appliziert wurde, beobachtet werden. In Bezug auf die NFCD zeigt sich ebenfalls ein Anstieg bei der Gruppe, die LPS und PP2 erhalten hat, jedoch ist dieser nicht signifikant.

Zudem zeigt sich eine Steigerung der Leukozyteninteraktion bei Endotoxinämie und zusätzlicher Verwendung von PP2 in den postkapillären Venolen 1. und 3. Ordnung. Dabei zeigt sich ein Anstieg der Leukozyten mit temporärer Adhäsion von 112,9% bei Venolen 1. Ordnung und 95% bei Venolen 3. Ordnung. Allerdings befindet sich der Mittelwert in jeder Gruppe bei <10 Leukozyten im Beobachtungszeitraum. Bei der permanenten Leukozytenadhäsion hingegen können keine signifikanten Unterschiede bei der Verwendung von PP2 beobachtet werden. Weiterhin zeigte sich bei der Verwendung von PP2 ein signifikanter Anstieg der Lactatkonzentration von 16,35%, wenn zuvor LPS gegeben worden ist. In der Untersuchung der Zytokine zeigten sich Veränderungen zwischen den Gruppen mit und ohne Endotoxinämie. Die Verwendung von PP2 ist dabei irrelevant.

9 Literaturverzeichnis

- [1] Schmoch T, Bernhard M, Uhle F, Bickenbach J, Marx Gernot, Brenner T, Weigand MA; Neue Definition der Sepsis; Intensivmedizin up2date, Vol 14, pp 371-389, 2018.
- [2] Cohen J; The immunopathogenesis of sepsis; Nature, Vol 420, pp 19-26, 2002.
- [3] Fleischmann C, Thomas–Rueddel DO, Hartmann M, Hartog CS, Welte T, Heublei S, Dennler U, Reinhart K; Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-Patienten im Krankenhaus, Analyse der deutschlandweiten fallpauschalenbezogenen Krankenhausstatistik von 2007 bis 2013; Deutsches Ärzteblatt, Heft 10, pp 159-166, 2016.
- [4] Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL; Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003: Critical Care Medicine Vol 35, pp 1244-1250, 2007.
- [5] Manthey M; Untersuchung des Einflusses von Tyrosinkinase und -phosphatase auf die Lipopolysaccharid- induzierte vaskuläre Hyporeaktivität der Ratte in vitro; Dissertationsschrift Ernst- Moritz- Arndt- Universität Greifswald, 2009.
- [6] Lowell CA; Src-family kinases: rheostats of immune cell signaling; Molecular Immunology Vol 41, pp 631-643, 2004.
- [7] AWMF S2 Leitlinie: Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis, 2010, Gültigkeit abgelaufen, LL wird zur Zeit überarbeiten.
- [8] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ; American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis; Critical Care Medicine Vol 20, pp 864-874, 1992.
- [9] Marshall JC; The multiple organ dysfunction syndrome, Surgical treatment, Evidence based and problem oriented; Zuckschwerdt Verlag 2001.
- [10] Deitch EA; Multiple organ failure pathophysiology and potential future therapy; Annals of Surgery Vol 216, pp 117-134, 1992.
- [11] Biffl WL; Splanchnic ischaemia / reperfusion and multiple organ failure; British Journal of Anesthesia Vol. 77, pp 59-70, 1996.
- [12] Singer M; The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis -3); Journal of the American Medical Association Vol 8, pp 801-810, 2016.
- [13] Werdan et al.; Sepsis und MODS; 5. Auflage Springer Verlag 2016.
- [14] Opal SM, Scannon PJ, Vincent JL, White M, Carroll SF, Palardy JE, Parejo NA, Pribble JP, Lemke JH; Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-

binding protein in patients with severe sepsis and septic shock; *The Journal of Infectious Diseases* Vol 180, pp 1584-1589, 1999.

[15] Guha M, Mackman N; LPS induction of gene expression in human monocytes; *Cellular Signalling* Vol 13, pp 85-94, 2001.

[16] Beno DWA, Uhing MR, Goto M, Chen Y, Iyamapa-Serna VA, Kimura RE; Staphylococcal enterotoxin B potentiates LPS-induced hepatic dysfunction in chronically catheterized rats; *American Journal of Physiology- Gastrointestinal and Liver Physiology* Vol 280, pp 866–872, 2001.

[17] Jack RS1, Fan X, Bernheiden M, Rune G, Ehlers M, Weber A, Kirsch G, Mentel R, Fürll B, Freudenberg M, Schmitz G, Stelter F, Schütt C; Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection; *Nature* Vol 389, pp 742-745, 1997.

[18] Thomas CJ, Kapoor M, Sharma S, Bausinger H, Zyilan U, Lipsker D, Hanau D, Surolia A; Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an elector of LPS response; *Federation of European Biochemical Societies Letters* Vol 531, pp 184- 188, 2002.

[19] Kitchens RL; Role of CD14 in cellular recognition of bacterial lipopolysaccharides; *Chemical Immunology* Vol 74, pp 61-82, 2000.

[20] Ghosh S, Latimer RD, Gray BM, Harwood RJ, Oduro A; Endotoxin induced organ injury; *Critical Care Medicine* Vol 21, pp 19-24, 1993.

[21] Richard IT; Soluble CD14 mediated cellular responses to lipopolysaccharide; *Chemical Immunology* Vol 74, pp 108-121, 2000.

[22] Schumann RR; Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes; *Research in Immunology* Vol 143, pp 11-15, 1992.

[23] Schumann RR, Pfeil D, Lamping N, Kirschning C, Scherzinger G, Schlag P, Karawajew L, Herrmann F; Lipopolysaccharide induces the rapid tyrosine phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases erk-1 and p38 in cultured human , vascular endothelial cells requiring the presence of soluble CD14; *Blood* Vol 87, pp 2805-2814, 1996.

[24] Simmons DL, Tan S, Tenen DG, Nicholson-Weller A, Seed B: Monocyte antigen CD14 is a phospholipid anchored membrane protein; *Blood* Vol 73, pp 284-289, 1989.

[25] Jerala R; Structural biology of the LPS recognition; *International Journal of Medical Microbiology* Vol 297, pp 353–363, 2007.

[26] Ranoa DR, Kelley SL, Tapping RI; Human lipopolysaccharide-binding Protein (LBP) and CD14 independently deliver triacylated lipoproteins to Toll-like Receptor 1 (TLR1) and TLR2

and enhance formation of the ternary signaling complex; *The Journal of Biological Chemistry* Vol 288, pp 9729-9741, 2013.

[27] Van Amersfoort ES, Van Berkel TJC, Kuiper J; Receptors, mediators and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock; *Clinical Microbiology Reviews* Vol. 16, pp 379-414, 2003.

[28] Moreno C, Merino J, Ramírez N, Echeverría A, Pastor F, Sánchez-Ibarrola A; Lipopolysaccharide needs soluble CD14 to interact with TLR4 in human monocytes depleted of membrane CD14; *Microbes and Infection* Vol 6, pp 990–995, 2004.

[29] Delude RL, Savedra R, Zhao H, Thieringer R, Yamamoto S, Fenton MJ, Golenbock DT; CD14 enhances cellular responses to endotoxin without imparting ligand- specific recognition; *Cell Biology* Vol.92, pp 9288-9292 1995.

[30] Marra MN, Wilde CG, Griffith JE, Snable JL, Scott RW; Bactericidal / Permeability-increasing protein has endotoxin neutralization activity; *The Journal of Immunology* Vol. 144, pp 662-666, 1990.

[31] Guha M, Mackman N; The phosphatidylinositol 3-kinase-akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells; *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 277, pp 32124–32132, 2002.

[32] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S; Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4; *Nature*, Vol 420, pp 324-329, 2002.

[33] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, Takeuchi O, Takeda K, Akira S; TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4–mediated MyD88-independent signaling pathway; *Nature Immunology* Vol 4, pp 1144-1150, 2003.

[34] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS; LPS/TLR4 signal transduction pathway; *Cytokine* Vol 42, pp 145–151, 2008.

[35] Liu SF, Malik AB; NF- κ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation; *American Journal of Physiology- Lung Cell Molecular Physiology* Vol 290, pp 622-645, 2006.

[36] Li JD, Feng W, Gallup M, Kim JH, Gum J, Kim Y, Basbaum C; Activation of NF- κ B via a Src-dependent Ras-MAPK-pp90rsk pathway is required for pseudomonas aeruginosa-induced mucin overproduction in epithelial cells; *Proceedings of the National Academy of Science* Vol 95, pp. 5718–5723, 1998.

- [37] Chang CK, Albarillo MV, Schumer W; Therapeutic effect of dimethyl sulfoxide on ICAM-1 gene expression and activation of NF-kB and AP-1 in septic rats; *Journal of Surgical Research* Vol 95, pp 181–187, 2001.
- [38] Takadera T, Fujibayashi M, Koriyama Y, Kato S; Apoptosis induced by Src-Family tyrosine kinase inhibitors in cultured rat cortical cells; *Neurotoxicity Research* Vol 21, pp 309–316, 2012.
- [39] Petrone A, Sap J; Emerging issues in receptor protein tyrosine phosphatase function: lifting fog or simply shifting?; *Journal of Cell Science* Vol 113, pp 2345-2354, 2000.
- [40] Marie C, Pitton C, Fitting C, Cavaillon JM; Regulation by anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10, IL-13, TGF) of interleukin-8 production by LPS and/ or TNF-activated human polymorphonuclear cells; *Mediators of Inflammation* Vol 5, pp 334-340, 1996.
- [41] Lam C, Tyml K, Martin C, Sibbald W; Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis; *Journal of Clinical Investigation* Vol 94, pp 2077-2083, 1994.
- [42] Legrand M, Klijn E, Payen D, Ince C; The response of the host microcirculation to bacterial sepsis: Does the pathogen matter?; *Journal of Molecular Medicine* Vol 88, pp 127–133, 2010.
- [43] Lundy DJ, Trzeciak S; Microcirculatory dysfunction in sepsis; *Critical Care Clinics* Vol 25, pp 721–731, 2009.
- [44] Landry DW, Juan AO; The Pathogenesis of a vasodilatory shock; *New England Journal of Medicine*, Vol 345, pp 588-595, 2001.
- [45] Taylor AE, Moore T, Paisley P; The time has finally arrived: use of intravital microscopy in the airway circulation; *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* Vol 282, pp 957–958, 2002.
- [46] Oyaizu T, Fung SY, Shiozaki A, Guan Z, Zhang Q, Santos CC, Han B, Mura M, Keshavjee S, Liu M; Src tyrosine kinase inhibition prevents pulmonary ischemia–reperfusion-induced acute lung injury; *Intensive Care Medicine* Vol 38, pp 894–905, 2012.
- [47] Marshall JC, Nicolas CV, Jonathan ML; The Gastrointestinal Tract, The “Undrained Abscess” of multiple organ failure; *Annals of Surgery* Vol 218, No.2, pp111-119, 1993.
- [48] Schultz H, Weiss JP; The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease; *Clinica Chimica Acta* Vol 384, pp 12–23, 2007.
- [49] Matheson PJ, Wilson MA, Garrison RN; Regulation of intestinal blood flow; *Journal of Surgical Research* Vol 93, pp 182–196, 2000.
- [50] Birnbaum J, Hein OV, Lührs C, Rückbeil O, Spies C, Ziemer S, Gründling M, Usichenko T, Meissner K, Pavlovic D, Kox WJ, Lehmann C; Effects of coagulation factor XIII on

intestinal functional capillary density, leukocyte adherence and mesenteric plasma extravasation in experimental endotoxemia; *Critical Care*, Vol 10, R29, 2006.

[51] Drazenovic R, Samsel RW, Wylam ME, Doerschuk CM, Schumacker PT; Regulation of perfused capillary density in canine intestinal mucosa during endotoxemia; *The American Physiological Society*, Vol 72, pp 259-265, 1992.

[52] Parrillo JE, Burch C, Shelhamer JH, Parker MM, Natanson C, Schuette W; A circulating myocardial depressant substance in human with septic shock: Septic shock patients with reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses invitro myocardial cell performance; *Journal of Clinical Investigation* Vol 76, pp. 1539-1553, 1985.

[53] Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA Jr, O'Connor JV; Tumor necrosis factor (Cachectin), is an endogenous pyrogen and induces production interleukin; *Journal of Experimental Medicine* Vol 163, pp 1433-1450, 1986.

[54] Takumi T, Hiroko K, Yasuhiro T, Ken Y; The antiinflammatory effects of ketamine in endotoxemic rats during moderate and mild hypothermia; *Anesthesia and Analgesia* Vol 98, pp 1114–1120, 2004.

[55] Fleetwood AJ, Lawrence T, Hamilton JA, Cook AD; Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation.; *Journal of Immunology* Vol 178, pp 5245-5252, 2007.

[56] Fisher CJ, Marra MN, Paladry, JE, Marchbanks, CR, Scott RW, Opal SM; Human neutrophil bactericidal/ permeability- increasing protein reduces mortality rate from endotoxin challenge: A placebo- controlled study; *Critical Care Medicine* Vol 22, pp 553-558, 1994.

[57] Dentener MA, Bazil V, Von Asmuth EJ, Ceska M, Buurman WA; Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor factor- α , IL-6 and IL-8 release by human necrosis monocytes and alveolar macrophages; *The Journal of Immunology* Vol 150, pp 2885-2891, 1993.

[58] Doherty GM, Lange JR, Langstein HN, Alexander HR, Buresh CM, Norton JA; Evidence for IFN γ as a mediator of the lethality of endotoxin and tumor necrosis factor α ; *The Journal of Immunology* Vol 149, pp 1666-1767, 1992.

[59] Dinarello CA; Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock; *Chest* Vol 112, pp 321-329, 1997.

[60] Guo RF, Riedemann NC, Ward PA; Role of C5a-C5aR interaction in sepsis; *shock*, Vol 21, pp. 1–7, 2004.

- [61] Chang CK, Llanes S, Schumer W; Inhibitory effect of dimethyl sulfoxide on nuclear factor- κ B activation and intercellular adhesion molecule 1 gene expression in septic rats; *Journal of Surgical Research* Vol 82, pp 294–299, 1999.
- [62] Beutler B, Cerami A; The biology of Cachectin / TNF α primary mediator of the host response; *Annular Review of Immunology* Vol 7, pp 625-655, 1989.
- [63] Hotchkiss RS, Karl IE; The pathophysiology and treatment of sepsis; *New England Journal of Medicine*, Vol 348, pp 138-150; 2003.
- [64] Dinarello CA; Blocking IL-1 in systemic inflammation; *Journal of Experimental Medicine* Vol 201, pp 1355–1359, 2005.
- [65]. Dinarello CA; Biologic basis for interleukin-1 in disease; *Blood* Vol 87, pp 2095–2147, 1996.
- [66] Fukumura D, Miura S, Kurose I, Higuchi H, Suzuki H, Ebinuma H, Han, YJ Watanabe N, Wakabayashi G, Kitajima M, Ishii H; IL-1 Is an important mediator for microcirculatory changes in endotoxin-induced intestinal mucosal damage; *Digestive Diseases and Sciences*. Vol 41, pp 2482-2492; 1996.
- [67] Held TK, Weihua X, Yuan L, Kalvakolanu DV, Cross AS; Gamma interferon augments macrophage activation by lipopolysaccharide by two distinct mechanisms, at the signal transduction level and via an autocrine mechanism involving tumor necrosis factor alpha and interleukin-1; *Infection and Immunity* Vol 67, pp 206-212, 1999.
- [68] Lin CF, Tsai CC, Huang WC, Wang CY, Tseng HC, Wang Y, Kai JI, Wang SW, Cheng YL; IFN-gamma synergizes with LPS to induce nitric oxide biosynthesis through glycogen synthase kinase-3-inhibited IL-10; *Journal of Cellular Biochemistry* Vol 105, pp 746–755, 2008.
- [69] Wu HP, Wu CL, Chen CK, Chung K, Tseng JC, Liu YC, Chuang DY; The interleukin-4 expression in patients with severe sepsis; *Journal of Critical Care* Vol 23, pp 519–524, 2008.
- [70] Apte SH, Baz A, Groves P, Kelso A, Kienzle N; Interferon- gamma and interleukin-4 reciprocally regulate CD8 expression in CD8- T cells; *Proceeding of the National Academy of Science* Vol 105, pp 17475–17480, 2008.
- [71] Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE; Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview; *Journal of Interferon & Cytokine Research* Vol 29, pp 313-326, 2009.
- [72] Bianconi V, Sahebkar A, Atkin SL3, Pirro M; The regulation and importance of monocyte chemoattractant protein-1; *Current Opinion in Hematology*, Vol 25; 44-51; 2018
- [73] Gomes RN, Figueiredo RT, Bozza FA, Pacheco P, Amâncio RT, Laranjeira AP, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Bozza MT; Increased susceptibility to septic and endotoxic shock

in Monocyte Chemoattractant Protein 1/CC Chemokine Ligand 2-Deficient Mice correlates with reduced interleukin 10 and enhanced macrophage migration inhibitory factor production; *Shock*, Vol 26, pp 457-463, 2006.

[74] Schmid-Schönbein GW; Biomechanics of microcirculatory blood perfusion; *Annual Review of Biomedical Engineering* Vol 1, pp 73–102, 1999.

[75] Ley K; Leukocyte adhesion to vascular endothelium; *Journal of reconstructive microsurgery* Vol 8, pp 495-503, 1992.

[76] Doré M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW; P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo; *Blood* Vol 82, pp 1308-1316, 1993.

[77] Piccardoni P, Sideri R, Manarini S, Piccoli A, Martelli N, de Gaetano G, Cerletti C, Evangelista V; Platelet/polymorphonuclear leukocyte adhesion: a new role for SRC kinases in MAC-1 adhesive function triggered by P-selectin; *Blood* Vol 98, pp 108-116, 2001.

[78] Bonfanti R, Furie BC, Furie B, Wagner DD. PADGEM (GMP140) Is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells; *Blood* Vol 73, pp 1109-1112, 1989.

[79] Baatz H, Pleyer U, Thiel HJ, Hammer C; In Vivo Study of leukocyte-endothelium interaction in endotoxin-induced uveitis; *Investigative Ophthalmology & Visual Science*; Vol 36, pp 1960-1967, 1995.

[80] Frenette PS, Johnson RC, Hynes RO, Wagner DD; Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: An interaction mediated by endothelial P-selectin; *Cell Biology* Vol 92, pp 7450-7454, 1995.

[81] Zarbock A, Ley K; Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium; *The American Journal of Pathology* Vol 172, pp 1-7, 2008.

[82] Deshmukh L, Meller N, Alder N, Byzova T, Vinogradova O; Tyrosine phosphorylation as a conformational switch; *The Journal of biological chemistry* Vol 286, pp 40943–40953, 2011.

[83] Vestweber D; Adhesion and signaling molecules controlling the transmigration of leukocytes through endothelium; *Immunological Reviews* Vol 218, 2007.

[84] Bohlen HG, Hutchins PM, Rapela CE, Green HD; Microvascular control in intestinal mucosa of normal and hemorrhaged rats; *American Journal of Physiology* Vol. 229, pp 1159-1164, 1975.

[85] Scalia R, Booth G, Lefer DJ; Vascular endothelial growth factor attenuates leukocyte–endothelium interaction during acute endothelial dysfunction: essential role of endothelium-derived nitric oxide; *Federation of European Biochemical Societies* Vol 13, 1039-1046 1999.

[86] Arraes SM, Freitas MS, da Silva SV, de Paula Neto HA, Alves-Filho JC, Auxiliadora Martins M, Basile-Filho A, Tavares-Murta BM, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ; Impaired

neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation; *Blood* Vol 108, pp 2906-2913, 2006.

[87] Korade-Mirnic Z, Corey SJ; Src kinase-mediated signaling in leukocytes; *Journal of Leukocyte Biology*, Vol 68, pp 603-613, 2000

[88] Okutani D, Lodyga M, Han B, Liu M; Src protein tyrosine kinase family and acute inflammatory responses; *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* Vol 291, pp 129- 141, 2006.

[89] Belsches-Jablonski AP, Demory ML, Parsons JT, Parsons SJ; The Src pathway as a therapeutic strategy; *Drug Discovery Today Therapeutic Strategies* Vol 2, pp 313-321, 2005.

[90] Frame MC; Review Src in cancer: deregulation and consequences for cell behavior; *Biochimica et Biophysica Acta* Vol 1602, pp 114– 130, 2002.

[91] Martin SG; The hunting of Src; *Nature Reviews* Vol 2, pp 467-475, 2001.

[92] Aleshin A, Finn RS; SRC: A century of science brought to the clinic; *Neoplasia* Vol 12, pp 599-607, 2010.

[93] Chatzizacharias NA, Kouraklis GP, Giaginis CT, Theocharis SE, Chatzizacharias; Clinical significance of Src expression and activity in human neoplasia; *Histology Histopathology* Vol 27, pp 677-692, 2012.

[94] Chaturvedi G, Arai K, Terranova PF, Roby KF; The Src tyrosine kinase pathway regulates thecal CYP17 expression and androstenedione secretion; *Molecular Cell Biochemistry* Vol 318, pp 191–200, 2008.

[95] Goi T, Shipitsin M, Lu Z, Foster DA, Klinz SG, Feig LA; An EGF receptor/Ral-GTPase signaling cascade regulates c-Src activity and substrate specificity; *The European Molecular Biology Organization Journal* Vol 19, pp 623-630, 2000.

[96] Missbach M, Jeschke M, Feyen J, Müller K, Glatt M, Green J, Susa M; A novel inhibitor of the tyrosine kinase Src suppresses phosphorylation of its major cellular substrates and reduces bone resorption in vitro and in rodent models in vivo; *bone* Vol. 24, pp 437–449, 1999.

[97] Planas-Silva, Hamilton KN; Targeting c-Src kinase enhances tamoxifen inhibitory effect on cell growth by modulating expression of cell cycle and survival proteins; *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* Vol 60, pp 535–543, 2006.

[98] Kong L, Deng Z, Shen H, Zhang Y; Src family kinase inhibitor PP2 efficiently inhibits cervical cancer cell proliferation through down-regulating phospho-Src-Y416 and phospho-EGFR-Y1173; *Molecular Cell Biochemistry* Vol 348, pp 11–19, 2011.

- [99] Bartscht T, Lehnert H, Gieseler F, Ungefroren H; The Src family kinase inhibitors PP2 and PP1 effectively block TGF-beta1-induced cell migration and invasion in both established and primary carcinoma cells; *Cancer Chemotherapy Pharmacology* Vol 70, pp 221–230, 2012.
- [100] Hishiki T, Saito T, Sato Y, Mitsunaga T, Terui E, Matsuura G, Saito E, Shibata R, Mise N, Yokoyama Y, Yoshida H; Src kinase family inhibitor PP2 induces aggregation and detachment of neuroblastoma cells and inhibits cell growth in a PI3 kinase/Akt pathway-independent manner; *Pediatric Surgery International* Vol 27, pp 225–230, 2011.
- [101] Bialy L, Waldmann H; Inhibitors of protein tyrosine phosphatases: Next-Generation Drugs?; *Angewandte Chemie*, Vol. 44, pp 3814-3839, 2005.
- [102] Bain J, Plater L, Elliott M, Shpiro N, Hastie JC, Mclauchlan H, Klevernic I, Arthur JSC, Alessi DR, Cohen P; The selectivity of protein kinase inhibitors: a further update; *Biochemical Journal*, Vol 408, pp 297–315, 2007.
- [103] Brandvold KR, Steffey ME, Fox CC, Soellner MB; Development of a highly selective c-Src kinase inhibitor; *ACS Chemical Biology* Vol 7, pp 1393–1398, 2012.
- [104] Leu TH, Charoenfuprasert S, Yen CK, Fan CW, Maa MC; Lipopolysaccharide-induced c-Src expression plays a role in nitric oxide and TNF- secretion in macrophages; *Molecular Immunology* Vol 4, pp 308–316, 2006.
- [105] Korade-Mirnic Z, Corey SJ; Src kinase- mediated signaling in leukocyte; *Journal of Leukocyte Biology*, Vol 68, pp 603-613, 2000.
- [106] Jia SH, Parodo J, Kapus A, Rotstein OD, Marshall JC; Dynamic regulation of neutrophil survival through tyrosine phosphorylation or dephosphorylation of Caspase-8; *The Journal of Biological Chemistry* Vol 283, pp 5402–5413, 2008.
- [107] Wang W, Shang LH, Jacobs DO; Complement regulatory protein CD59 involves c-SRC related tyrosine phosphorylation of the creatine transporter in skeletal muscle during sepsis; *Surgery* Volume 132, pp 334-340, 2002.
- [108] Wang W, Jobst MA, Bell B, Zhao CR, Shang LH, Jacobs DO; Phosphorylation of the CreatT in skeletal muscle during Cr supplementation decreases tyrosine sepsis; *American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism* Vol 282, pp 1046-1054, 2002.
- [109] Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ, Pollok BA, Connelly PA; Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor; *The Journal of biological chemistry* Vol 271, pp 695–701, 1996.
- [110] Zhu X, Ki, JL, Newcomb JR, Rose PE, Stover DR, Toledo LM, Zhao H, Morgenstern KA; Structural analysis of the lymphocyte-specific kinase Lck in complex with non-selective and Src family selective kinase inhibitors; *Structure*, Vol 7, pp 651–661, 1999.

- [111] Han Y, Yuan N, Zhang SJ, Gao J, Shi ZY, Zhou YB, Gao XY, Zhu GQ; c-Src in paraventricular nucleus modulates sympathetic activity and cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats; *European Journal of Physiology*, Vol 461, pp 437–446, 2011.
- [112] s.
- [113] Pavlovic D, Frieling H, Lauer KS, Bac VH, Richter J, Wendt M, Lehmann C, Usichenko T, Meissner K, Gruending M; Therostatic tissue platform for intravital microscopy:the hanging drop model; *Journal of Microscopy*, Vol 224, pp 203–210, 2006.
- [114] Bohlen GH, Gore RW; Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies; *Microvascular Research* Vol 11, pp 103-110, 1976.
- [115] Gonzalez AP, Sepulveda S, Massberg S, Baumeister R, Menger MD; In vivo Fluorescence microscopy for the assessment of microvascular reperfusion injury in small bowel transplants in rats; *Transplantation* Vol 58, pp 403-408, No.4 1994.
- [116] Diedrich S; Tierexperimentelle Untersuchungen zu den Auswirkungen von Imipenem und Tobramycin auf die intestinale Mikrozirkulation; *Dissertationsschrift Ernst- Moritz- Arndt- Universität Greifswald*, 2010.
- [117] Lauer K; Auswirkungen einer peritonealen Instillation von Taurolidin und Polyhexanid auf die intestinale Mikrozirkulation im endotoxämischen Rattenmodell, *Dissertationsschrift Ernst- Moritz- Arndt- Universität Greifswald*, 2006.
- [118] Knöck AH; Tierexperimentelle Untersuchungen zur Auswirkung von aktiviertem Protein C auf die intestinale Mikrozirkulation bei Endotoxinämie; *Dissertation Dissertationsschrift Ernst- Moritz- Arndt- Universität Greifswald*, 2012.
- [119] Gore RW, Bohlen HG; Microvascular pressures in rat intestinal muscle and mucosal villi; *American Journal of Physiology* Vol 233, pp 685-693, 1977.
- [120] Lim LH, Bochner BS, Wagner EM; Leukocyte recruitment in the airways: an intravital microscopic study of the rat tracheal microcirculation; *American Journal of Physiology- Lung Cell Molecular Physiology* Vol 282, pp 959–967, 2002.
- [121] Lim LH, , Wagner EM; Airway distension promotes leukocyte recruitment in rat tracheal circulation; *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* Vol 168, pp 1068-1074, 2003
- [122] Sprecher DA; Einfluss von Brain-derived Neurotrophic factor auf die intestinale Mikrozirkulation und Leukozyten-Endothel-Interaktion bei Endotoxinämie der Ratte in vivo; *Dissertationsschrift Ernst- Moritz- Arndt- Universität Greifswald*, 2018.

- [123] Wagner LF; Effekte des synthetischen Vasopressin - Analogons Desmopressin auf die intestinale Mikrozirkulation bei experimenteller Endotoxinämie; Dissertationsschrift Ernst-Moritz- Arndt- Universität Greifswald, 2012.
- [124] Lehmann C; Tierexperimentelle Untersuchungen zur intestinalen Mikrozirkulation bei Endotoxinämie; Habilitationsschrift Medizinischen Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, 2000.
- [125] Fukuda S, Yasu T, Predescu DN, Schmid-Schönbein GW; Mechanisms for regulation of fluid shear stress response in circulating leukocytes; *Circulation Research* Vol 86, pp 13-18, 2000.
- [126] Macarthur H, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D; Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock; *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol 97, pp 9753–9758, 2000.
- [127] Gaboury J, Woodman RC, Granger DN, Reinhardt P, Kubes P; Nitric oxide prevents leukocyte adherence role of superoxide; *Am Journal of Physiology- Heart Circulatory Physiology* Vol 265, pp 862-867, 1993.
- [128] Kubes P, Kanwar S, Niu XF, Gaboury JP; Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxid and mast cells; *Federation of European Biochemical Societies* Vol 7, pp 1293-1299, 1993.
- [129] Schiller HJ, Reilly PM, Bulkley GB; Antioxidant therapy; *Critical Care Medicine* Vol 21, 1993.
- [130] Okutani D, Lodyga M, Han B, Liu M; Src protein tyrosine kinase family and acute inflammatory respons; *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, Vol 291, pp 129-142, 2006.
- [131] Brackett DJ, Lerner MR, Wilson MF; Dimethyl sulfoxide antagonizes hypotensive, metabolic, and pathologic responses induced by endotoxin; *Circulatory Shock* Vol 33, pp 156, 1991.
- [132] Goode HF, Webster NR; Free radicals and antioxidants in sepsis; *Critical Care Medicine* Vol 21, pp 1770-1776, 1993.
- [133] Aktan F; iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation; *Life Sciences* Vol 75, pp 639–653, 2004.
- [134] Connelly L, Madhani M, Hobbs AJ; Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) Knock-out Mice; *The Journal of biological chemistry* Vol 280, pp 10040-10046, 2005.

[135] Schneider J, Friderichs E, Heintze K, Flohé L; Effects of recombinant human superoxide dismutase on increased lung vascular permeability and respiratory disorder in endotoxemic rats; *Circulatory Shock* Vol 30, pp 97-106, 1990.

[136] Theuer CJ, Wilson MA, Steeb GD, Garrison RN; Microvascular vasoconstriction and mucosal hypoperfusion of the rat small intestine during bacteremia; *Circulatory Shock* Vol 40, pp 61-68, 1993.

[137] Cady LD Jr, Weil MH, Afifi AA, Michaels SF, Liu VY, Shubin H; Quantitation of severity of critical illness with special reference to blood lactate; *Critical Care Medicine* Vol 1, pp 75-80, 1973.

[138] Bohlen HG; Intestinal tissue PO₂ and microvascular responses during glucose exposure; *American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology* Vol 238, pp 164-171, 1980.

10 Erläuternder Anhang

Die Modulation der Thyrosinphosphorylierung und deren Auswirkungen auf die vaskuläre Hyporeaktivität in septischen Zuständen wurden im Labor der Forschungsabteilung der Klinik für Anästhesiologie, Anästhesie, Intensiv-, Notfall- und Schmerzmedizin der Universitätsmedizin Greifswald unter der Leitung von Dragan Pavlovic über mehrere Jahre hinweg untersucht. Grundlage der vorliegenden Arbeit sind in Teilen Erkenntnisse dieser Arbeiten:

- Henning Erber, Christian Lehmann, Matthias Gründling, Thomas Hachenberg, Taras Usichenko, Konrad Meissner, Michael Wendt and Dragan Pavlovic; Lipopolysaccharide induced hyposensitivity of rat aorta in vitro is reversed by potassium channels blocking agents and orthovanadate; 16th WCA, CD Room: S166, Published by WFSA, Paris, 2004.
- Henning Erber, Christian Lehmann, Matthias Gründling, Michael Wendt, Dragan Pavlovic; In- vitro- Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit der LPS-induzierten vaskulären Hyporeaktivität; Conference Paper Journal für Anästhesie und Intensivbehandlung Vol 2, p154, 2004.
- Henning Erber, Christian Lehmann, Matthias Gruending, Thomas Wenzel, Albrecht Stier, Michael Wendt and Dragan Pavlovic; Reversal of lipopolysaccharide induced hyporeactivity in rat aorta and human mesenteric artery in vitro by orthovanadate; Critical Care Vol 9, pp 61-62, 2005.
- Michael Manthey, Christian Lehmann, Henning Erber, Matthias Gruending, Konrad Meissner, Taras Usichenko, Sabine Will, Albrecht Stier, Michael Wendt, and Dragan Pavlovic; Effects of tyrosine kinase or phosphatase inhibition in LPS induced vascular hyporeactivity; (ESICEM 2006) 19th Annual Congress, Barcelona, Spain, 24-27 September 2006.
- Dragan Pavlovic, Henning Erber, Michael Manthey, Thomas Wenzel, Albrecht Stier, Michael Wendt, Christian Lehmann; Tyrosine phosphorylation modulates vascular response to lipopolysaccharide; Conference Intensiv Medizin und Notfall Medizin (DIVI) Vol 43, p 51, 2006.
- D. Pavlovic, Timo Hammann, Oliver Adamek, Henning Erber, Michael Manthey, Thomas Wenzel, Albrecht Stier, Micheal Wendt, Christian Lehmann; Tyrosine phosphorylation modulates rat vascular response to experimental endotoxemia in vivo

and in vitro; Deutsche Gesellschaft für klinische Mikrozirkulation und Hämorheologie (DGKMH), Teltow, 2006.

- Dragan Pavlovic, Timo Hammann, Oliver Adamek, Henning Erber, Michael Manthey, Thomas Wenzel, Albrecht Stier, Michael Wendt, Christian Lehmann; Tyrosine phosphorylation modulates rat vascular response to experimental endotoxemia in vivo and in vitro; International Symposium on Intensive Care ad Emergency Medicine (ISICEM), Brüssel, 2007.
- Dragan Pavlovic, Henning Erber, Michael Manthey, Christian Lehmann, Matthias Gruending, Thomas Wenzel, Taras Usichenko, Albrecht Stier, and Michael Wendt; Tyrosine phosphorylation modulates lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity in vitro in rat aorta and human mesenteric artery; Journal of Muscle Research and Cell Motility Vol 27, p 538, 2007.
- Christian Lehmann, Timo Hammann, Oliver Adamek, Henning Erber, Michael Manthey, Thomas Wenzel, Albrecht Stier, Michael Wendt, and Dragan Pavlovic; Tyrosine phosphorylation modulates rat vascular response to experimental endotoxemia in vivo and in vitro; Critical Care, Vol 11,p 6, 2007.