

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
(Direktor Univ.- Prof. Dr. med. Michael Wendt)  
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Thema: „Der Einfluss des C1-Esterase-Inhibitors auf die intestinale Mikrozirkulation unter  
Endotoxinämie im Tierexperiment“  
- eine intravitalmikroskopische Studie -

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2007

vorgelegt von:

Oskar Rückbeil  
geb. am: 10.07.1974  
in: Heidelberg

und

Carsten Hansen  
geb. am: 05.02.1970  
in: Friesoythe

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. Ch. Lehmann

2. Gutachter: Prof. Dr. Th. Hachenberg

3. Gutachter: Prof. Dr. D. Roskopf

Tag der Disputation: 11.07.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
<b>2. Theoretische Vorbetrachtung</b>	<b>7</b>
2.1 Sepsis (Epidemiologie und Definitionen)	7
2.2 Endotoxinämie	9
2.2.1 Lipopolysaccharid-Rezeptoren und Bindeproteine	10
2.2.1.1 Zelluläre und lösliche LPS-Rezeptoren	10
2.2.1.2 Die transmembranäre Signalkette	11
2.2.2 Weitere LPS-Rezeptoren	11
2.3 Humorale Aktivierung	12
2.3.1 Hämodynamik	12
2.3.2 Komplementsystem	12
2.3.3 Gerinnung	13
2.3.4 Kontaktsystem	13
2.3.5 Fibrinolyse und disseminierte intravasale Gerinnung	14
2.4 Endotheliale Reaktion	15
2.4.1 Vasoregulation und Hämodynamik	15
2.5 Leukozytäre Reaktion (primäre und sekundäre Mediatoren)	15
2.6 Leukozyten-Endothel-Interaktion	16
2.6.1 Regulation der Leukozyten-Endothel-Interaktion	17
2.6.2 Die Phasen der Leukozyten-Endothel-Interaktion	17
2.7 Folgen der Mediatorfreisetzung	17
2.8 Charakterisierung des C1-Esterase-Inhibitors (C1-INH)	18
2.8.1 Physiologische Wirkungen	18
2.8.2 C1-INH in der Sepsis	19
<b>3. Fragestellung</b>	<b>20</b>
<b>4. Material und Methode</b>	<b>21</b>
4.1 Tiermaterial	21
4.2 Gruppeneinteilung	21
4.3 Narkose und Monitoring	22
4.4 Operative Technik	23
4.5 Endotoxin-Modell	24

4.6 Intravitalmikroskopie	25
4.6.1 Bestimmung der endothelialen Permeabilität	27
4.6.2 Leukozyten-Endothel-Interaktion	27
4.6.2.1 Temporär adhärenente Leukozyten	27
4.6.2.2 Permanent adhärenente Leukozyten	28
4.6.3 Funktionelle Kapillardichte	28
4.7 Biochemische Parameter	29
4.7.1 Blutgasanalyse, Laktat und Hämatokrit	29
4.7.2 Blutbild	29
4.7.3 Zytokine: Tumor-Nekrose-Faktor-alpha und Interleukin-10	29
4.8 Statistik	29
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>31</b>
5.1 Ergebnisse der Submukosa-Muskularis-Mukosa-Studie	31
5.1.1 Vitalparameter	31
5.1.2 Blutgasanalyse und Hämatokrit	33
5.1.3 Beschreibung der Gefäßpopulationen	34
5.1.4 Funktionelle Kapillardichte	35
5.1.5 Leukozyten im peripheren Blut	37
5.1.6 Leukozyten-Endothel-Interaktion	37
5.2 Ergebnisse der Mesenterium-Studie	39
5.2.1 Vitalparameter	39
5.2.2 Laktat	41
5.2.3 Beschreibung der Gefäßpopulationen	41
5.2.4 FITC-Extravasation	42
5.3 Zytokine	43
5.3.1 Tumor-Nekrose-Faktor-alpha	43
5.3.2 Interleukin-10	44
<b>6. Diskussion</b>	<b>45</b>
6.1 Die Bedeutung und Relevanz des Versuchsmodells	45
6.2 Tiergewicht	46
6.3 Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck	47
6.4 Atemfrequenz, Blutgasanalyse und Laktat	48
6.5 Intestinale Mikrozirkulation	49
6.6 Leukozyten-Endothel-Interaktion	51
6.7 FITC-Extravasation	54

6.8 Zytokine	56
6.8.1 Tumor-Nekrose-Faktor-alpha	56
6.8.2 Interleukin-10	57
6.9 Klinische und tierexperimentell beschriebene C1-Esterase-Inhibitor-Wirkungen	60
<b>7. Zusammenfassung</b>	<b>63</b>
<b>8. Literaturverzeichnis</b>	<b>65</b>
<b>9. Erklärung über Einzelanteile</b>	<b>78</b>
<b>10. Eigenständigkeitserklärung</b>	<b>79</b>
<b>11. Lebensläufe</b>	<b>80</b>
11.1 Lebenslauf Oskar Rückbeil	80
11.2 Lebenslauf Carsten Hansen	82
<b>12. Danksagung</b>	<b>84</b>

## 1. Einleitung

Bereits Hippokrates beschrieb 400 v.Chr. septische Erkrankungen. Ibn Sina benannte 1000 n. Chr. eine „Fäulnis des Blutes“ als Ursache eines anhaltenden Fiebers. Boerhaave sah um 1751 den Auslöser hierfür in der Umwelt des Menschen. Er nahm an, dass eine schädliche Substanz über die Luft in Wunden des Patienten gelangt und so eine systemische Erkrankung bewirkt. Durch mühevollen und intensive Untersuchungen der Zusammenhänge zwischen den verunreinigten Händen der Ärzte und dem Kindbettfieber betrat I.P.Semmelweis in Wien unbewußt als erster das Feld der Antisepsis. Am 15. Mai 1847 läßt er an den Toren seiner Klinik die Verordnung zur obligaten Händedesinfektion mit Chlorwasser anschlagen. Die wissenschaftliche Gesellschaft beachtete diese sensationelle Neuerung kaum. In den folgenden Jahren erfuhr Semmelweis für sein Vorgehen in der medizinischen Welt in tragischer Weise Ablehnung und Anfeindung. Im Jahre 1860 brachte er dennoch seine Erkenntnisse erstmals zu Papier.

Im Jahre 1867 begann in Dublin für J. Lister gegen große Vorbehalte der Kampf um die Antisepsis. Das durch R. Koch und L. Pasteur eingeläutete Zeitalter der modernen Mikrobiologie verhilft der Antisepsis und Asepsis schliesslich zum Durchbruch. Damit hatten sich die Pforten für eine sicherere chirurgische Therapie weit geöffnet.

1892 schuf R.Pfeiffer während seiner Untersuchungen über das Cholera Gift den Begriff Endotoxin. 60 Jahre später identifizierte A. Boivin die Lipopolysaccharidoberfläche gramnegativer Bakterien als Noxe in der gramnegativen Sepsis.

Septische Krankheitsbilder sind also lange bekannt und das durch sie verursachte Leid war vor allem in der Vorantibiotikaära kaum zu lindern. Dies sollte sich mit Flemings Entdeckung des Penizillins im Jahre 1928 ändern. Der Oxford-Kreis um Florey, Abraham und Chaine nahm sich der genaueren Erforschung an, um 1940 die ersten therapeutischen Schritte zu wagen.

L. Jacob beschrieb 1909 als erster die septische Allgemeininfektion durch das Bakterium E.coli. Die historische Grundlage heutiger Definitionen der Sepsis liefern Schottmüllers Erkenntnisse aus dem Jahr 1914. Er schuf die erste infektiologisch-klinische Definition der Sepsis „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, daß durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“<sup>1</sup>. Neuere Zahlen belegen die auch heute noch häufig unterschätzte Bedeutung der Sepsis im klinischen Alltag. Mit 154.000 Fällen pro Jahr liegt die Inzidenz der Sepsis höher als die des akuten Myokardinfarktes. In Deutschland versterben ca. 60.000 Menschen pro Jahr an der Sepsis und ihren Folgen. Damit ist die Sepsis die dritthäufigste Todesursache<sup>2</sup>.

Neben der chirurgischen Herdsanierung, der antibiotischen und supportiven Therapie hat sich der wissenschaftliche Fokus durch die neueren pathophysiologischen Erkenntnisse zunehmend auf das pro- und antiinflammatorische Geschehen gerichtet.

In klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die exogene Zufuhr von C1-Esterase-Inhibitor einen protektiven Einfluss auf die gestörte endotheliale Integrität und hämodynamische Parameter hat.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis dieser Prozesse hinsichtlich der Wirkung exogen zugeführten C1-Esterase-Inhibitors auf die intestinale Mikrozirkulation, biochemische Parameter und die Hämodynamik liefern. In einem Endotoxinmodell wurden hierzu Vitalparameter sowie biochemische und intravitalmikroskopische Befunde erhoben.

## **2. Theoretische Vorbetrachtung**

### **2.1 Sepsis (Epidemiologie und Definitionen)**

Sepsis und septischer Schock stellen die Hauptursache für die Mortalität auf operativen Intensivstationen dar. Kurative Verfahren sind die chirurgische Herdsanierung und die antibiotische Therapie. Die Sepsis weist eine steigende Inzidenz auf<sup>3,4,5</sup>. Dies ist nur zum Teil auf die Folgen der Weiterentwicklung der Intensivmedizin zurückzuführen. Die steigende Inzidenz ist vor allem Folge demographischer Veränderungen, des vermehrten Einsatzes von Breitspektrum-Antibiotika und Immunsuppressiva sowie erweiterter invasiver Massnahmen. Die bis vor 10 Jahren noch relativ konstant hohe sepsisassoziierte Letalität konnte erfreulicherweise in der letzten Dekade gesenkt werden (56% 1993 vs. 35% 2001)<sup>5</sup> und belegt damit eine verbesserte intensivmedizinische Betreuung der betroffenen Patienten. Neuere Daten belegen diese Entwicklung<sup>6,7</sup>. Aussagekräftige Längsschnittvergleiche lassen sich jedoch nur anhand von Erhebungen über Bakteriämien machen<sup>8</sup>. So zeigen größere Studien zur Epidemiologie der Sepsis eine nach wie vor hohe Mortalität. In einer internationalen Multicenter-Studie an der sich 8 Länder beteiligten wurden von 1997 bis 1998 auf 28 Intensivstationen insgesamt 14364 Patienten untersucht. Bei Aufnahme hatten davon 3034 Patienten eine Infektion, während 1581 sie im Laufe des Krankenhausaufenthalts erwarben. Von diesen Patienten wurden 82% einem septischen Krankheitsbild zugeordnet (28% Sepsis, 24% severe Sepsis, 30% septischer Schock). Die Mortalität auf der Intensivstation betrug für Patienten mit nosokomialer Infektion und bereits bestehender Infektion bei Aufnahme insgesamt 53,6%. Für eine Sepsis, die nach ACCP(s.unten)-Kriterien gewertet werden konnte und auf Intensivstation erworben wurde betrug die Mortalität 50%. Bei insgesamt 3021 mikrobiologisch objektivierten Infektionen ergaben 2027 (67%) Infektionen einen gramnegativen Erregernachweis. Der Anteil gramnegativer Infektionen von den ambulant erworbenen Infektionen betrug 35,3%, von den nosokomial erworbenen 47,9% und von den auf

Intensivstation erworbenen 49,2%, so dass für diese Studie von einem Überwiegen der gramnegativen Infektionen im nosokomialen Bereich gesprochen werden kann<sup>9</sup>. Ältere Studien ergaben einen Anteil der gramnegativen Infektionen von 35, 42 und 45% mit der Beobachtung einer Zunahme des Anteils grampositiver Infektionen von 39, 51 und 55%<sup>3, 8, 10</sup>.

Durch den uneinheitlichen Gebrauch des Begriffes Sepsis (Infektion, Bakteriämie, Septikämie), war es lange Zeit schwer, epidemiologische Aussagen zu treffen und vergleichbare Untersuchungen durchzuführen. Daher forderte Bone im Jahre 1991 vergleichbare Definitionen. Auf der Konsensus Konferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) 1991 in Northbrook wurde die erste international einheitliche Definition eingeführt<sup>4</sup>.

Aus der Erkenntnis, dass klinische Zustände vergleichbar mit denen der Sepsis auch ohne eine Infektion hervorgerufen werden können, entstand der Begriff des „*systemic inflammatory response syndrome*“ (SIRS). Dieses Syndrom beschreibt den inflammatorischen Prozess unabhängig von dessen Ursache. Von den folgenden diagnostischen Kriterien müssen mindestens 2 erfüllt sein, wobei sie einer akuten, aber nicht isolierten Veränderung des Zustandes, der nicht auf andere bekannte Ursachen zurückzuführen ist (z.B.

Chemotherapie/Leukopenie), entsprechen müssen:

Temperatur > 38°C oder < 36 ° C

Herzfrequenz > 90/min

Atemfrequenz > 20/min oder  $P_aCO_2 < 4,3 \text{ kPa}$  (< 32 mmHg)

Leukozyten > 12.000/ $\mu\text{l}$  oder < 4.000/ $\mu\text{l}$  bzw. > 10% unreife Leukozyten.

Infektion ist definiert als die entzündliche Reaktion auf das Eindringen oder die Anwesenheit von Mikroorganismen in sonst sterilem Gewebe.

Ein manifestes SIRS mit vorliegender Infektion definiert die *Sepsis*.

Sepsisinduzierte Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotension (z.B. Laktat-Azidose, Oligurie, mentale Veränderungen) ist definiert als *severe sepsis*. Hypotension wird hierbei definiert durch einen systolischen Blutdruck < 90 mmHg oder einen Blutdruck-Abfall > 40 mmHg, der nicht durch andere blutdrucksenkende Ereignisse hervorgerufen wurde.

Der *septische Schock* ist definiert durch septische Hypotension mit Perfusionsstörungen trotz adäquater Flüssigkeitszufuhr. Darunter fallen auch Patienten mit Perfusionsstörungen, die unter vasopressiver/positiv inotroper Medikation keine Hypotension aufweisen.

Zusätzlich wurde auf der Konsensus Konferenz 1991 der Begriff des Multiorganversagens (MOV) durch den Begriff des Multi-Organ-Dysfunktions-Syndroms (MODS) ersetzt.



Es beschreibt das Vorhandensein einer soweit veränderten Organfunktion, dass die Homöostase des akut kranken Patienten ohne Intervention nicht aufrecht erhalten werden kann. Durch den Begriff Syndrom wird auf die sich verändernden Symptome im Verlauf und die Dynamik des Geschehens hingewiesen. Bei einem frühauftretenden MODS mit klarem Ursache-Wirkungszusammenhang spricht man vom primären MODS. Kommt es im Verlauf eines SIRS oder einer Sepsis zum MODS durch eine überschüssige inflammatorische Reaktion des Körpers, spricht man von einem sekundären MODS.

Um Aussagen zur Prognose eines Kollektivs zu machen, sind Risikoabschätzungen und Gruppenbildung vor und während der Therapie unerlässlich. Diese Tatsache führte dazu, dass die ACCP/SCCM-Definitionen in vielen klinischen Untersuchungen erweitert oder Kriterien nicht eingehalten werden. Neuere Untersuchungen stellen in Frage, ob sich die ACCP/SCCM-Definitionen für die Diagnostik im klinischen Alltag von Nutzen sind <sup>11</sup>. So wurde in einer weiteren Konsensuskonferenz im Jahre 2001 das PIRO-Konzept entwickelt <sup>12</sup>. Dabei geht es weniger um die eigentliche Charakterisierung der Krankheitsbilder nach den SIRS-Kriterien, als vielmehr um die Beurteilung des Schweregrades. Das Klassifikationsschema berücksichtigt dabei die Prädisposition der Patienten, die Natur der Erkrankung, die Ausprägung der Wirtsantwort und den Schweregrad der Organdysfunktion.

## **2.2 Endotoxinämie**

Endotoxine sind Lipopolysaccharide (LPS) der äusseren Membran der Zellwand gramnegativer Bakterien. Sie liegen einer Phospholipidschicht auf, unter welcher sich die einschichtige Mureinschicht befindet.

Lipopolysaccharide lassen sich von aussen nach innen in drei makromolekulare Komponenten unterteilen: Das O-Antigen der Oberfläche besteht aus maximal 20 Hexosemolekülen und ist für die Hydrophilie, den Serotypus und Resistenzen des Bakteriums verantwortlich. Das Core- oder Kernpolysaccharid besteht aussen aus Galaktose und N-Acetyl-Glucosamin, während der innere Teil einen LPS-spezifischen Zucker, das Keto-desoxy-oktonat aufweist, über den das Kernpolysaccharid mit der dritten Komponente, dem Lipid-A des LPS verbunden ist. Lipid-A ist der toxische Anteil des LPS und der wesentliche Virulenzfaktor. Die Inflammatorischen LPS-Wirkungen finden über die Antigeneigenschaft dieses Lipids statt. Daneben ist es Membrananker und übernimmt Barrierefunktionen.

Ins Milieu freigesetzt werden Lipopolysaccharide von sich vermehrenden oder absterbenden Bakterien in Form von Vesikeln <sup>1, 13</sup>.

Neben der Einschwemmung aus einem septischen Fokus, kann LPS auch endogen via Translokation von Bakterien aus alterierten Darmabschnitten die Blutbahn erreichen <sup>14-17</sup>.

Dies unterstreicht die Bedeutung des Intestinums in der Pathogenese der Sepsis. Einerseits kommt es zur Toxineinschwemmung, andererseits unabhängig davon zur Mediatorfreisetzung in der intestinalen Mikrozirkulation. Damit gilt der Darm als Trigger der hämodynamischen Prozesse im Verlauf der Sepsis und des MODS.

Im Rahmen einer Endotoxinämie kommt es auf humoraler Ebene u.a. zur Aktivierung des Gerinnungs-Fibrinolyse-Systems, des Kontakt-Systems und des Komplementsystems. Gleichzeitig wird neben der humoralen die zelluläre Ebene aktiviert. Dabei beeinflussen sich auf beiden Ebenen die Systeme sowie die Ebenen untereinander.

### **2.2.1 Lipopolysaccharid-Rezeptoren und Bindeproteine**

Lipopolysaccharid wird von membranständigen und löslichen Rezeptoren und Proteinen gebunden. Eine zentrale Rolle in der Vermittlung LPS-induzierter Effekte spielt der CD 14-Rezeptor. Zellen die den mCD 14-Rezeptor (myeloide Zellen) aufweisen, werden CD 14-positive Zellen genannt. Andere Zellen, wie z.B. das Endothel verfügen über Rezeptoren, die LPS über lösliche CD 14-Rezeptoren (sCD 14) binden. Letztere bezeichnet man als die CD 14-negativen Zellen.

#### **2.2.1.1 Zelluläre und lösliche LPS-Rezeptoren**

LPS bindet zunächst an das lösliche Lipopolysaccharid-binding-protein (LBP) im Plasma. LBP wird in Hepatozyten synthetisiert. Es erhöht die Affinität von LPS zu mCD 14-Rezeptoren um den Faktor 100 und erleichtert die LPS-Bindung an sCD 14-Rezeptoren. Dennoch wird es nicht obligat für die LPS-Antwort benötigt, da LPS in hohen Dosen auch ohne LBP wirkt <sup>13</sup>. Der LPS-LBP-Komplex wird von myeloiden Zellen wie Monozyten, polymorphkernigen Granulozyten und Makrophagen, die den mCD 14-Rezeptor tragen, gebunden. Da der mCD 14-Rezeptor ein Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) verankertes Protein (GPI-Anker) ohne signaltransduzierende Eigenschaften ist, war die transmembranäre Signalkette lange Zeit unklar. Diese Lücke im Verständnis der LPS induzierten Effekte konnte durch die Untersuchung der Toll-Rezeptoren geschlossen werden <sup>18</sup>. Durch eine membranständige Protease wird aus dem mCD 14-Rezeptor ein sCD 14-Rezeptor gespalten („shedding“), der 99% der gesamten CD 14- Rezeptorkonzentration im Serum ausmacht. Die löslichen sCD 14- Rezeptoren existieren in unterschiedlich schweren Formen und besitzen keinen GPI-Anker mehr. Diese sCD 14- Rezeptoren aktivieren nun „indirekt“ CD 14-negative Zellen wie Endothel- und Epithelzellen über deren Toll-Rezeptoren. Zugleich ist ein negativer feedback-Mechanismus des sCD 14- Rezeptors bekannt. Er führt auch zur Hemmung der CD 14-positiven Zellen und zur Neutralisierung von LPS <sup>12</sup>.

### 2.2.1.2 Die transmembranäre Signalkette

Von den bekannten Toll-like-Rezeptoren (TLR) spielt in der gramnegativen Infektion der TLR 4 die bedeutendste Rolle<sup>18, 19</sup>. Alle Toll-Rezeptoren sind transmembranäre Proteine bestehend aus einer extra- und intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne wird Leucin-rich-repeat (LRR) genannt. Die intrazelluläre Domäne ist homolog zum IL-1-Rezeptor und trägt daher den Namen TIR-(Toll receptor-interleukin-1 receptor)-Domäne.

An der Zelloberfläche befindet sich ein weiteres Protein MD-2. Es liegt benachbart zum TLR, und erhöht dessen Bindungsaktivität für CD 14. Experimente von Shimazu u. Fitzgerald zeigten eine höhere NF(nuclear factor)- $\kappa$ B-Aktivierung unter Stimulation des MD-2 Proteins.

Wird LPS an CD 14 gebunden präsentiert, kommt es zur Aktivierung des CD 14-TLR 4-MD-2-Komplexes. Dies führt zur Rekrutierung des Adapterproteins MyD88 an der TIR-Domäne des TLR. MyD88 besitzt eine weitere Bindungsstelle für die IL-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK-1). Durch Autophosphorylierung dissoziiert diese aus dem MyD88-Protein und aktiviert so den TNF receptor-associated factor-6 (TRAF-6). Da MyD88-defiziente Mäuse eine verspätete NF- $\kappa$ B-Antwort auf LPS-Stimulation und eine veränderte TNF- $\alpha$ -Produktion, sowie Schockresistenz zeigten<sup>20</sup>, galt es alternative Wege neben dem über MyD88 ablaufenden zu finden. Dies gelang Fitzgerald 2001<sup>21</sup> zeitgleich mit Horng<sup>22</sup>. Fitzgerald beschreibt ein MyD88-adapter-like-protein (Mal), welches bei Horng unter dem Namen TIRAP (TIR-domain-containing-adapter-protein) veröffentlicht wurde. Während MyD88 über IRAK 1 und 2 TRAF-6 aktivieren kann, wurde für Mal gezeigt, dass es nur IRAK-2 aktiviert und möglicherweise zusätzlich über eine RNA-aktivierte Protein Kinase (PKR) TRAF-6 aktiviert<sup>23</sup>.

Nach der Autophosphorylierung von TRAF-6 aktiviert er die NF- $\kappa$ B-inducing-Kinase (NIK) und die I $\kappa$ B-Kinase (IKK). Das inhibitorische Protein I $\kappa$ B wird phosphoryliert, so dass es zur Translokation von NF- $\kappa$ B in den Nukleus kommt und dort zur Transkription diverser Gene (Zytokine IL-1,6 und 8, sowie E-Selektin, intercellular adhesion molecule (ICAM-1), Vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) und tissue factor (TF)<sup>13</sup>.

### 2.2.2 Weitere LPS-Bindeproteine

Der LBP-LPS-Komplex wird außerdem an high-density-lipoprotein (HDL) gebunden, was zu einer Abschwächung der LPS-Reaktion führt. Ferner konkurriert das von polymorphkernigen Granulozyten synthetisierte bacterial permeability/increasing protein (BPI) mit LBP um die LPS-Bindung. An BPI gebundenes LPS wirkt toxisch auf Bakterien, reduziert die Komplementaktivierung und Zytokinfreisetzung.

Weitere Bindeproteine, die in erster Linie als Transportproteine dienen, sind: LDL, Albumin, Transferrin und die Komplementkomponenten C1 und C3.

## **2.3 Humorale Aktivierung und Hämodynamik**

Zellen, an die LPS gebunden wurde, setzen über die beschriebenen Signalwege Zytokine frei (s.oben). Diese führen u.a. zur Aktivierung des Komplementsystems, des Kontakt-Systems sowie der Gerinnung. Es kommt jedoch auch zur direkten Aktivierung dieser Systeme durch LPS (s.unten). Besonders eine Aktivierung des Komplementsystems führt auf diese Weise dann wiederum zur Zytokinfreisetzung. Zusammen mit den Produkten des Kontakt-Systems kommt es zur Störung der Homöostase.

### **2.3.1 Hämodynamik**

Humorale und zelluläre Aktivierung (s.unten) bewirken im Verlauf der Sepsis charakteristische Veränderungen der Hämodynamik:

Zunächst fällt der Totale Periphere Widerstand (TPR), die Mikrozirkulation wird beeinträchtigt und es bilden sich vermehrt Gerinnungsprodukte bis hin zur Disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG) (s.unten). In der hyperdynamen Reaktion ist das Herzzeitvolumen (CI) gesteigert<sup>24, 25</sup>. Durch massive Vasodilatation, bei ansteigendem TPR regionaler Kreisläufe, kommt es im Verlauf bei fallendem MAP mit begleitender Tachykardie und abnehmendem CI zum Schock. Die Hälfte der sepsisbedingten Todesfälle ist auf diese hypodynamie Reaktion zurückzuführen, während die andere Hälfte an den Folgen der Mikrozirkulationsstörungen im MODS verstirbt<sup>1</sup>. Überschüssende Komplement- und Gerinnungsaktivierung, sowie die Aktivierung des Kontaktphasensystems tragen hierzu entscheidend bei<sup>26</sup>.

### **2.3.2 Komplementsystem**

Es werden 3 Wege in der Aktivierung des Komplementsystems unterschieden. Alle 3 münden in der Bildung des Membran-Angriff-Komplexes (auch: membrane attack complex; bestehend aus den Komplementkomponenten C5b-C9), der zur Lyse betroffener Zellen führt.

Der klassische Weg wird initialisiert sobald Antigen-gebundenes IgM oder IgG an die Komplementkomponente C1 bindet. Dieser Weg kann auch durch den Gerinnungsfaktor XIIa initialisiert werden<sup>26</sup>. Aktiviertes C1 stellt den Ausgangspunkt der Komplementaktivierung über den klassischen Weg dar.

Der alternative Weg, initialisiert durch mikrobielle Oberflächen und somit von Bedeutung in der Endotoxinämie, beginnt mit der Aktivierung des Komplementfaktors C3<sup>27</sup>. Der dritte Aktivierungsweg, auch Mannan-binding-lectin-(MBL) pathway genannt, wird ebenfalls durch mikrobielle Polysaccharide aktiviert. MBL seinerseits aktiviert die MBL-Assoziierten-Serin-Proteinasen 1 und 2 (=MASP), die dann wiederum über die Komplementkomponente C4 den klassischen Weg aktivieren. Aktiviertes C4a entsteht auf dem klassischen Weg. Aktiviertes C3a und C5a entstehen auf der gemeinsamen Endstrecke. Diese 3 aktivierten Komplementkomponenten sind als Anaphylatoxine bekannt<sup>28</sup>. Sie führen zur Kontraktion glatter

Muskelzellen, erhöhter Kapillarpermeabilität, Mastzell-Chemotaxis und Histaminliberation, sowie Neutrophilen-Chemotaxis (IL-1 u. 6, TNF- $\alpha$ ) und Degranulation. Desweiteren führen sie zur Thrombozytenaktivierung.

Antikörperbedingte Komplementaktivierung und C5a führen zu vermehrter Freisetzung von tissue factor (TF) (s. 2.3.3.)<sup>29</sup>.

Leukozyten, die die Komplementkomponenten C3b und C4b gebunden haben, weisen eine niedrigere Aktivierungsschwelle durch Antigene auf<sup>30</sup>.

### **2.3.3 Gerinnung**

Es wird angenommen, dass die Aktivierung der Gerinnung im Zusammenhang mit inflammatorischen Ereignissen im Verlaufe der Evolution einen vorteilhaften Synergismus darstellte. Lokale Infektionen konnten so eingegrenzt und eine weitere Bakterieninvasion vermieden werden. Klinisch bereitet dieser Synergismus jedoch durch die häufig bei septischen Patienten auftretende disseminierte intravasale Gerinnung (DIG) und deren Folgen (Blutungen, MODS) erhebliche Probleme<sup>31</sup>.

Monozyten, polymorphkernige Granulozyten und Endothelzellen setzen unter Zytokinstimulation TF (tissue factor oder Gewebefaktor = Gewebsthromboplastin= F III) frei<sup>32</sup>. TF bildet in Anwesenheit von Calcium und Phospholipiden einen katalytischen Komplex mit dem Gerinnungsfaktor VII und aktiviert so die extrinsische Gerinnung. Faktor VIIa aktiviert wiederum das Proenzym (Zymogen) Faktor X zur Endopeptidase Xa, die ihrerseits einen Komplex mit Faktor V bildet und so Prothrombin in Thrombin überführt. Thrombin überführt Fibrinogen in Fibrinmonomere, die dann durch F XIII kovalent zu einem Gerinnsel vernetzt werden. Gleichzeitig führt der initiale VIIa-Komplex zur Aktivierung von Faktor IX, der mit dem Ko-Faktor VIIIa ebenfalls Faktor X aktiviert. Diese Amplifizierung über die intrinsische Gerinnung ist notwendig, um die antikoagulatorische Gegenregulation durch tissue factor pathway inhibitor (TFPI s. 2.3.5) zu überwinden. Thrombin seinerseits aktiviert Faktor XI, V und VIII. Es kommt zu einer weiteren Amplifizierung der Gerinnung auf der Endstrecke (s. 2.3.4)<sup>33</sup>.

### **2.3.4 Kontaktsystem**

F XII, Präkallikrein (Fletcher-Faktor), high molecular weight kininogen (HMWK = Fitzgerald-Faktor oder HK) und F XI werden unter dem Namen Kontaktsystem zusammengefasst, da sie negative Oberflächenladungen benötigen, um aktiviert zu werden. Präkallikrein wird zu Kallikrein aktiviert, wenn es HK an Endothelzellen bindet. Kallikrein ist der Hauptaktivator des Hageman-Faktors (F XII). Der Hageman-Faktor kann auch direkt durch LPS aktiviert werden<sup>34</sup>. Kallikrein seinerseits ist ein vielseitig aktives Enzym: Es führt zu erhöhter Superoxidproduktion durch Granulozyten, zur Aktivierung der Fibrinolyse und schliesslich durch Spaltung von HK zur Bildung von Bradykinin. Letzteres erhöht ebenfalls die Superoxidproduktion, führt zur

Freisetzung von t-PA (s. 2.3.2, Stickstoffmonoxid (NO) und auf verschiedenen Wegen zu verminderter Thrombozytenaktivierung. Der bedeutendste Effekt des Bradykinins ist jedoch die Vasodilatation. Sie führt zum Schock und beeinflusst somit die Mikrozirkulation nachteilig. F XIIa initialisiert über F XI die intrinsische Gerinnung (IX) und aktiviert die C1-Komponente des klassischen Komplement-Weges<sup>26</sup>. Somit kann F XI als Schnittstelle zwischen Gerinnung und Kontaktsystem betrachtet werden, während F XIIa die Verbindung zum Komplementsystem herstellt (s. 2.3.2).

### **2.3.5 Fibrinolyse und disseminierte intravasale Gerinnung**

Die Aktivierung der Gerinnung geht stets mit einer Aktivierung der Fibrinolyse einher. Kommt es zum Ungleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorischen Systemen, entwickeln sich bedrohliche Zustände, wie z.B. die Disseminierte Intravasale Gerinnung (DIG) oder Verbrauchskoagulopathie. Infektionen gehören zu den häufigsten Ursachen dieses Syndroms<sup>35</sup>. Dabei führen v.a. gramnegative Infektionen zu schweren Komplikationen wie Extremitäten-Gangrän oder Nebennierennekrose.

Gewebeplasminogenaktivator (t-PA) und urokinase like PA (u-PA) spalten Plasminogen zu Plasmin. Plasmin steigert den Abbau von Fibrinogen und bereits vernetztem Fibrin, Faktor V, VIII, IX, XI der Gerinnung und einiger Hormone.

Kallikrein stimuliert den u-PA und kann auch direkt wie die Faktoren XIIa und XIa Plasminogen spalten<sup>36</sup>.

Der Zustand einer akuten DIG äussert sich durch hohe Blutungsneigung und den Verbrauch antikoagulatorischer Proteine (AT III, Protein C u.S.). Subakut verlaufende Formen der DIG werden eher durch Verbrauch von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren geprägt, während chronische Formen eine verminderte Fibrinolyse zeigen. Verminderte Fibrinolyse durch verminderten t-PA findet man z.B. durch Zytokinfreisetzung (IL-1). Zytokine führen auch dazu, dass vermehrt Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI-1) gebildet wird und die Thrombomodulinsynthese sinkt.

In jedem dieser Stadien kommt es jedoch zu intravasalen Thrombosierungen.

Eine weitere endogene Hemmung der Fibrinolyse findet durch tissue factor pathway inhibitor (TFPI) statt. Dieses vom Endothel gebildete Glykoprotein bildet einen Komplex mit TF, Faktor VIIa und Xa und blockiert auf diese Weise die Thrombingeneration<sup>37</sup>. Kommt das System Gerinnung-Fibrinolyse ins Ungleichgewicht, führt die permanente Thrombingeneration zur Selektinstimulation, zur vermehrten Bildung von PAF (s.2.4.1) und somit zur Verstärkung dieser Imbalance und des inflammatorischen Geschehens<sup>38</sup>.

## **2.4 Endotheliale Reaktion**

Das Endothel wird heute als ein hochdynamisches, heterogenes Organ verstanden<sup>39</sup>. Es spielt eine zentrale Rolle in der Angiogenese und der Regulation des Vasotonus unter physiologischen und pathologischen Bedingungen. Die Gerinnung sowie die Interaktion mit Blutzellen wird massgeblich durch seine Eigenschaften geprägt.

### **2.4.1 Vasoregulation und Hämodynamik**

Regulatorisch werden durch das Endothel sowohl Vasodilatoren (NO, Prostacyclin = PGI-2) wie auch Vasokonstriktoren (Endothelin-1= ET-1, Plättchen-aktivierender-Faktor PAF) rezeptorvermittelt gebildet. Sie sichern durch die Regulation des Vasotonus, die Beeinflussung des Plättchen-Aggregations- und des Leukozyten-Adhärenzverhaltens sowie der Zellsynthese glatter Muskelzellen den physiologischen Zustand der Gewebe.

NO wird konstitutiv durch die endotheliale Stickstoffsynthetase (eNOS) gebildet, während eine induzierbare NO-Synthetase auf Änderungen im Milieu, hervorgerufen durch Zytokine oder Endotoxinämie, reagiert<sup>40</sup>. Letztere trägt entscheidend zur Pathophysiologie der Sepsis bei.

Während einerseits direkte und hämodynamische Schädigungen durch NO angenommen werden<sup>40</sup>, gibt es in Tiermodellen<sup>41</sup> und klinischen Anwendungen (ARDS) Hinweise auf eine reduzierte Leukozytenadhärenz und Plasmaextravasation durch NO<sup>42, 43</sup>. Andere Untersuchungen zeigen, dass durch Inhibitoren der NO-Freisetzung die Leukozytenadhärenz verstärkt wird<sup>44</sup>.

Endothelin-1 (ET-1) ist der stärkste bekannte Vasokonstriktor. Es wirkt in erster Linie über den ET-A-Rezeptor<sup>45</sup>. Im Tierexperiment führt es zu verminderter kapillärer Durchblutung, erhöhter Leukozyten-Endothel-Interaktion und vermehrter Plasmaextravasation. In diesen Arbeiten konnte durch Endothelin-Rezeptor-Blockade der Gewebeschaden reduziert werden<sup>45, 46</sup>.

Die Bildung von ET-1, PGI-2 und PAF ist gesteuert durch Veränderungen der unmittelbaren Umgebung der Endothelzelle wie z.B. shear-stress, Hypoxie, Ischämie.

PGI-2 und PAF weisen strukturell einige Ähnlichkeiten auf: Beide sind Lipide und intrazelluläre Signalmoleküle mit kurzer Halbwertszeit. Ihre Wirkung ist jedoch antagonistisch. PGI-2 wirkt als regulatorischer Vasodilatator und reduziert die Leukozytenadhärenz, während PAF im veränderten Milieu über P-Selektin zur Leukozytenadhärenz führt.

## **2.5 Leukozytäre Reaktion (primäre u. sekundäre Mediatoren)**

Durch LPS aktivierte Monozyten, Makrophagen und Granulozyten setzen primäre Mediatoren bzw. Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und IL-8 frei. Sie produzieren sekundäre bzw. finale Mediatoren wie Sauerstoffradikale (Superoxid, Hydroxyl), Proteasen (Elastase, Kollagenase, Kathepsin B) und sezernieren Lipidmediatoren (auch Eicosanoide oder

Arachidonsäurestoffwechselprodukte) wie Prostaglandine, Leukotriene und Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF).

## 2.6 Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI)

Um den komplexen Prozess der Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI) verständlich darzustellen, werden im folgenden drei daran beteiligte Gruppen abgehandelt. Im Anschluss daran wird gesondert auf die Regulation jeder Gruppe und deren Beteiligung an den Phasen der Adhäsion eingegangen.

- 1) E,P und L-Selektine und ihre Liganden (Glykoprotein/lipid-Kohlenhydrate)
- 2) leukozytäre  $\beta$ -Integrine und
- 3) ihre endothelialen Integrin-Bindungspartner (cellular adhesion molecules = CAM's) aus der Klasse der Immunglobuline.

Zu 1) Selektine:

Das leukozytäre L-Selektin (LECAM-1, LAM-1, Mel-14-antigen, gp90mel, Leu 8/TQ-1-Antigen, CD 62L) bindet an venöse, lymphatische Endothelien über deren GlyCAM-1 (glycosylation-dependent), MadCAM-1 (mucosal adressin) sowie CD 34-sialomucin-Rezeptoren. Daneben bindet es über leukozytäre Glykoproteine andere Leukozyten. Durch proteolytische Spaltung entsteht eine lösliche Form des L-Selektins, das wahrscheinlich der Begrenzung der L-Selektin-Adhäsion, ähnlich dem sCD 14-Rezeptor dient.

E-Selektin (ELAM-1; CD 62E) wird von Endothelzellen exprimiert. Es bindet Leukozyten über ein auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten reich vorhandenes Tetrasaccharid (sialyl Lewis X, auch an P-Selektin-Glykoprotein = PSGL-1 vorhanden), CD 66, L-Selektin und  $\beta$ -2-Integrine.

P-Selektin (PADGEM; GMP-140; CD 62P) wird von Thrombozyten ( $\alpha$ -Granula) und Endothelzellen (Weibel-Palade-Körper) präsentiert. Es bindet L-Selektin und PSGL-1 auf Leukozyten.

Zu 2) Leukozyten-Integrine:

Leukozyten-Integrine sind transmembranäre Proteine bestehend aus einer  $\alpha$  und  $\beta$ -Kette. Alle hier genannten Integrine sind  $\beta$ -Integrine, wobei zwei davon zum CD 11/CD18 (=  $\beta$ -2-Integrine)-Typ gehören. Im Einzelnen wird ihre Rolle in der LEI anhand ihrer 4 endothelialen Bindungspartner (CAM's) besprochen:

- ICAM-1 (CD 102) bindet die Integrine CD 11a/CD 18 (LFA-1 = lymphocyte function-associated) und CD 11b/CD 18 (Mac-1).
- ICAM-2 (CD 54) bindet ebenfalls an CD 11a/CD 18.
- VCAM (CD 106) bindet das  $\beta$ -1-Integrin CD 49d/CD 29 (VLA-4) das nicht auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird.



- MadCAM-1 bindet das  $\alpha$ -4- $\beta$ -7-Integrin, welches auch mit VCAM-1 interagieren kann. Ein weiteres wichtiges Adhäsionsmolekül ist das platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule (PECAM-1; CD 31). Es befindet sich auf Endothelien in den Interzellularräumen, wird aber auch von Thrombozyten, Monozyten und neutrophilen Granulozyten gebildet.

### **2.6.1 Regulation der Leukozyten-Endothel-Interaktion**

Durch LPS kommt es zu vermehrter Transkription von ICAM, VCAM und E-Selektin. Dieser Prozess scheint NF- $\kappa$ B gesteuert zu sein (s.oben).

Thrombin, Histamin, Komplementkomponenten und Sauerstoffradikale führen zur P-Selektinexpression.

Das CD 11b/CD 18-Integrin wird intrazellulär angehäuft und bei Stimulation durch TNF- $\alpha$ , C 5a oder Leukozytenbindung über E-Selektin vermehrt an der Zelloberfläche präsentiert. Ausserdem bewirken Konformationsänderungen der Integrine unter Stimulation eine erhöhte Affinität zu ihren Liganden.

### **2.6.2 Die Phasen der Leukozyten-Endothel-Interaktion**

P-Selektin in Interaktion mit PSGL-1 der Leukozyten bewirkt die lockere, erste Adhärenz, das sogenannte „rolling“ der Leukozyten in postkapillären Venolen<sup>47</sup>. Ebenfalls daran beteiligt ist L-Selektin. E-Selektin scheint eher ein spät nach Aktivierung einsetzendes „rolling“ zu vermitteln. Das „rolling“ führt zu Quervernetzung der Selektinliganden auf den Leukozyten, was eine Aktivierung der Integrine hervorruft. Darüber hinaus werden die Integrine durch Zytokine und Komplementaktivierung hochreguliert. Sie vermitteln die feste Adhärenz („sticking“) von Leukozyten und Endothel.

Letzter Schritt auf dem Weg ins alterierte Gewebe ist die Migration. Diesen Prozess vermittelt u.a. das an den Interzellularspalten gelegene PECAM<sup>48</sup>. Es handelt sich hierbei um elektronen- und lichtmikroskopisch gesicherte „parazelluläre Diapedese“<sup>49</sup>, die von der ebenfalls bekannten transzellulären Migration abzugrenzen ist. An diesem Prozess scheinen Integrine ebenso beteiligt zu sein wie ICAM's. VCAM spielt eine Rolle bei der späten monozytären Infiltration des Gewebes.

Zusammenfassend sei darauf hingewiesen, dass alle drei Schritte ineinander übergreifen und in unterschiedlicher Weise, je nach Stimulus, zeitlichem Auftreten und Flussverhältnissen ablaufen können.

## **2.7 Folgen der Mediatorfreisetzung**

Durch die primären Mediatoren aktiviert, setzen Leukozyten und Endothelzellen eine Vielzahl an finalen Mediatoren frei und treten in Interaktion miteinander. Die finalen Mediatoren führen über Proteolyse der Basalmembranen und der Endothelzellen zum Verlust der endothelialen

Integrität. Sauerstoffradikale und Endothelin führen zu Vasokonstriktion. In der Mikrozirkulation kommt es zum sogenannten „mismatching“. Gewebe mit erhöhtem Sauerstoffbedarf werden durch Vasokonstriktion unterversorgt, während andernorts eine Hyperperfusion (NO, PGI-2) stattfindet. Die Aktivierung der Gerinnung über TF und die LEI, sowie Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion führt zu Mikrothrombosierungen und Emigration von Leukozyten. Das Kontaktsystem verstärkt die Produktion finaler Mediatoren via Kallikrein und Bradykinin.

#### Capillary leakage syndrom (CLS) oder Vascular leakage syndrom (VLS):

Das capillary leakage syndrom beschreibt den Zustand einer überschiessenden inflammatorischen Reaktion. Durch den Verlust der endothelialen Integrität und einer damit erhöhten Permeabilität kommt es zum intravasalen Flüssigkeits- und Eiweißverlust mit sukzessiver Ödembildung. Dabei wird durch vermehrte Leukozytenaktivierung eine vermehrte Emigration in die betroffenen Gewebe beobachtet. Ferner geht es einher mit arterieller Hypotension und generalisierter Vasodilatation. In der Literatur besteht ein Dissens darüber, ob das CLS in erster Linie durch die Leukozytenaktivierung verursacht wird, oder ob es durch diese nur verstärkt wird. Ebenfalls unklar ist, welche Rolle NO an der Erhöhung der endothelialen Permeabilität spielt.

Gesichert ist hingegen die Wirkung der Anaphylatoxine, die durch Kontraktion glatter Muskelzellen, Mastzell- und Neutrophilendegranulation und Chemotaxis die Kapillarpermeabilität erhöhen.

### **2.8 Charakterisierung des C1-Esterase-Inhibitors**

C1-Esterase-Inhibitor (im Folgenden: C1-INH) auch bekannt als  $\alpha$ 2-Neuramino-Glykoprotein, C1s-Inhibitor oder C1-Inaktivator gehört zur Gruppe der Serpine (Serin-Protease-Inhibitoren). Die molekulare Masse beträgt 105 kDa. Bei einer Plasmakonzentration von 1,7-2,0  $\mu$ mol/l entspricht dies ca. 240  $\mu$ g/ml (180-340) und damit einer Einheit (U).

Das stark glykosylierte Molekül ist einkettig, und besteht nur zu 51% aus Protein. Synthetisiert wird C1-INH von Hepatozyten, Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen u.a. Ausserdem findet man ihn in den  $\alpha$ -Granula der Thrombozyten.

Die Halbwertszeit beträgt ca. 28 h (bis 72 h bei Patienten mit hereditärem Angioödem). In Anwesenheit von Glykosaminoglykanen (GAG) sind diverse Wirkungen drastisch verstärkt<sup>36</sup>.

#### **2.8.1 Physiologische Wirkungen**

C1-INH ist der einzige bekannte Inhibitor der Komplementkomponenten C1r und C1s des klassischen Weges. Über 90% des Faktor XIIa werden durch ihn inaktiviert. Ferner hemmt er Kallikrein (50%), FXIa (50%)<sup>50</sup>, Plasmin und die MBL-assoziierten Serinproteinasen MASP 1 und 2.

Damit übernimmt er eine Schlüsselfunktion in der Regulation des Komplement-, Kontakt- und Gerinnungssystems.

C1-INH wird proteolytisch (iC1-INH) inaktiviert durch Neutrophilen-Elastase und Proteinasen, die nicht zu seinen Substraten zählen. Darüberhinaus wird er inaktiviert durch kovalente Komplexbildung mit Zielproteinasen<sup>36, 51</sup>.

### **2.8.2 C1-INH in der Sepsis**

In einer Untersuchung von Nuijens<sup>51</sup> wurde gezeigt, dass Patienten mit einer Sepsis im Vergleich zu gesunden Probanden eine signifikant verminderte Ratio von funktionellen C1-INH zu inaktiviertem C1-INH (FI = functional index = functional C1-INH/antigenic C1-INH) aufweisen. Dabei wurde der Hauptanteil des inaktivierten C1-INH als proteolytisch gespaltenes C1-INH-Antigen identifiziert. Bei 81% der Sepsispatienten zeigte sich dieses Phänomen, während erhöhte C1-INH-Komplekonzentrationen lediglich bei 21% gezeigt werden konnten. Die Konzentration an FXIIa-C1-INH-Komplexen war jedoch gegenüber den gesunden Probanden signifikant erhöht<sup>52</sup>.

Darüberhinaus konnten in dieser Studie prognostische Beobachtungen gemacht werden. Bei 27 Patienten die verstarben, fand sich ein signifikant erhöhter iC1-INH im Vergleich zu 21 Patienten, die überlebten. Bei Patienten mit extrem hohen iC1-INH-Konzentrationen (über 0,44  $\mu\text{M}$  = 5,5 fache des Normwertes) stieg die Mortalität auf 83% (gesamt 56%).

## 2. Fragestellung

Klinisch und tierexperimentell zeigt sich durch die Endotoxinämie eine Aktivierung des Gerinnungs-Fibrinolyse-Systems, des Kontakt- und des Komplementsystems. Dies führt zur einer veränderten Leukozyten-Endothelinteraktion, gestörter endothelialer Integrität und dem capillary leakage syndrome.

C1-Esterase-Inhibitor ist der einzige bekannte Inhibitor des Komplementsystems. Zusätzlich interagiert er mit dem Gerinnungs-Fibrinolyse und Kontaktsystem.

Wie beschrieben, wurde bei Sepsis-Patienten eine signifikant verminderte Konzentration des funktionellen C1-Esterase-Inhibitors festgestellt. Darüber hinaus zeigten klinische und tierexperimentelle Untersuchungen eine Verminderung des capillary leakage syndrome und eine hämodynamische Stabilisierung durch die exogene Zufuhr von C1-Esterase-Inhibitor. Die Aufgabenstellung dieser Arbeit besteht darin, folgende Fragen zu beantworten:

- 1) Welche hämodynamischen, biochemischen und intravitalmikroskopischen Veränderungen werden durch die in der Studie Submukosa-Muskularis-Mukosa (SMM-Studie) verwendete Endotoxindosis hervorgerufen?
- 2) Welche hämodynamischen, biochemischen und intravitalmikroskopischen Veränderungen werden durch die in der Studie Mesenterium (MES-Studie) verwendete Endotoxindosis hervorgerufen?
- 3) Welchen Einfluss hat der C1-Esterase-Inhibitor auf hämodynamische und biochemische Parameter in beiden Studien?
- 4) Welchen Einfluss hat der C1-Esterase-Inhibitor auf endotoxininduzierte Veränderungen der intestinalen Mikrozirkulation und der Leukozytenadhärenz (SMM-Studie)?
- 5) Welchen Einfluss hat der C1-Esterase-Inhibitor auf endotoxininduzierte Veränderungen der mesenterialen FITC-Plasmaextravasation (MES-Studie)?

## 4. Material und Methode

### 4.1 Tiermaterial

Es wurden 42 männliche Wistar Ratten (Gewicht 190-250 g) im Alter von 6-7 Wochen für diese Studie verwendet. Die Versuche wurden gemäß den Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen durchgeführt und von der zuständigen Senatsverwaltung gemäß § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes genehmigt. Die Tierhaltung erfolgte im 12-Stunden Hell/Dunkel-Rhythmus. Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Nahrung (Standardnahrung Altromin®, Lage, Deutschland). Ca. 18 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren die feste Nahrung entzogen.

### 4.2 Gruppeneinteilung

Der erste Teil der SMM-Studie beschäftigte sich mit der intravitalmikroskopischen Untersuchung der Submukosa (S), Muskularis (M) und Mukosa (M) nach 2 h Endotoxinämie. Im Rahmen dieser Untersuchung fand ausserdem die Erhebung der Blutgasanalysen und Blutbilder statt. Folgende Gruppen wurden gebildet:

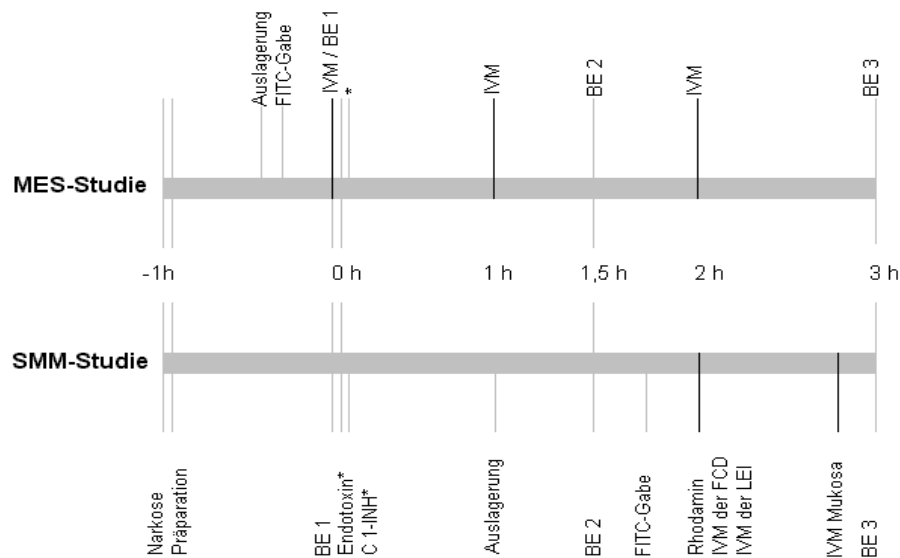
Gruppe SMM-KON (Kontrolle):	n = 7
Gruppe SMM-LPS (Testsubstanzplacebo und Endotoxin):	n = 7
Gruppe SMM-C1-INH (C1-Esterase-Inhibitor und Endotoxin):	n = 7

Im zweiten Teil der Studie wurde das Mesenterium (MES) intravitalmikroskopisch untersucht. Dabei wurden laborchemische Befunde der Chemotaxis (Zytokine) erhoben und Laktatwerte bestimmt.

Identisch zum ersten Studienteil wurden die Gruppen folgendermaßen aufgeteilt:

Gruppe MES-KON (Kontrolle):	n = 7
Gruppe MES-LPS (Testsubstanzplacebo und Endotoxin):	n = 7
Gruppe MES-C1-INH (C1-Esterase-Inhibitor und Endotoxin):	n = 7

Hämatokrit-Messungen wurden bei allen Tieren durchgeführt. Um die Blutverluste durch Messentnahmen zu minimieren, wurden die zu untersuchenden Parameter auf beide Studien verteilt. Hinsichtlich der entnommenen Blutmenge pro Entnahme und Versuch, wurden alle Tiere gleich behandelt (s. unten).



**Abb. 1: Versuchsablauf**

BE = Blutentnahme; IVM = Intravitalmikroskopie

### 4.3 Narkose und Monitoring

Die Narkose wurde durch einen Etherrausch (Ether zur Narkose, Chinosol, Seelze, Deutschland) eingeleitet und durch intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg KG Pentobarbital (Pentobarbital-Na, Synopharm, Barsbüttel, Deutschland), gelöst in isotonem NaCl 0,9% (Delta-Pharma, Pfullingen, Deutschland), für ca. 90-120 min aufrechterhalten. 10 min nach Narkoseeinleitung konnte mit der Gefäßpräparation begonnen werden. Dazu wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Wärmeplatte (Temperaturregler TEKO®, Italien) fixiert. Die Körpertemperatur wurde mittels einer Rektalsonde (Servomed, Hellige, Freiburg, Deutschland) gemessen und konstant auf  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  gehalten. Die Atemfrequenz wurde mittels Infrarotsensor kontinuierlich überwacht (Biomonitor, RFT, Erfurt, Deutschland). Die Narkose wurde als adäquat angesehen, wenn Korneal- und Beugereflexe nach Kneifen in Pfote und Schwanz nicht vorhanden waren. Die Narkoseführung erfolgte in Anlehnung an Ammons et al.<sup>53</sup> und van Lambalgen et al. Bei positiven Reflexen oder Atemfrequenzen über 90/min wurden 30% der Initialdosis Pentobarbital nachgegeben. Um eine Verlegung der oberen Atemwege zu vermeiden, wurden alle Tiere tracheotomiert und intubiert und atmeten spontan Raumluft. Es wurden Polyethylenkatheter (ID 0,58mm, OD 0,96mm, Sims Portex Ltd., UK) in die rechte Vena jugularis externa und Arteria carotis communis eingebracht. Daraufhin wurde kontinuierlich der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die Herzfrequenz (HF) überwacht (Servomed, Hellige, Freiburg, Deutschland; Druckmesswandler W 112, RFT, Stassfurt, Deutschland).

Über den zentralvenösen Zugang erfolgten:

- a) die Aufrechterhaltung der Narkose nach Bedarf mit einer Erhaltungsdosis von 2,4-6 mg/kg KG und h Pentobarbital i.v.
- b) Zufuhr von Pharmaka :
  - 1) LPS (Lipopolysaccharid) von E.coli 055:B5 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
  - 2) Rhodamin-6 G (Sigma-Aldrich) gelöst in NaCl 0,9% (Delta-Pharma, Pfullingen, Deutschland)
  - 3) FITC-Albumin 67 000 (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz) gelöst in NaCl 0,9% (Delta-Pharma)
  - 4) C1-Esterase-Inhibitor: Berinert® HS (Centeon Pharma GmbH, Marburg, Deutschland) 100 IU/kg KG gelöst in NaCl 0,9% (Delta-Pharma).

Die Basisvolumensubstitution erfolgte arteriell mit Thomæjonin® (Delta-Pharma) über ein Perfusorgerät (IVAC 770®, San Diego, Cal., USA)

Elektrolyte in mmol/l : Na<sup>+</sup> 140, K<sup>+</sup> 4, Ca<sup>2+</sup> 2,5, Mg<sup>2+</sup> 1, Cl<sup>-</sup> 106 (Acetat<sup>-</sup> 45, pH 7,5)

Differenzvolumensubstitution (für ein 200g Tier über eine Zeitraum von 3 h in ml) :

	Kontrollgruppe	Endotoxingruppe	C-1-IHN-Gruppe
Basisvolumen-substitution [ml/h]	1,0	1,0	1,0
Endotoxin [ml/2h]	---	2,0	2,0
C1-IHN [ml/30min.]	---	---	1,0
ThomæjoninPlacebo Endotoxin [ml/2h]	2,0	---	---
ThomæjoninPlacebo C1-IHN [ml/30min.]	1,0	1,0	---
Summe [ml/3h]	6,0	6,0	6,0

Dies entspricht einer Gesamtvolumenzufuhr von 10 ml/kg KG × h.

#### 4.4 Operative Technik

Die Präparation (Tracheotomie, Intubation, Katheterisierung) dauerte ca. 30 min. Danach wurde den Tieren 15 min Ruhe gewährt. Um den Vorlaufverlust des Infusionssystems (Füllung der Zuleitung) möglichst klein zu halten, wurde 6 min vor dem eigentlichen Beginn der Endotoxinämie diese Infusion gestartet. Inklusiv Narkoseeinleitung vergingen also bis zum

Zeitpunkt 0 (Beginn der Endotoxinämie) ca. 1 h. Nach 1 h (s. Abb. 1: Versuchsablauf)

Endotoxinämie wurde mit der Auslagerung des terminalen Ileums begonnen. Dazu wurde eine 3 cm lange mediane Laparotomie mittels Elektrokauter durchgeführt. Das Tier wurde daraufhin in Seitenlage gebracht und fixiert.

SMM-Gruppe: Das terminale Ileum wurde in no-touch-Technik oral der Ileozäkklappe auf eine speziell angefertigte Haltevorrichtung ausgelagert (s. Abb. unten: Versuchsaufbau), der Untersuchungsbereich wurde mit einem Deckgläschen (21× 26 mm Menzel-Gläser®, Braunschweig, Deutschland) von oben transparent und plan abgedeckt. Auf diese Weise wurde ein ca. 1,5 cm<sup>2</sup> serosaler Mikroskopierzugang geschaffen. Die nicht zu untersuchenden Darmabschnitte sowie das Mesenterium wurden vorsichtig mit Gaze bedeckt und mittels einer modifizierten Hotline (Hotline HL-90, SIMS Level 1 Technologies, Rockland, Massachusetts, USA) kontinuierlich mit auf 37° C angewärmter Thomæjonin®-Lösung (Zusammensetzung S. oben) superfundiert. In Anlehnung an Theuer et al. erfolgte eine Superfusion mit 0,00001 % Isoproterenollösung zur Hemmung der Peristaltik<sup>54</sup>. Der gesamte Auslagerungsbereich wurde dann mit Plastikfolie belegt, um Flüssigkeits- und Wärmeverluste zu verringern. Die gesamte Auslagerung dauerte nicht länger als 15 min. Alle Tiere der SMM-Gruppe durchliefen das gleiche Prozedere. Die Intravitalmikroskopie wurde nach 2 h Endotoxinämie begonnen. Die Tötung der Tiere erfolgte durch eine Überdosis Pentobarbital.

MES-Gruppe: Es wurde wie in der SMM-Gruppe beschrieben operiert.

Die Auslagerung fand jedoch vor dem Beginn der Endotoxinämie statt. Der mesenteriale Untersuchungsbereich wurde in dieser Gruppe nicht mit einem Deckgläschen bedeckt, sondern direkt mit konstant auf 37°C erwärmter Thomæjonin®-Immersion mikroskopiert. Zum zeitlichen Ablauf s. Abb. 1.

Es wurden unverzweigte, isolierte Venolen mit einer Größe von  $35 \pm 8 \mu\text{m}$  aufgesucht, die nicht von Fettzellen umgeben waren. Größere Venolen weisen das Problem starker Artefaktbildung durch angrenzende Fettzellen auf.

#### **4.5 Endotoxin-Modell**

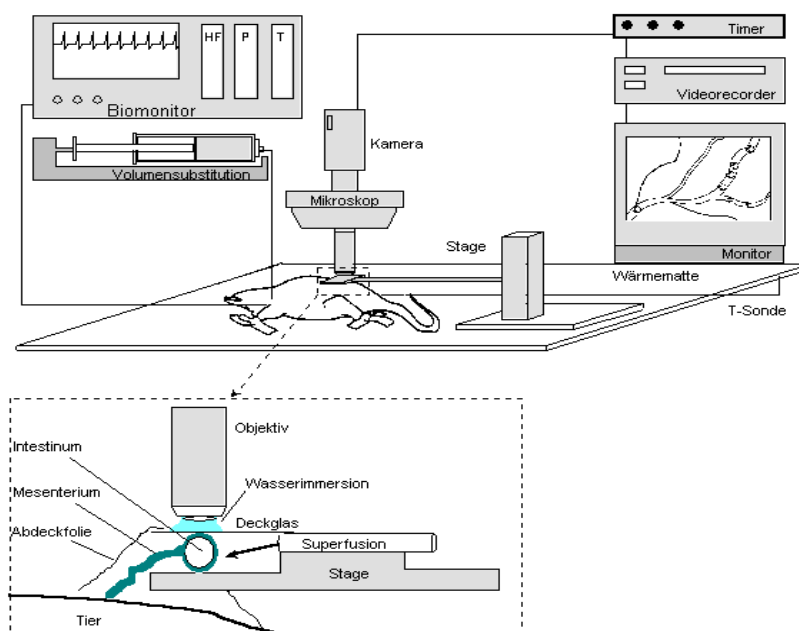
Die Endotoxinämie wurde durch 2-stündige LPS-Infusion erreicht. Die Dosis betrug 5 mg/kg KG in 2h. Dazu wurden 5 mg LPS (Lipopolysaccharid) von E.coli 055:B5 (Sigma-Aldrich) in 10 ml NaCl 0,9% gelöst und über einen Perfusor (IVAC 711) mit 1,0 ml/h (200g Tier) appliziert.



## 4.6 Intravitalmikroskopie

Die Intravitalmikroskopie (IVM) erfolgte mit folgender technischer Ausrüstung :

- a) Epifluoreszenzmikroskop Axiotech Vario, Carl Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
- b) Lichtquelle HBO 50, Zeiss
- c) Okulare 10 ×, Zeiss
- d) Objektive : 20 x / 0,5; Achroplan, Zeiss (SMM-Studie)  
40 x / 0,5; Zeiss (MES-Studie)
- e) Filter : Filtersatz Nr. 20, Zeiss, (Anregung: BP 546/12; Frequenzteiler: 560;  
Emission: BP 575-640) für Aufnahmen im Rhodamin 6G-Kontrast  
Filtersatz Nr. 10, Zeiss, (Anregung BP 450-490; Frequenzteiler: 510;  
Emission: BP 515-565) für Aufnahmen im FITC-Albumin-Kontrast
- f) Videokamera: FK 6990-IQ, Pieper, Berlin, Deutschland
- g) Videorecorder: Panasonic AG 7355, Matsushita Electric Ind., Tokyo, Japan
- h) Monitor: Philips LDH 2106/00, Philips Electronics, Eindhoven, Niederlande
- i) Videotimer: VTG-22, For-A-Company, Tokyo, Japan
- j) finale Monitorvergrößerung: 500-1000 fach.
- k) Die Auswertung der Videobänder erfolgte offline und computergestützt durch eine spezielle Software (Capiscope®, KKTechnology, Deutschland) S. unten.



**Abb. 2: Versuchsaufbau**

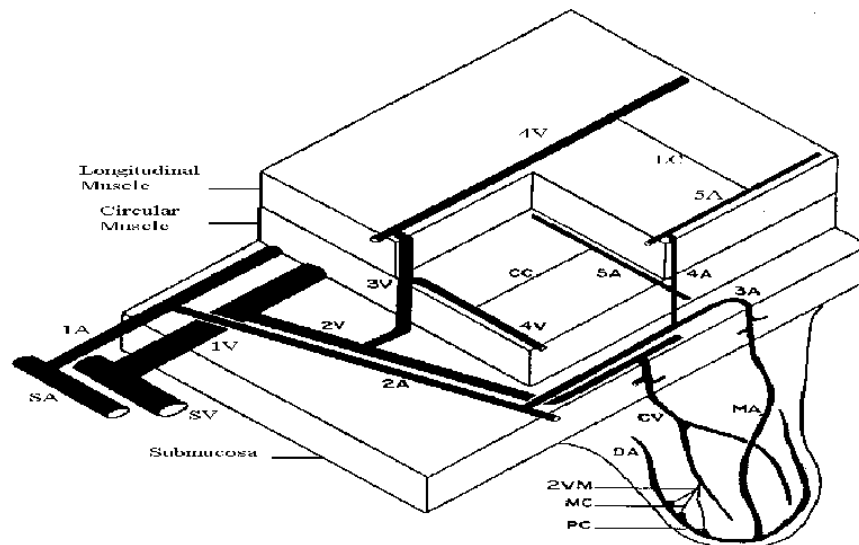
15 min vor Beginn der Intravitalmikroskopie wurden 50 mg/kg KG bovines FITC-Albumin gelöst in 200 µl NaCl 0,9% (200 g Tier) langsam als Bolus appliziert.

Im FITC-Kontrast konnten durch die Kontrastanhebung des Plasmas Aufnahmen des zirkulären und longitudinalen muskulären Kapillarstrombettes angefertigt werden (s. FCD unten). Sowohl submukosale als auch die beiden muskulären Schichten sind alleine durch Veränderung der Fokustiefe einsehbar.

Zur Evaluierung des muskulären Kapillarstrombettes erfolgten Aufnahmen von jeweils 5 Gesichtsfeldern über einen Beobachtungszeitraum von 30 s/Gesichtsfeld. Die Dauer dieses Mikroskopierabschnittes betrug ca. 10 min.

Erst jetzt erfolgte die Gabe von 100 µl Rhodamin 6G (0,05 %), als Bolus, um Störungen der Permeabilitätsbestimmung im FITC-Kontrast zu verhindern. Auf diese Weise wurden die Leukozyten optimal dargestellt. Es wurden jeweils 5 V1- und V3-Venolen (Venolen 1. Grades = 30-40 µm Durchmesser, Venolen 3. Grades = 41-75 µm Durchmesser (s. Abb. Nr 3.

Darmwandaufbau) in der Submukosa aufgesucht und über einen Zeitraum von 30 s/Gesichtsfeld aufgezeichnet. Dieser Mikroskopierabschnitt war nach 15 min ebenfalls beendet.



**Abb. 3: Schema des Darmwandaufbaus modifiziert nach Gore R.W. et al. <sup>55</sup>**

Im Anschluß wurde in Anlehnung an Bohlen et al. der Darm antimesenterial mit einem Mikrocauter eröffnet, wobei gefüllte Darmabschnitte bevorzugt wurden, um Hitzeschädigungen der mesenterial gelegenen Darmwand zu vermeiden <sup>56</sup>. Der Darminhalt wurde durch Spülung mit temperierter Thomæjonin®-Lösung entfernt. Der eröffnete Darmabschnitt wurde auf einer

speziell angefertigten Bühne gelagert und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Es wurden diejenigen mukosalen Gefäße (Villuskapillaren) gefilmt, die anatomisch am weitesten vom Schnittrand des Mikrocauters entfernt lagen, d.h. nahe der mesenterialen Gefäßbarkaden. Dieser Untersuchungsabschnitt betrug mit Vorbereitung der Mikroskopie von 5 Gesichtsfeldern 20 min, so dass sich die Gesamtdauer der Intravitalmikroskopie auf maximal 50 min belief. Die Auswertung der aufgenommenen Videosequenzen erfolgte off-line wobei dem Untersucher die Behandlung des Tieres nicht bekannt war. Folgende Parameter wurden ausgewertet:

#### **4.6.1 Bestimmung der endothelialen Permeabilität (MES-Studie)**

Definition: Eine Methode zur Bestimmung der endothelialen Permeabilität ist die Messung des extravasierten FITC-Albumin-Anteils (capillary leakage). Dieser wird zur quantitativen Beurteilung ins Verhältnis zu dem intravasal verbliebenden FITC-Albumin-Anteil gesetzt. Die Messwerte stellen relative Veränderungen dar und sind in Bezug auf den Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 min zu bewerten.

Dieser Parameter wurde in Anlehnung an Schmidt et al.<sup>57,58</sup> und Nevière et al.<sup>41</sup> erhoben.

Theoretische Voraussetzung dieser Methode ist das Lambert-Beer'sche Gesetz.

Softwaregestützt wurden hierzu drei Messlinien von ca. 35 µm Länge über den gesamten luminalen Gefäßdurchmesser gelegt und in Relation zu drei identischen Messlinien im jeweils korrespondierenden perivaskulären Interstitium gesetzt. Dabei wurde perivaskulär zur Vermeidung der Messung von Artefakten bedingt durch die Gefäßwand, ein Abstand von 15 µm zur Gefäßwand eingehalten<sup>59,60</sup>. Die liniendensitometrische Messung der Graustufen erfolgte daraufhin pixelbasiert durch die o.g. Software. Diese errechneten Zahlenwerte (0-255) der Messfelder wurden dann als Quotient perivaskuläres Interstitium (Außen)/luminalem Gefäßdurchmesser (Innen) ausgedrückt. Eine lineare Korrelation von emittierter Lichtintensität und Konzentration kann nach Messungen von Laux et al. im Bereich der Graustufen 30-200 angenommen werden<sup>61</sup>.

#### **4.6.2 Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI)**

Es wurden unverzweigte V1- und V3-Venolen der Submukosa (s. Abb Nr.3) ausgewertet. Kalibrierte Streckenmessungen wurden softwaregestützt durchgeführt.

##### **4.6.2.1 Temporär adhärente Leukozyten (Roller)**

Definition: Anzahl der Leukozyten, die über einen Beobachtungszeitraum von 30 s einen ausgewählten Gefäßabschnitt rollend passieren (hier 150 µm). Es werden sowohl diejenigen Leukozyten, die in den Gefäßabschnitt eintreten, als auch jene welche lediglich austreten gezählt. Der Mittelwert aus den an diesen beiden Gefäßdiametern gezählten rollenden

Leukozyten wird bestimmt und als Roller-flow (Zellen/min) angegeben. Die Geschwindigkeit rollender Leukozyten liegt bei ca. 50  $\mu\text{m/s}$ <sup>62</sup>.

#### **4.6.2.2 Permanent adhärenente Leukozyten (Sticker)**

Definition: Anzahl der Leukozyten, die über einen Beobachtungszeitraum von mindestens 30 s am Endothel haften/definierter Fläche.

Für die Berechnung der Gefäßinnenfläche wird eine Zylinderstruktur des Gefäßes angenommen.

Zylinderfläche  $F = l \times U$

$U = \text{Zylinderumfang} = \pi \times d$

$d = \text{Gefäßdurchmesser}$

$l = \text{Länge des Gefäßabschnittes}$

Angabe der adhärenenten Leukozyten (Sticker) in  $\text{n/mm}^2$

#### **4.6.3 Funktionelle Kapillardichte (FCD)**

Definition: Die funktionelle Kapillardichte errechnet sich aus der Länge der Kapillaren mit sichtbarer Erythrozytenperfusion (erkennbar als Hell-[FITC-Albumin-markiertes Plasma] Dunkel-[Erythrozyten] Kontrast) im Verhältnis zur Bezugsfläche.

Funktionslose Kapillaren: 1) Kapillaren ohne sichtbare Erythrozytenperfusion  
2) Kapillaren mit stehenden Erythrozyten über einen Beobachtungszeitraum von 30 s.

Aus der Tunica muskularis longitudinalis und zirkularis wurden softwaregestützt je 5 Gesichtsfelder ausgewertet. Dazu wurden die perfundierten Kapillaren markiert. Um den analysierten Bereich markierter Kapillaren wurde eine „region of interest“ (ROI) gelegt mit deren Hilfe nun die Markierungen/Fläche errechnet werden konnte. Die FCD wird in der Einheit  $\text{cm}^{-1}$  ausgedrückt. Es wurde stets die größtmögliche ROI direkt um die äußersten sichtbaren Kapillaren gelegt. Eine Fläche  $< 150\,000\ \mu\text{m}^2$  galt als Ausschlusskriterium. Im Mittel belief sich die Fläche der ROI auf  $200\,000\ \mu\text{m}^2$ .

Zur Auswertung der FCD in der Lamina mukosa wurde die manuelle Methode nach Schmid-Schoenbein et al.<sup>63</sup> angewendet. Dazu dient eine quadratische Gitterschablone, mit deren Hilfe die Ermittlung von Schnittpunkten perfundierter Kapillaren möglich ist. Die FCD drückt sich nach dieser „point-counting-method“ als Kapillarlänge/Gitterkasten (Lk) wie folgt aus:

$\text{FCD (Lk)} = k \times \text{N/L}$

$L = 2\ \text{PM} \times d = \text{Länge des Gittersystems}$

$d = \text{Kantenlänge der Kästen (in } \mu\text{m)}$

PM = Anzahl der Kästen

N = Anzahl der Kreuzungen von perfundierten Kapillaren mit den Gitterlinien

k = Konstante, die durch  $\pi/2$  beschrieben wird

$\Rightarrow \text{FCD} = \text{cm}/\text{cm}^2 = \text{cm}^{-1}$

Es wurden 5 Gesichtsfelder ausgewertet. Dabei wurde eine Gitterschablone der Größe  $100 \times 150 \mu\text{m}$  mit einer Kastenlänge von  $12,5 \mu\text{m}$  verwendet.

## **4.7 Biochemische Parameter**

### **4.7.1 Blutgasanalyse, Laktat und Hämatokrit**

Für die Blutgas-Analyse wurden vor Endotoxinämie, nach 1,5 h und 3 h Endotoxinämie jeweils  $120 \mu\text{l}$  Heparinblut aus dem arteriellen Zugang entnommen. Der pH,  $\text{pCO}_2$ ,  $\text{pO}_2$ , Standard- und Aktuelles Bikarbonat sowie der Basenüberschuss (BE) und der Laktatwert wurden bestimmt (ABL 505 Radiometer, Kopenhagen, Dänemark).

Zu identischen Zeitpunkten wurden für die Bestimmung des Hämatokrits (Hkt)  $80 \mu\text{l}$  art. Vollblut mit einer Glaskapillare gewonnen und bei  $6000/\text{min}$  5 min lang zentrifugiert.

### **4.7.2 Blutbild**

Die Bestimmung des Blutbildes aus  $200 \mu\text{l}$  EDTA-Blut erfolgte mittels cell counter (Technicon H1, Bayer, Leverkusen, Deutschland).

### **4.7.3 Zytokine: Tumor-Nekrose-Faktor-alpha und Interleukin-10:**

Als chemotaktische Parameter wurden in der MES-Studie Tumor-Nekrose-Faktor-alpha und Interleukin-10 aus  $500 \mu\text{l}$  art. Serum erhoben (Entnahmezeitpunkte s. Abb.1)

Die Zytokinwerte wurden nach Zentrifugation aus jeweils  $250 \mu\text{l}$  Serum mit einem rattenspezifischen ELISA gemessen. Es wurde verwendet: Rat TNF- $\alpha$  bzw. Rat IL-10-immunoassay kit (Biosource International, Inc, Camarillo, CA, USA).

Dem Untersucher der Zytokine war die Behandlung der Tiere nicht bekannt.

## **4.8 Statistik:**

Alle Daten sind in Mittelwerten  $\pm$  Standardabweichung (SD) oder Standardfehler (SEM) angegeben. Die deskriptive Statistik wurde in Microsoft Excel erstellt. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SigmaStat. 2.03 (Jandel Scientific, Erkrath, Deutschland) verwendet. Die Diagramme wurden in dem Programm SigmaPlot erstellt.

Die Auswertung von Ein-Punktuntersuchungen erfolgte bei Vorliegen unabhängiger, normalverteilter Daten bei 2 Gruppen mittels t-Test, bei 3 Gruppen durch eine einfaktorielle

Varianzanalyse (one-way ANOVA). Zur Auswertung abhängiger Daten wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholungen (two-way ANOVA for repeated measures) durchgeführt. Als post-hoc Test wurde der Bonferroni-Test verwendet. Bei der intraindividuellen Auswertung in Bezug auf den Ausgangswert einer Gruppe gelangte eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Meßwiederholungen zum Einsatz. Ergebnisse mit einem  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant angenommen.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Ergebnisse der Submukosa-Muskularis-Mukosa-Studie

#### 5.1.1 Vitalparameter der SMM-Studie

Tiergewicht: 221,07 ± 17,46 g (MW±SD)

#### Herzfrequenz (Herzaktionen/min)

Tab. 1:

Gruppe/ Versuchszeit	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
SMM-KON	344 ± 28	331 ± 30	340 ± 20	327 ± 30	341 ± 22	344 ± 27	341 ± 32
SMM-LPS	367 ± 17	342 ± 30	344 ± 24	360 ± 31	379 ± 36 <sup>2</sup>	396 ± 37 <sup>2</sup>	383 ± 19 <sup>2</sup>
SMM-C1-INH	360 ± 15	356 ± 19	340 ± 16	363 ± 26 <sup>3</sup>	379 ± 23 <sup>3</sup>	383 ± 17 <sup>3</sup>	384 ± 38 <sup>23</sup>

<sup>2</sup> KON vs. LPS p < 0,05; <sup>3</sup> KON vs. C1-INH p < 0,05; <sup>2</sup> p < 0,05 vs. 0 min (MW±SD)

#### Mittlerer arterieller Druck (MAP;mmHg)

Tab. 2:

Gruppe/ Versuchszeit	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
SMM-KON	107 ± 14	101 ± 15	98 ± 11	108 ± 10	115 ± 5	109 ± 12	110 ± 6
SMM-LPS	109 ± 19	104 ± 21	87 ± 11 <sup>2</sup>	104 ± 5	108 ± 4	112 ± 8	108 ± 11
SMM-C1-INH	106 ± 19	103 ± 12	82 ± 11 <sup>2</sup>	91 ± 6 <sup>2</sup>	97 ± 9	103 ± 8	110 ± 9

<sup>2</sup> p < 0,05 vs. 0 min (MW±SD)

#### Atemfrequenz (Atemzüge/min.)

Tab. 3:

Gruppe/ Versuchszeit	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
SMM-KON	72 ± 15	69 ± 15	74 ± 19	75 ± 12	75 ± 10	77 ± 7	75 ± 14
SMM-LPS	75 ± 12	83 ± 16	81 ± 13	83 ± 13	83 ± 15	100 ± 19 <sup>2</sup>	91 ± 17
SMM-C1-INH	67 ± 14	76 ± 16	71 ± 15	75 ± 17	84 ± 16 <sup>2</sup>	81 ± 12 <sup>*</sup>	82 ± 13

<sup>2</sup> KON vs. LPS p < 0,05; <sup>\*</sup> LPS vs. C1-INH p < 0,05; <sup>2</sup> p < 0,05 vs. 0 min (MW±SD)

## Temperatur (°C)

Tab. 4:

Gruppe/ Versuchs zeit	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
SMM- KON	37,2 ± 0,5	36,8 ± 0,4	37,1 ± 0,4	37,2 ± 0,3	37,3 ± 0,3	37,4 ± 0,4	37,1 ± 0,3
SMM- LPS	37,2 ± 0,6	36,9 ± 0,7	36,4 ± 0,7	37,2 ± 0,6	37,5 ± 0,5	37,8 ± 0,7	37,5 ± 0,9
SMM-C1- INH	37,1 ± 0,3	36,7±0,3 <sup>e</sup>	36,7±0,2 <sup>e</sup>	37 ± 0,2	37 ± 0,1	36,9 ± 0,2	36,8 ± 0,3

<sup>e</sup> p < 0,05 vs. 0 min (MW±SD)

**Herzfrequenz:** Im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachteten wir in beiden Gruppen, die Endotoxin erhalten hatten, einen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz - in der LPS-Gruppe 120 min nach Beginn der Endotoxingabe, in der C1-INH-Gruppe nach 90 min. Dieser persistierte in den beiden Gruppen bis Versuchsende. In der Kontrollgruppe traten keine signifikanten Veränderungen auf. In Bezug auf den individuellen Ausgangswert zeigte sich in der C1-INH-Gruppe nach 180 min eine signifikante Erhöhung der Herzfrequenz.

**Mittlerer arterieller Druck (MAP):** Im Gruppenvergleich und in der Kontrollgruppe traten keine signifikanten Veränderungen auf. Ein signifikanter, passagerer Abfall des MAP erfolgte in der LPS-Gruppe nach 60 min und in der C1-INH-Gruppe nach 60 und 90 min.

**Atemfrequenz:** Insgesamt zeigte sich im Versuchsablauf mit zunehmender Dauer eine ansteigende Atemfrequenz in allen Gruppen. Signifikante Unterschiede zum individuellen Ausgangswert traten nach 120 min in der C1-INH-Gruppe und nach 150 min in der LPS-Gruppe auf. Zu diesen Zeitpunkten war der Unterschied zwischen der LPS-Gruppe und den anderen Gruppen signifikant.

**Temperatur:** Ein signifikanter Temperaturabfall auf 36,7° zeigte sich 30 und 60 min nach Versuchsbeginn in der C1-INH-Gruppe.



## 5.1.2 Blutgasanalyse und Hämatokrit

### Blutgasanalyse

Tab.5:

SMM-KON / Zeitpunkt	<i>0 min</i>	<i>90 min</i>	<i>180 min</i>
pH	7,39 ± 0,02	7,44 ± 0,02 <sup>°</sup>	7,45 ± 0,03 <sup>°</sup>
pO <sub>2</sub> (mmHg)	70,46 ± 17,09	75,76 ± 5,25	87,4 ± 18,14 <sup>°</sup>
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	45,54 ± 4,31	39,05 ± 3,53 <sup>°</sup>	35,53 ± 3,47 <sup>°</sup>
Aktuelles Bikarbonat (mmHg)	27,11/1,98	25,81/1,31	24,48/1,39 <sup>°</sup>
SMM-LPS / Zeitpunkt	<i>0 min</i>	<i>90 min</i>	<i>180 min</i>
pH	7,39 ± 0,03	7,42 ± 0,04	7,49 ± 0,06 <sup>°</sup>
pO <sub>2</sub> (mmHg)	71,88 ± 6,01	91,61 ± 17,73 <sup>°</sup>	90,47 ± 9,71 <sup>°</sup>
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	47,94 ± 1,84	38,27 ± 3,96 <sup>°</sup>	28,81 ± 6,25 <sup>°</sup>
Aktuelles Bikarbonat (mmHg)	28,69 ± 1,78	24,52 ± 1,44 <sup>°</sup>	21,36 ± 2,62 <sup>°</sup>
SMM-C1-INH / Zeitpunkt	<i>0 min</i>	<i>90 min</i>	<i>180 min</i>
pH	7,4 ± 0,02	7,43 ± 0,02	7,49 ± 0,03 <sup>°</sup>
pO <sub>2</sub> (mmHg)	66,54 ± 6,42	83,8 ± 8,96 <sup>°</sup>	92,34 ± 9,14 <sup>°</sup>
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	47,81 ± 3,14	38,2 ± 5,21 <sup>°</sup>	29,75 ± 3,62 <sup>°</sup>
Aktuelles Bikarbonat (mmHg)	28,96 ± 1,35	25,21 ± 2,12 <sup>°</sup>	22,36 ± 3,12 <sup>°</sup>

<sup>°</sup> p < 0,05 vs. 0 min (MW±SD)

**Blutgasanalyse:** Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Der pH-Wert zeigte sich nach 180 min in allen Gruppen zum Ausgangswert signifikant erhöht. Der pO<sub>2</sub>-Wert war nach 90 min und 180 min in den Gruppen LPS und C1-INH signifikant erhöht. In der Kontrollgruppe zeigte sich dies erst nach 180 min. Der pCO<sub>2</sub>- und aktuelle Bikarbonat-Wert zeigte in allen Gruppen einen signifikanten Abfall nach 90 und 180 min, wobei der aktuelle Bikarbonatwert in der Kontrollgruppe erst nach 180 min Signifikanzniveau erreichte.

## Hämatokrit (%)

**Tab. 6:**

KON / Zeitpunkt	<i>0 min</i>	<i>90 min</i>	<i>180 min</i>
SMM	45,6 ± 2,4	43,8 ± 1,7 <sup>°</sup>	45,9 ± 2,9
MES	45,7 ± 2,3	44,3 ± 2,7 <sup>°</sup>	44,5 ± 2,2
LPS / Zeitpunkt	<i>0 min</i>	<i>90 min</i>	<i>180 min</i>
SMM	43,8 ± 2,5	43,0 ± 1,7	40,3 ± 1,9 <sup>°</sup>
MES	45,8 ± 2,3	44,7 ± 1,4	41 ± 2,1 <sup>°</sup>
C1-INH / Zeitpunkt	<i>0 min</i>	<i>90 min</i>	<i>180 min</i>
SMM	48,9 ± 1,7	45 ± 1,9 <sup>°</sup>	42,4 ± 2,1 <sup>°</sup>
MES	47,8 ± 3,7	45,7 ± 3,1 <sup>°</sup>	42,3 ± 2,2 <sup>°</sup>

<sup>°</sup> p < 0,05 vs. 0 min (MW±SD)

**Hämatokrit:** In beiden Versuchsreihen zeigte sich 90 min nach Versuchsbeginn zum Ausgangswert in der Kontroll- und C1-INH-Gruppe ein signifikanter Hämatokritabfall. Während dieser in der C1-INH-Gruppe persistierte, zeigte sich in der Kontrollgruppe nach 180 min kein signifikanter Unterschied mehr. In der LPS-Gruppe trat nach 180 min ein signifikanter Abfall des Hämatokrits auf.

### 5.1.3 Beschreibung der Gefäßpopulationen

#### Durchmesser der V1-und V3 Venolen (µm)

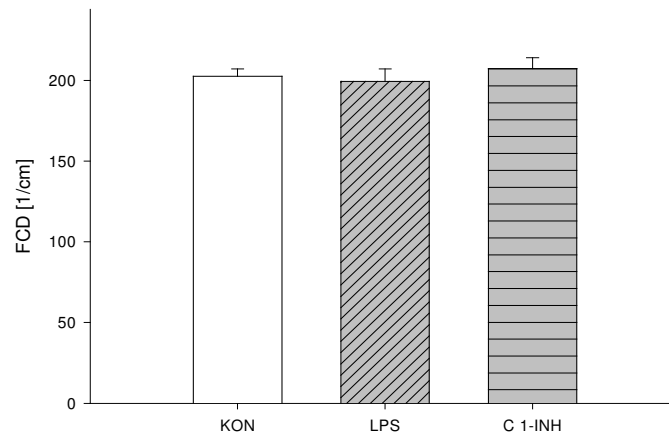
**Tab. 7:**

	<i>KON</i>	<i>LPS</i>	<i>C1-INH</i>
V1-Venolen	55,3 ± 10,61	54,5 ± 10,07	53,5 ± 9,68
V3-Venolen	35,1 ± 4,05	34,7 ± 3,62	33,1 ± 4,26

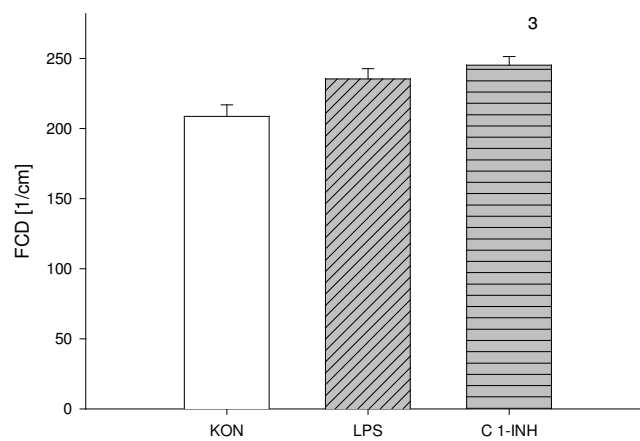
(MW±SD)

Zur Auswertung gelangten gestreckte, unverzweigte Venolen 1. und 3. Grades. Die Länge der Messtrecke betrug 150 µm. Die Tabelle 8 zeigt, dass die Gruppen in Bezug auf die Gefäßdurchmesser vergleichbar sind. Es bestehen in der jeweiligen Gefäßpopulation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

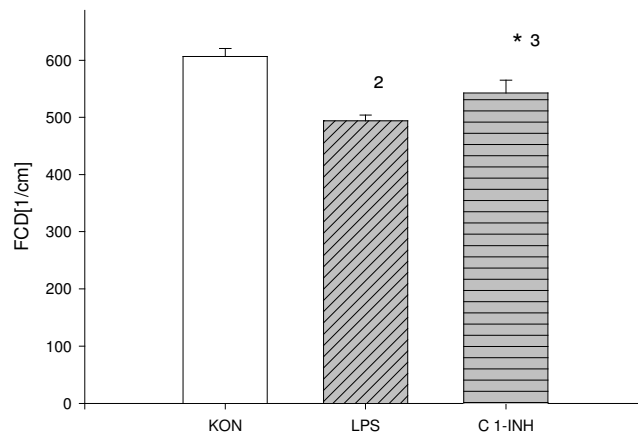
### 5.1.4 Funktionelle Kapillardichte (FCD)



**Abb. 4:**  
FCD muskularis longitudinalis (MW±SEM)



**Abb. 5:**  
FCD muskularis zirkularis; <sup>3</sup> p < 0,05 KON vs. C 1-INH (MW±SEM)



**Abb. 6:**

**FCD Mukosa; <sup>2</sup>p < 0,05 KON vs. LPS; <sup>3</sup>p < 0,05 KON vs. C1-INH; \* LPS vs. C1-INH (MW±SEM)**

Die FCD der Muskularis zirkularis zeigte sich in beiden Gruppen, die LPS erhalten hatten, gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Dieser Unterschied zur Kontrollgruppe war in der C 1-INH-Gruppe signifikant.

Die FCD der Mukosa war sowohl in der LPS- als auch in der C1-INH-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert. Zwischen der LPS- und der C 1-INH-Gruppe zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied.

### 5.1.5 Leukozyten im peripheren Blut (n/nl)

**Tab. 8:**

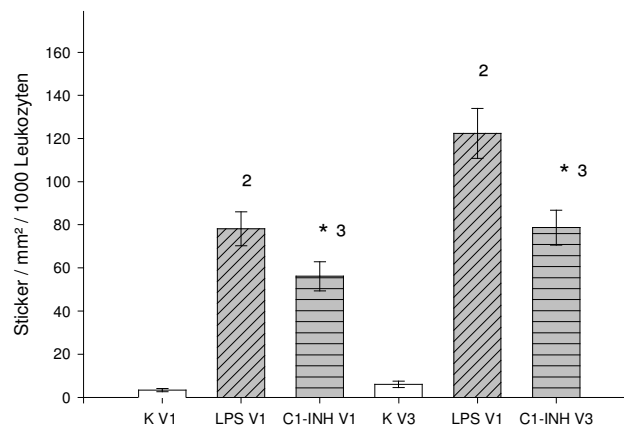
Gruppe/Zeitpunkt	0 min	90 min	180 min
SMM-KON	4837 ± 1028	12039 ± 3380 <sup>2</sup>	7780 ± 1614 <sup>2</sup>
SMM-LPS	4721 ± 1372	4703 ± 1080 <sup>2</sup>	2981 ± 877 <sup>2</sup>
SMM-C1-INH	5464 ± 638	7524 ± 2060 <sup>2,3</sup>	4400 ± 1300 <sup>3</sup>

<sup>2</sup> KON vs. LPS; <sup>3</sup> KON vs. C1-INH; <sup>2</sup> vs. 0min; p < 0,05 (MW±SD)

Sowohl in der Kontroll-, als auch in der C1-INH-Gruppe zeigte sich nach 90 min ein signifikanter Anstieg der Leukozytenzahl gegenüber dem jeweiligen Ausgangswert. Zwischen der Kontroll- und beiden Endotoxingruppen ergibt sich ein signifikanter Unterschied nach 90 min. Während der signifikante Leukozytenanstieg in der Kontrollgruppe bis Versuchende persistiert, sinken die Leukozyten der C1-INH-Gruppe nach 180 min wieder ab, was zu einem signifikanten Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen führt.

Die LPS-Gruppe zeigt nach 180 min eine zum Ausgangswert signifikante Reduktion der Leukozytenzahl, welche auch gegenüber der Kontrollgruppe nach 180 min signifikant ist.

### 5.1.6 Leukozyten-Endothel-Interaktion



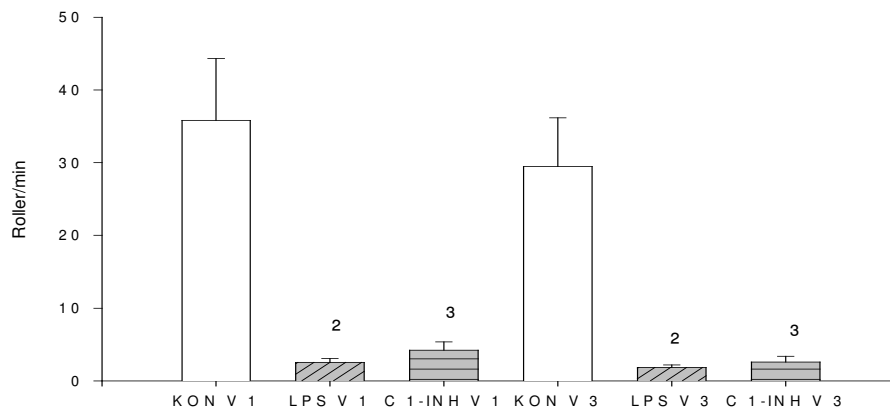
**Abb.7:**

**Sticker V1:** <sup>2</sup> LPS vs. KON; <sup>3</sup> KON vs. C1-INH; \* LPS vs. C1-INH p < 0,05

**Sticker V3:** <sup>2</sup> LPS vs. KON; <sup>3</sup> KON vs. C1-INH; \* LPS vs. C1-INH p < 0,05

(MW±SEM)

Setzt man die Anzahl der fest adhärenen Leukozyten ins Verhältnis zu den nach 180 min im peripheren Blut bestimmten Leukozytenzahlen, die sich wie oben beschrieben sowohl für die LPS- als auch für die C1-INH-Gruppe signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden, so läßt sich in beiden Gefäßpopulationen eine signifikant verminderte Leukozytenadhärenz zwischen der C1-INH- und der LPS-Gruppe zeigen.



**Abb. 8: Roller V1 und V3: <sup>2</sup> LPS vs. KON; <sup>3</sup> KON vs. C1-INH; (MW±SEM)**

Es zeigte sich eine gegenüber der Kontrollgruppe in beiden Gefäßpopulationen signifikant verminderte Zahl an temporär adhärenen Leukozyten sowohl in der LPS- als auch in der C1-INH-Gruppe.

## 5.2 Ergebnisse der Mesenterium-Studie

### 5.2.1 Vitalparameter

Tiergewicht:  $269,29 \pm 10,98\text{g}$  \*  $p < 0,05$  vs. SMM-Studie (MW $\pm$ SD)

#### Herzfrequenz: (Herzaktionen/min)

**Tab. 9:**

Gruppe/ Versuchszeit	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
MES-KON	$335 \pm 33$	$330 \pm 22$	$328 \pm 29$	$334 \pm 30$	$320 \pm 26$	$315 \pm 31$	$323 \pm 32$
MES-LPS	$313 \pm 16$	$345 \pm 12^{\circ}$	$332 \pm 17$	$342 \pm 31$	$355 \pm 26^{\circ}$	$355 \pm 26^{\circ}$	$352 \pm 30^{\circ}$
MES-C1-INH	$323 \pm 39$	$338 \pm 33$	$337 \pm 24$	$350 \pm 17$	$360 \pm 22^{\circ}$	$370 \pm 22^{\circ}$	$367 \pm 24^{\circ}$

<sup>o</sup>  $p < 0,05$  vs. 0 min (MW $\pm$ SD)

#### Mittlerer arterieller Druck: (MAP in mmHg)

**Tab. 10:**

Gruppe/ Versuchszeit	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
MES-KON	$129 \pm 11$	$123 \pm 7$	$122 \pm 9$	$123 \pm 6$	$118 \pm 9^{\circ}$	$115 \pm 10^{\circ}$	$120 \pm 8^{\circ}$
MES-LPS	$131 \pm 9$	$121 \pm 9^{\circ}$	$111 \pm 7^{\circ}$	$108 \pm 5^{\circ}$	$108 \pm 4^{\circ}$	$112 \pm 6^{\circ}$	$114 \pm 7^{\circ}$
MES-C1-INH	$137 \pm 12$	$126 \pm 11^{\circ}$	$118 \pm 8^{\circ}$	$116 \pm 8^{\circ}$	$111 \pm 11^{\circ}$	$118 \pm 10^{\circ}$	$120 \pm 12^{\circ}$

<sup>o</sup>  $p < 0,05$  vs. 0 min (MW $\pm$ SD)

#### Atemfrequenz: (Atemzüge/min)

**Tab. 11:**

Gruppe/ Versuchszeit	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
MES-KON	$60 \pm 7$	$60 \pm 7$	$52 \pm 11$	$53 \pm 10$	$61 \pm 8$	$61 \pm 9$	$65 \pm 10$
MES-LPS	$63 \pm 12$	$61 \pm 19$	$63 \pm 16$	$73 \pm 20$	$76 \pm 12$	$84 \pm 11^{o2}$	$83 \pm 12^{o2}$
MES-C1-INH	$61 \pm 5$	$64 \pm 4$	$64 \pm 14$	$66 \pm 7$	$72 \pm 14$	$85 \pm 10^{o3}$	$83 \pm 13^{o3}$

<sup>3</sup> KON vs. C1-INH  $p < 0,05$ ; <sup>2</sup> KON vs. LPS  $p < 0,05$ ; <sup>o</sup>  $p < 0,05$  vs. 0 min (MW $\pm$ SD)

**Temperatur: (°C)****Tab. 12:**

Gruppe/ Versuchs zeit	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min	150 min	180 min
MES- KON	36,5 ± 0,3	36,2 ± 0,5	36,2 ± 0,2	36,3 ± 0,1	36,4 ± 0,2	36,5 ± 0,2	36,3 ± 0,2
MES- LPS	36,3 ± 0,3	36,4 ± 0,4	36,5 ± 0,2	36,3 ± 0,2	36,5 ± 0,2	36,4 ± 0,3	36,3 ± 0,2
MES-C 1-INH	36,4 ± 0,2	36,4 ± 0,3	36,4 ± 0,2	36,4 ± 0,1	36,6 ± 0,2	36,5 ± 0,2	36,3 ± 0,4

(MW±SD)

**Herzfrequenz:** Ein zum Ausgangswert signifikanter Anstieg der Herzfrequenz erfolgte 120 min nach Beginn der Endotoxingabe in den Gruppen LPS und C1-INH. Dieser persistierte bis Versuchsende. Nach 30 min zeigte die LPS-Gruppe bereits einen passageren Anstieg der Herzfrequenz. In der Kontrollgruppe und zwischen den Gruppen traten keine signifikanten Veränderungen auf.

**Mittlerer arterieller Druck (MAP):** Im Gruppenvergleich traten keine signifikanten Veränderungen auf. Ein signifikanter Abfall des MAP gegenüber dem Ausgangswert erfolgte in der LPS- und C1-INH-Gruppe 30 min nach Beginn der Endotoxingabe und persistierte bis Versuchsende. In der Kontrollgruppe trat der MAP-Abfall erst nach 120 min bis Versuchsende auf.

**Atemfrequenz:** Insgesamt zeigte sich mit Ausnahme der Kontrollgruppe im Versuchsablauf mit zunehmender Dauer eine ansteigende Atemfrequenz. Signifikante Unterschiede zum individuellen Ausgangswert traten nach 150 und 180 min in der C1-INH-Gruppe und der LPS-Gruppe auf. Zu diesen Zeitpunkten war der Unterschied zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikant.

**Temperatur:** Es konnten keine signifikanten Temperaturveränderungen gezeigt werden.



## 5.2.2 Laktat: (mmol/l)

**Tab. 13:**

Gruppe / Zeitpunkt	0 min	90 min	180 min
MES-KON	0,54 ± 0,04	0,49 ± 0,02	0,55 ± 0,09
MES-LPS	0,6 ± 0,11	0,73 ± 0,09 <sup>2</sup>	1,08 ± 0,22 <sup>2</sup>
MES-C1-INH	0,63 ± 0,28	0,73 ± 0,13 <sup>3</sup>	1,09 ± 0,09 <sup>3</sup>

<sup>2</sup> KON vs. LPS p < 0,05; <sup>3</sup> KON vs. C1-INH p < 0,05; <sup>9</sup> p < 0,05 vs. 0 min (MW±SD)

**Laktat:** 90 min nach Versuchbeginn bis Versuchsende zeigten die Gruppen LPS und C1-INH einen im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhten Laktatwert. Eine signifikante Erhöhung des Laktatwertes in diesen beiden Gruppen in Bezug zum individuellen Ausgangswert trat erst nach 180 min auf.

## 5.2.3 Beschreibung der Gefäßpopulationen

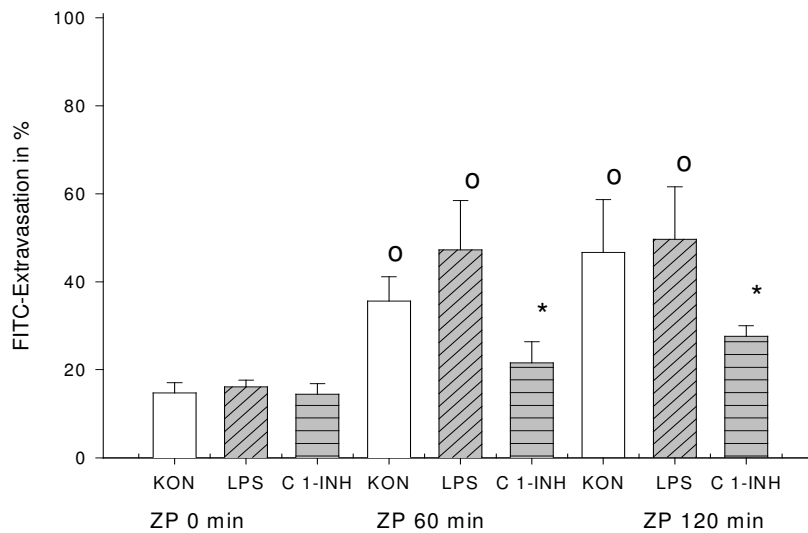
**Tab. 14: Durchmesser der mesenterialen Venolen (µm)**

	KON	LPS	C 1-INH
<b>Venolen</b>	36 ± 10	34 ± 9	36 ± 3

(MW±SD)

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Gefäßpopulationen innerhalb der Versuchsgruppen.

## 5.2.4 FITC-Extravasation

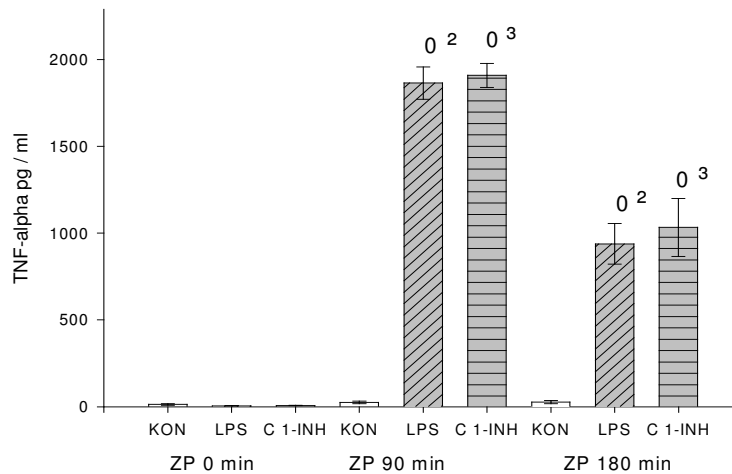


**Abb.9: FITC-Extravasation; °  $p < 0,05$  vs. Ausgangswert; \* LPS vs. C1-INH (MW $\pm$ SEM)**

Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Extravasation im Verhältnis zum Ausgangswert in der LPS- und der Kontrollgruppe nach 60 und 120 min. Dieser zeigte sich nicht in der C1-INH Gruppe. Die Unterschiede zur Endotoxinämie-Gruppe waren zu den Zeitpunkten 60 und 120 min jeweils signifikant.

## 5.3 Zytokine

### 5.3.1 TNF-alpha

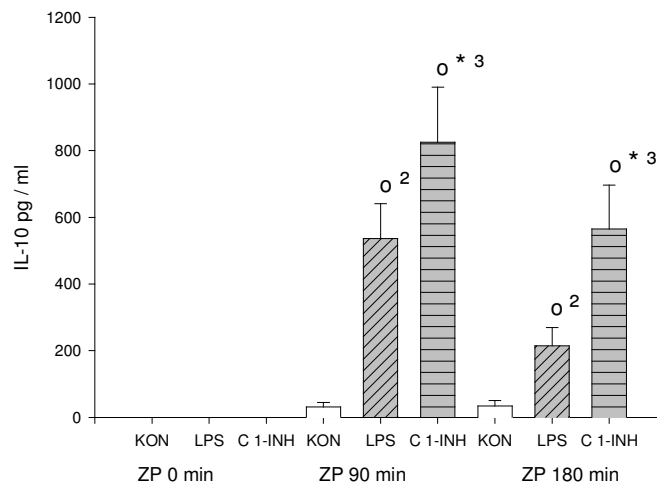


**Abb. 10:**

**TNF-alpha; <sup>0</sup> p < 0,05 vs. Ausgangswert; <sup>2</sup> p < 0,05 KON vs. LPS; <sup>3</sup> KON vs. C1-INH (MW±SEM)**

Es zeigte sich in beiden Gruppen unter Endotoxinämie nach 90 und 180 min ein jeweils signifikanter Anstieg der TNF-alpha Konzentration im Verhältnis zum jeweiligen Ausgangswert. Die maximale Konzentration wurde nach 90 min erreicht und fiel im Verlauf zum Zeitpunkt 180 min wieder ab. Zu beiden Zeitpunkten war in diesen Gruppen ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe nachweisbar.

### 5.3.2 Interleukin-10



**Abb. 11:**

**IL-10; <sup>0</sup> p < 0,05 vs. Ausgangswert; <sup>2</sup> p < 0,05 KON vs. LPS ; <sup>3</sup> KON vs. C1-INH; \* p < 0,05 LPS vs. C1-INH (MW±SEM)**

Nach Endotoxinämie zeigte sich im Verhältnis zum Ausgangswert ein jeweils signifikanter Anstieg der Interleukin-10 Konzentration. Im Verlauf wurde die maximale Konzentration nach 90 min erreicht und fiel nach 180 min wieder ab. In der Endotoxin-Gruppe und der C1-INH-Gruppe zeigten sich zu den Zeitpunkten 90 und 180 min des weiteren signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe. In der C1-INH-Gruppe waren die erreichten Konzentrationen für Interleukin-10 im Verlauf jeweils signifikant höher als in der Endotoxingruppe.

## 6. Diskussion

### 6.1 Die Bedeutung und Relevanz des Versuchsmodells:

Zur Erforschung der Sepsis und der zugrunde liegenden Pathophysiologie existieren zahlreiche Modelle. Die Untersuchungen unterscheiden sich im Design der Versuchsabläufe, den verwendeten Tierspezies und in der Verwendung verschiedener pathogener Bakterien bzw. deren Bestandteile.

So kann man z.B. zwischen dem Modell der Peritonitis durch Ligatur und Punktion des Caecums (coecal ligation and puncture; CLP) und der Applikation von Lipopolysaccharid (LPS; Synonym: Endotoxin) unterscheiden.

Das heute weit verbreitete Modell der Peritonitis durch CLP wurde erstmalig in einem Rattenmodell beschrieben<sup>64, 65</sup>. Eine Alternative stellt die Technik der intraperitonealen Inokulation von Faeces oder von Kulturen verschiedener Bakterienspezies dar, wobei letztere den Vorteil einer kontrolliert applizierten Dosis haben<sup>66</sup>.

Es wird häufig betont, dass dieses Modell der Entwicklung einer Sepsis in bezug auf deren klinische Relevanz vorteilhaft ist<sup>67</sup>. Dabei ist jedoch zu beachten, dass sich ein Unterschied in der zeitlichen Entwicklung der pathophysiologischen Mechanismen ergibt, was auf die fehlende Reproduzierbarkeit einer zeitlich definierten Dosis zurückzuführen ist.

Es ist aber zu beachten, dass sich aus den entsprechenden Versuchsabläufen auch Unterschiede in den Ergebnissen ergeben können. So ergaben sich in direkten Vergleichsuntersuchungen zwischen experimenteller Peritonitis und Endotoxinämie vergleichbare Mortalitätsraten, aber Unterschiede in der Kinetik und im Ausmaß der Zytokinantwort<sup>68</sup>. Dies erschwert den Vergleich experimenteller Studien und kann zu Interpretationsschwierigkeiten führen. Diese Unterschiede können ebenso unterschiedliche Ergebnisse im Outcome experimenteller Studien zur Folge haben.

So zeigte die anti-TNF-alpha „Strategie“ eine Verbesserung der Mortalitätsrate, die in einem Peritonitismodell nicht reproduzierbar war<sup>69, 70</sup>.

Die Modelle der experimentellen Endotoxinämie zeichnen sich durch die Reproduzierbarkeit und das einfache Dosis-Wirkungs-Prinzip aus. Sie produzieren häufig statistisch signifikante Ergebnisse, die allgemein in der Lage sind, zum Verständnis der Pathophysiologie der Sepsis beizutragen und potenzielle therapeutische Substanzen zu detektieren.

Bei der Endotoxinämie gibt es Hochdosis-Bolus-Modelle versus Niedrig-Dosis-Modelle und diese sowohl als Bolus wie auch als prolongiertes Applikationsmodell.

In Tiermodellen zeigen sich in Niedrig-Dosis-Modellen eher hyperdynamische Formen, mit einem erhöhten kardialen Auswurf bei Vasodilatation. Dosisabhängig führten Hochdosis-Modelle zu einer entsprechenden Schocksymptomatik. Verschiedene Autoren zweifeln die klinische

Relevanz dieses Modells an und präferieren die Niedrig-Dosis-Modelle in kontinuierlicher Form, die eher der Entwicklung eines septischen Krankheitsbildes entsprechen<sup>71-73</sup>.

Bei der Endotoxinämie gibt es des weiteren Unterschiede in der Sensivität verschiedener Tierspezies<sup>74</sup>.

Zu beachten sind ferner mikrobiologische Aspekte, die sich aus strukturellen Unterschieden verschiedener Serotypen von Bakterien ergeben. Hieraus ergeben sich Unterschiede in der Stabilität des LPS in vivo und der Virulenz. So zeigte sich in einer vergleichenden Untersuchung, in einem Sepsismodell mit intraperitonealer Applikation von verschiedenen E. coli Spezies/Serotypen in Mäusen, ein Effekt von BPI-Protein ( bactericidal/permeability-increasing-protein ) auf die Mortalität in Abhängigkeit von der mikrobiologischen Grundstruktur<sup>75</sup>.

Als Fazit ergibt sich, dass sich durch eine Endotoxinämie dosisabhängig, reproduzierbar die pathophysiologischen Vorgänge der Sepsis auslösen lassen.

In der vorliegenden Studie wurde eine kontinuierliche, intravenöse Applikation durchgeführt, um ein Modell mit Nähe zur klinischen Relevanz zu wählen. Zuvor konnte gezeigt werden, dass sich bereits 30 Minuten nach erfolgter Applikation einer Endotoxindosis eine Veränderung laborchemischer und klinischer Symptome ergeben<sup>76</sup>.

Dazu wurde ein Design gewählt, um eine zeitliche Vergleichbarkeit der Untersuchungen des mesenterialen und der mukosalen Mikrozirkulation zu gewährleisten. Hieraus ergab sich eine zeitliche Limitierung, die sich aus der Laparotomie und der Auslagerung der mesenterialen Gefäße ergibt. Die Induktion der Endotoxinämie erfolgte in der Untersuchung des Mesenteriums nach Auslagerung, um einen hieraus möglichen Gewebeschaden mit konsekutiven kapillären Leck, sowohl für die Kontrolle wie auch für die LPS und Therapiestudie ausschließen zu können und so reproduzierbare Ausgangswerte für alle zu untersuchenden Gruppen zu gewährleisten. Die Endotoxinämie erfolgte dabei in prolongierter Form um eine hyperdynamie Kreislaufsituation zu erzielen und die intravitalmikroskopischen Parameter unabhängig vom mittleren arteriellen Druck erheben zu können.

Im folgenden werden weitere Ergebnisse diskutiert die insgesamt als Kriterien zur Definition eines septischen Krankheitsbildes herangezogen werden können.

## **6.2 Tiergewicht:**

Im Gewicht unterscheiden sich die Versuchstiere der SMM und MES-Studie signifikant voneinander. Dieser Unterschied ergibt sich aus den praktischen Beobachtungen während der Vorversuche zur Optimierung der Modelle. Aufgrund reduzierter Artefakte durch Fettzellen eignet sich für eine ideale Intravitalmikroskopie der Submukosa, Muskularis und Mukosa im durchgeführten Modell ein Gewicht um 220 g<sup>77</sup>. Hingegen haben sich zur reproduzierbaren Auffindbarkeit isoliert verlaufender postkapillärer mesenterialer Venolen, in einer in

vergleichbaren Untersuchungen geforderten Größe von über 30 µm, in den Vorversuchen der MES-Studie ältere Versuchstiere mit Gewichten um 270 g als besser geeignet gezeigt<sup>41, 57, 58, 78</sup>.

### **6.3 Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck**

Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck sind allgemein anerkannte Parameter zur Darstellung hämodynamischer Veränderungen während einer Endotoxinämie oder klinischen Sepsis. Bereits unmittelbar nach Induktion einer Endotoxinämie kann dosisabhängig ein unterschiedlich stark ausgeprägter Abfall des mittleren arteriellen Druckes beobachtet werden. Neben den in der theoretischen Vorbetrachtung hierfür benannten Ursachen, ist dieser auch auf die stattfindende Histaminausschüttung zurückzuführen<sup>61, 79</sup>.

Wird wie in unserem Modell eine kontinuierliche, niedrige Dosis LPS appliziert, folgt im Anschluss an den frühen MAP-Abfall eine Stabilisierungsphase. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Zunahme der Herzfrequenz. Diese persistiert, wie in unserem Experiment auch, meist bis zum Versuchsende<sup>53, 54, 80</sup>.

Um hämodynamisch bedingte Veränderungen der untersuchten intravitalmikroskopischen Parameter zu minimieren wählten wir daher eine dementsprechend niedrige, kontinuierliche LPS-Dosis aus.

SMM-Studie:

In Bezug auf die Ausgangswerte zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. 60 min nach Beginn zeigte sich jedoch in beiden Gruppen die LPS erhalten hatten, der erwartete Blutdruckabfall. Dieser passagere Blutdruckabfall war jeweils signifikant im Vergleich zum Ausgangswert aber nicht zwischen den Gruppen.

Es ist davon auszugehen, dass die Stabilisierung des MAP einerseits durch eine adäquate Volumensubstitution und andererseits durch ein erhöhtes Herzzeitvolumen erfolgte, da ein entsprechender, wenn auch zeitlich verzögerter Anstieg der HF in diesen Gruppen festgestellt wurde.

So war während der Intravitalmikroskopie ein normotensiver Zustand gewährleistet.

Es zeigte sich jedoch in Korrelation zu den Ergebnissen anderer Autoren (s.o.) in den beiden Endotoxingruppen ab 120 min eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhte Herzfrequenz, die bis Versuchsende persistierte. Daraus schliessen wir, dass in unserer SMM-Studie ab 90 min nach Beginn der Endotoxinämie für die C1-Esterase-Inhibitor Gruppe und ab 120 min für die LPS-Gruppe eine hyperdynamer Kreislaufzustand im Rahmen einer experimentellen Sepsis bestand<sup>81</sup>. Betrachtet man die Ergebnisse anderer vergleichbarer Untersuchungen, so ist bei erhöhtem kardialen Auswurf und Normotension eine hierdurch bedingte Veränderung der Mikrozirkulation während der Intravitalmikroskopie nicht auszuschliessen<sup>24, 81, 82</sup>.

Abgesehen von einem über 30 min prolongierten MAP-Abfall und einem 30 min vorgezogenen Anstieg der HF gegenüber der LPS-Gruppe konnte kein Einfluss des C1-Esterase-Inhibitors auf die Parameter MAP und HF festgestellt werden.

MES-Studie:

In Bezug auf die Ausgangswerte und den gesamten Verlauf des Versuches bestanden für den MAP und die HF keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Ein gegenüber dem Ausgangswert signifikanter MAP-Abfall trat in dieser Studie bei beiden Gruppen unter Endotoxinbelastung bereits nach 30 min auf und persistierte bis Versuchsende. Auch in der Kontrollgruppe trat nach 120 min ein persistierender MAP-Abfall auf. Vergleichbare Experimente in denen ein operatives Trauma und die Gabe von FITC-Albumin vor Beginn der Endotoxinämie erfolgten, zeigten diesen Verlauf ebenso<sup>58</sup>. Da sich der MAP in der SMM-Studie (kein Trauma und FITC-Gabe vor Beginn der Endotoxinämie) stabilisierte, liesse sich der Druckabfall mit einem erhöhten Flüssigkeitsverlust durch das eröffnete Abdomen und die zusätzliche Dauer der Auslagerung vor Beginn der Endotoxinämie erklären. Dass eine durch die FITC-Albumin-Gabe ausgelöste zusätzliche Albuminextravasation den Druckabfall begründen könnte, erscheint bei einer Zufuhr von etwa 1/62 des körpereigenen Albumins unwahrscheinlich.

Analog der SMM-Studie trat nach 120 min in beiden Gruppen die LPS erhalten hatten ein zum Ausgangswert signifikanter Anstieg der Herzfrequenz im Sinne des bereits diskutierten hyperdynamen Kreislaufzustandes auf.

#### **6.4 Atemfrequenz, Blutgasanalyse und Laktat**

Bei Versuchsende zeigen die mit Endotoxin belasteten Gruppen unabhängig von der C1-INH Gabe eine respiratorische Alkalose. Dies spiegelt sich deutlich in einer gegenüber der Kontrollgruppe signifikanten Hyperventilation.

Vergleicht man die erhobenen Parameter unter Berücksichtigung der Laktatwerte, so ist festzustellen, dass die Endotoxingabe in den Gruppen LPS und C1-INH nach 90 min zu einem Laktatanstieg führt. Dieser nimmt in seiner Ausprägung zum Versuchsende hin zu. Anhand der Atemfrequenz und der Blutgasanalyse läßt sich eine respiratorische Kompensation gut nachvollziehen.

Folgende Veränderungen der Blutgasanalyse konnten beobachtet werden:

- signifikant ansteigender  $pO_2$ -Wert in allen Gruppen im Versuchsverlauf
- signifikant erhöhter pH-Wert in allen Gruppen bei Versuchsende, wobei die Kontrollgruppe sich damit weiter im Normbereich befindet
- signifikanter Abfall des  $pCO_2$  in allen Gruppen bereits nach 90 min
- signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden nicht gefunden



Die Hyperventilation ist neben weiteren, im Folgenden aufzuzeigenden Nachweisen, ein Beleg für eine suffiziente Endotoxinämie nach den SIRS-Kriterien. Der moderate Laktatanstieg im Sinne einer metabolischen Azidose spricht für eine maldistributive-hypoxische Störung der Mikrozirkulation, die sich durch unsere intravitalmikroskopischen Ergebnisse belegen läßt. Aufgrund der in allen Gruppen im Verlauf zunehmenden Atemfrequenz und dem auch in der Kontrollgruppe beobachteten Trend zur respiratorischen Alkalose ist die dokumentierte Hyperventilation bei normalen Laktatwerten in der Kontrollgruppe nicht alleine als Kompensation eines endotoxininduzierten Laktatanstieges zu bewerten. Es muss zusätzlich von einer durch die Narkoseführung ausgelösten Hyperventilation ausgegangen werden. Vor allem in der MES-Studie zeigt sich dies an signifikant erhöhten Atemfrequenzen bei den endotoxinbelasteten Gruppen zum Versuchsende hin. Auch die im Verhältnis zum Ausgangswert im Versuchsverlauf signifikant ansteigenden  $pO_2$ -Werte belegen diese Annahme. Es traten allerdings keine Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

Die Narkoseführung orientierte sich zunächst an den interdigitalen Reflexen. Daneben wurde bei Atemfrequenzen  $> 90/\text{min}$  ebenfalls Pentobarbital (30% der Initialdosis) nachgegeben. Die Erfahrung früherer Arbeitsgruppen hatte ergeben, dass höhere Dosen Pentobarbital aufgrund von Kumulation der Substanz gelegentlich zum Atemstillstand führten. Eine tiefere Narkose als die von uns durchgeführte war daher pharmakologisch nicht durchführbar. Eine höhere Stabilität des respiratorischen Systems wäre wünschenswert, läßt sich ohne Kleintierventilatoren, die mit ähnlichen mittleren Atemfrequenzen (80/min) eingestellt werden, jedoch nicht verwirklichen<sup>83</sup>. Da uns diese aufwendige Technik, wie vielen anderen Arbeitsgruppen mit ähnlichen Versuchsanordnungen, nicht zur Verfügung stand, fließen die durch die Endotoxinämie und Narkoseführung verursachten Imbalancen des respiratorischen Systems in die Ergebnisse solcher Versuche ein.

## **6.5 Intestinale Mikrozirkulation**

Die FCD der Mukosa zeigte sich in beiden Gruppen, die LPS erhalten hatten, gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert. In der C1-INH-Gruppe zeigte sich diese Reduktion der FCD nicht in dieser Ausprägung. Diese Ergebnisse stehen abgesehen von den Ergebnissen zum C1-INH im Einklang mit den Ergebnissen zahlreicher anderer Untersuchungen zur intestinalen Mikrozirkulation unter Endotoxinämie, auf die an dieser Stelle kurz eingegangen werden soll. So konnten Theuer et al. bei unverändertem Blutfluss in der Arteria mesenterica superior bei Ratten während einer normotensiven Endotoxinämie in den nachgeschalteten Arteriolen eine Vasokonstriktion von 28% und eine Reduktion des errechneten arteriellen Blutflusses um 70% bei einer Laserdoppler-Flow-Reduktion auf Mukosaebene von bis zu 40% gegenüber den Kontrolltieren nachweisen<sup>54</sup>. Schmidt et al. zeigten nach Gabe von 1,5 mg/kg KG LPS eine auf 70% des Ausgangswertes reduzierte Durchblutung der zentralen Villusarterien von Ratten

bei einer Reduktion der Gefäßdurchmesser um bis zu 17%. Interessanterweise führte eine Erhöhung der LPS-Dosis auf 15 mg/kg KG sowie ein damit einhergehender systemischer MAP-Abfall nach 60 min Endotoxämie nicht zu deutlich ausgeprägteren Verminderungen der Mikrozirkulation<sup>80</sup>. Dass Dopexamin diese Veränderungen in dem beschriebenen Modell verhindern kann, konnte eine Arbeit von Secci et al. zeigen<sup>84</sup>.

Ebenfalls im normotensiven Rattenmodell konnten Lam et al. eine um 36% verminderte funktionelle Kapillardichte des Musculus extensor digitorum nach Coekalligatur und Panktion (CLP-Modell) zeigen<sup>85</sup>. In diesem Versuch wurden bei den septischen Tieren (CLP) signifikant erhöhte Blutlaktatwerte gefunden.

Diese Ergebnisse stützen die oben getroffene Aussage, dass es sich bei dem von uns gemessenen Laktatanstieg unter Endotoxinbelastung um den Indikator einer maldistributiv-hypoxischen Schädigung auf Mukosaniveau handelt.

Es muss jedoch erwähnt werden, dass andere Autoren auch von einer Endotoxin-vermittelten Pyruvatdehydrogenase-Inaktivierung (festgestellt durch Senkung eines signifikanten Laktatanstieges bei endotoxämischen Hunden durch Dichloracetat ohne Veränderungen des Sauerstoffverbrauches) als Ursache des Laktatanstieges unter Endotoxin ausgehen<sup>86</sup>. Wieder andere postulieren, dass in der endotoxinvermittelten Hemmung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase die Ursache eines durch eine verminderte Glukoneogenese hervorgerufenen Laktatanstieges gesehen werden kann<sup>87</sup>.

Dass sich in der der Mukosa näher gelegenen zirkulären muskulären Schicht in beiden Gruppen unter Endotoxinbelastung gegenüber der Kontrollgruppe eine erhöhte FCD zeigte, deuten wir als Umverteilungsphänomen (auch als „mismatching“ oder „shunt“ bezeichnet) bei reduzierter mukosaler FCD der beiden mit Endotoxin belasteten Gruppen. Neben unseren eigenen Ergebnissen wird diese These gestützt durch Untersuchungen von Nöldge et al. und Hasibeder et al. die zeigen konnten, dass sich sowohl unter kontinuierlicher LPS-Infusion als auch nach LPS-Injektion in die Art. mesenterica sup. beim Schwein vor allem ein Abfall des mukosalen  $pO_2$  und der mukosalen Sauerstoffsättigung ereignete, wohingegen die serosalen  $pO_2$ -Werte sich nicht signifikant gegenüber den Ausgangswerten veränderten<sup>88</sup>. Eine ähnliche Beobachtung machte Xu et al.<sup>81</sup>. Er untersuchte in einem hyperdynamen Endotoxin-Rattenmodell den intestinalen Blutfluss und den Einfluss von Allopurinol auf die gestörte endotheliale Permeabilität und konnte zeigen, dass der mukosale Blutfluss unter Endotoxingabe signifikant stärker vermindert war als der Blutfluss in den anderen Darmwandschichten. So konnten auch wir in der FCD der weiter serosal gelegenen Tunica muskularis longitudinalis keine Unterschiede feststellen.

Signifikante Effekte des C1-INH gegenüber der LPS-Gruppe, die FCD der Muskularis betreffend, konnten nicht gezeigt werden. Gegenüber der Kontrolle zeigte sich in der C1-INH-Gruppe eine signifikante Erhöhung der FCD der Tunica muskularis zirkularis. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf eine lokal vasodilatatorische Wirkung des C1-INH zurückzuführen.

Es bleibt zunächst festzustellen, dass den bisher beschriebenen biochemischen und intravitalmikroskopischen Veränderungen während der Endotoxinämie, nach Zusammenschau der eigenen Ergebnisse sowie der anderer Autoren, ursächlich am ehesten ein maldistributiv-hypoxischer Pathomechanismus zugrunde zu liegen scheint. Die zu den beobachteten Perfusionsausfällen führenden Mikrothrombosierungen im Kapillarstromgebiet führen wir auf eine erhöhte Aktivierung der prokoagulatorischen Faktoren unter LPS zurück.

Die FCD war auf Mukosaebene durch die Gabe des C1-INH signifikant erhöht. In dem hemmenden Einfluss des C1-INH auf prokoagulatorische Faktoren sehen wir einen wesentlichen Einfluss auf die erhaltene Mikrozirkulation. Diese bekannte Funktion belegte Hack et al. bei 5 Sepsispatienten mit den Nachweis erhöhter FXII und Präkallikreinwerte als Zeichen verminderter FXIIa und Kallikreinsynthese unter C1-INH-Therapie<sup>89</sup>. Scherer et al. konnten durch die Gabe von C1-INH beim Hasen ferner eine verminderte ATIII-Senkung und Fibrinablagerung zeigen<sup>90</sup>.

Auf weitere Pathomechanismen wie z.B. den Verlust der endothelialen Integrität als Ursache septischer Organdysfunktion wird in den folgenden Kapiteln eingegangen.

### **6.6 Leukozyten-Endothel-Interaktion:**

Die Ergebnisse zeigen für beide Gruppen, die LPS erhielten, eine signifikante Verminderung der Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten (Roller) und dies in beiden Gefäßpopulationen. Betrachtet man die Ergebnisse der permanent adhärenenten Leukozyten (Sticker), so zeigt sich hier - ebenfalls in beiden Gefäßpopulationen - ein erhöhtes „sticking“ durch die Endotoxinapplikation. Dies erscheint zunächst paradox, kann im folgenden jedoch erklärt werden.

Zunächst sei jedoch kurz auf die Bedeutung des Rollings eingegangen. Aufgrund zahlreicher tierexperimenteller Untersuchungen ist eine durch die Auslagerung hervorgerufene Aktivierung der Leukozyten im Sinne eines „baseline-rollings“ bekannt und allgemein anerkannt. Janssen et al. sehen darin die ständige immunoprotektive Bereitschaft der Leukozyten<sup>91-93</sup>.

Die Arbeitsgruppe um Scalia fand nach einer Stabilisierungsphase von ca. 20 min ein „baseline-rolling“ von 20 Leukozyten/min<sup>94</sup>. Unsere Ergebnisse zeigen in der Kontrollgruppe Werte von 30 - 36 Leukozyten/min. Die Stabilisierungsphase nach Auslagerung war jedoch in unserem Versuchsablauf 40 min länger. Das sich in unserem Versuch gegenüber Scalia et al. ein

erhöhtes „baseline-rolling“ zeigte, führen wir bei längerem Stabilisierungsintervall auf die längerdauernde Darmauslagerung und eine hierdurch erhöhte Aktivierung der Leukozyten zurück.

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang und in Bezug auf das Verhältniss von Rollern zu Stickern eine Arbeit von Nevière et al.<sup>41</sup>. Sie zeigten im Anschluss an eine 30 min Stabilisierungsphase nach Präparation einer Mesenterialvenole aber bereits 4 Stunden nach Induktion einer Endotoxinämie mit 10 mg/kg LPS als Einmalgabe ein mit 55 Leukozyten/min wesentlich höheres „baseline-rolling“ ihrer Kontrolltiere bei gleichzeitig signifikant niedrigerer Anzahl von fest haftenden Leukozyten (Stickern). Dies untermauert einerseits die These der ständigen Immunprotektionsbereitschaft, andererseits zeigt es das nach längerer Versuchsdauer durchaus ein erhöhtes „baseline-rolling“ anzunehmen ist. Zudem konnten Nevière et al. ein für die Endotoxingruppe mit 70 Rollern/min signifikant erhöhtes rolling zeigen und dies mindestens 5 Stunden nach Induktion der Endotoxinämie bei gleichzeitig gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöhten permanent adhärenen sowie emigrierten Leukozyten. Diese Zahlen belegen eindrucksvoll, dass 4-6 Stunden nach LPS-Applikation eine erneute Freisetzung von Leukozyten stattfinden muss, wie es bereits Baatz et al. zeigen konnte und dies nachweislich nicht durch vormals adhärenente Leukozyten<sup>95</sup>.

In unserem Versuch zeigte sich durch die Endotoxingabe eine Verminderung der Anzahl der temporär haftenden Leukozyten (Roller) sowie eine erhöhte Anzahl von fest adhärenen Leukozyten (Sticker). Dies lässt sich auf die Verminderung des Angebotes an im Blut verfügbaren Leukozyten zurückführen, da durch die Endotoxinämie mehr Leukozyten permanent adhärenent werden als aus dem Pool an freifliessenden Leukozyten zum Rolling nachgeliefert werden können. Unsere Ergebnisse mit einem Abfall der Leukozytenzahlen im Blut auf 63% (LPS) respektive 80% (C-1-INH) nach 3 Stunden Versuchsdauer sowie einem Anstieg auf 248% des Ausgangswertes in der Kontrollgruppe nach 90 min. belegen diese These. Auch in der Literatur finden sich zahlreiche Arbeiten, die ein vermindertes Rolling bei gleichzeitigem Abfall der Leukozytenzahlen durch Endotoxinapplikation zeigen und damit diese Interpretation stützen. Bei Baatz et al.<sup>95</sup> zeigte sich nach 4-6 h, bei Traber<sup>73</sup> respektive nach 8-10 h eine Wiederauffüllung des Pools freifliessender Leukozyten begleitet von einem erneuten Anstieg der Rollerzahlen. In Zusammenschau mit der Arbeit von Nevière<sup>41</sup> et al. scheint es also mindestens 4 Stunden zu dauern, bis eine erneute Immunreaktion auf die Endotoxinämie in Form einer vermehrten Granulopoese stattfindet<sup>73</sup>.

Da wir diese Phase in unserem Versuch nicht erreichten, wie sich am maximalen Anstieg der Leukozyten im Blut der Kontrollgruppe nach 90 min und maximalen Abfall in der Endotoxingruppe nach 3 Stunden ablesen lässt, setzten wir die Zahl der adhärenen Leukozyten ins Verhältnis zu den tatsächlich gemessenen Leukozytenzahlen im peripheren Blut. Dadurch wird eine deutlichere Darstellung der Bedeutung eines vermehrten Stickings bei bereits

vermindertem Angebot an Leukozyten im Blut erreicht. Sowohl in der V1- wie auch in der V3-Population zeigte sich eine signifikante Erhöhung des Stickings durch die Endotoxinämie (24fach respektive 20fach) bei wiederum signifikanter Reduktion dieser Erhöhung durch die zusätzliche C1-INH-Gabe um 28%, respektive 35% in den V3-Venolen. Dieser ausgeprägte antiinflammatorische Effekt wurde bereits von anderen postuliert<sup>36</sup> und in einem pretreatment Modell ähnlich dem unseren von Schmidt et al. ebenfalls beschrieben. Dabei ist jedoch anzumerken, dass die Applikation von C1-INH bei Schmidt 30 min vor Versuchsbeginn erfolgte, die Dosen 5 oder 15 U/kg KG im Gegensatz zu 100 U/kg KG in unserem Versuch betragen und nur mesenteriale Venolen untersucht wurden<sup>78</sup>. Auf welche Weise C1-INH zu einer Verminderung der Leukozytenadhärenz führt ist noch unklar. Solvik et al. konnten in einem in vitro-Modell neben einer zu erwartenden Verminderung von C4d, C3d und C5b-9 auch eine dosisabhängige Unterdrückung der E-Selektinexpression aortaler Schweineendothelzellen durch C1-INH nachweisen<sup>96</sup>. Neben seinen indirekten Wirkungen ist dies möglicherweise ein wesentlicher Mechanismus der antiinflammatorischen C1-INH-Wirkung.

Abschliessend sei darauf hingewiesen, dass durch die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe in den verwendeten Dosierungen und durch die Dauer der Mikroskopierintervalle keine photodynamischen Effekte auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion zu erwarten waren. Dies zeigte Steinbauer in einer intravitalmikroskopischen Untersuchung an Hamstern durch die vergleichende Datenerfassung mittels Epi- und Transilluminationmikroskopie<sup>97</sup>.

Einflüsse auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion durch die Makrohämodynamik, bei in allen Gruppen gleichem MAP zu den Messzeitpunkten, waren ebenso wenig zu erwarten.

Erwähnenswert sind an dieser Stelle einige Erkenntnisse aus der Literatur zum Einfluss von NO bzw. der iNOS/eNOS auf die Leukozyten-Endothelinteraktion und die Extravasation.

Aus einem Übersichtsartikel von Hickey et al. lässt sich Folgendes schlussfolgern:

Ein Fehlen (knock-out) bzw. Hemmung der eNOS (konstitutive NO-Synthase) führen zu einer erhöhten Leukozytenadhärenz<sup>98</sup>. Ergebnisse dieser Arbeitsgruppe mit iNOS-knock-out-Mäusen im Endotoxinmodell zeigten ferner eine erhöhte Leukozytenadhärenz bei Fehlen der iNOS.

Durch in vitro Versuche konnten die Autoren ein verändertes Adhäsionsverhalten der Leukozyten aus iNOS-knock-out Mäusen zeigen.

Da in der iNOS-knock-out-Gruppe der aktuellen Untersuchung von Hickey et al. keine vermehrte Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen auftrat, folgern die Autoren, dass die iNOS ihren Einfluss auf die Leukozyten-Endothelinteraktion über ein verändertes Adhäsionsverhalten der Leukozyten ausübt.

Es sei erwähnt, dass bei Stimulation mit 50 µg LPS im gleichen Modell eine signifikante Verminderung von P-Selektin, respektive Erhöhung von VCAM im Darm gefunden wurde. Dies lässt zumindest für höhere LPS-Dosen einen gewissen Einfluss der iNOS auf die endothelial vermittelte Adhärenz vermuten.

Scalia et al. stützen mit einer umfangreichen Arbeit die weitverbreitete These, dass NO die Leukozytenadhärenz vermindert <sup>43</sup>. In einem VEGF(vascular endothelial growth factor)-pretreatment-Modell belegt er den protektiven Effekt von VEGF im Ratten- und ecNOS-knock-out-Mäuse-Modell und belegt durch VEGF erhöhte NO-Gewebespiegel in den Endothelzellen der Aorta.

Neviere konnte durch pulmonale NO-Applikation im Rattenmodell sowohl die Leukozytenadhärenz als auch die Extravasation in postkapillären mesenterialen Venolen senken <sup>41</sup>.

Crouser et al. zeigen in einer Arbeit, dass bereits 2 h nach LPS-Gabe Nekrosen der Darmmukosa gefunden werden, sich jedoch erst nach 4 h signifikant erhöhte iNOS-Werte im Gewebe nachweisen lassen <sup>99</sup>. Sie folgern, dass andere inflammatorische Prozesse und Mikrozirkulationsstörungen in der Frühphase für die Gewebeschädigung verantwortlich zu machen sind und der Einfluss der iNOS erst zu einem späteren Zeitpunkt (hier 4 h) relevant wird.

Andererseits zeigen Baatz und Pleyer in einem Uveitismodell, dass sowohl die unspezifische NOS-Hemmung als auch die Hemmung der iNOS ab 4 h nach LPS-Gabe zu einer signifikanten Reduktion der adhärenenten Leukozyten führt <sup>44</sup>.

Des Weiteren zeigten Boughton et al., dass durch LPS bei Induktion einer calciumunabhängigen NOS (iNOS) nach 2 h und einer damit verbundenen erhöhten Extravasation radioaktiv markierten Albumins nach 3 h auftritt <sup>100</sup>. Die Extravasation konnte durch unspezifische Hemmung der NO-Produktion durch Dexamethason oder L-NAME reduziert werden.

## **6.7 FITC-Extravasation**

Die FITC-Albumin-Extravasation zur Quantifizierung eines experimentellen kapillären Lecks ist ein in den unterschiedlichsten Versuchsanordnungen angewendetes Standardverfahren. Es erscheint uns an dieser Stelle notwendig, durch einen kritischen Blick auf diese Methode vorab auf ihre begrenzte Aussagekraft einzugehen. Aufgrund des operativen Traumas besteht neben einer physiologischen Basisclearance von Makromolekülen und Plasma über die Gefäßwand, im Untersuchungsgebiet stets ein Ausgangsleck.

Es muss daher zunächst ein steady-state als Ausgangswert erreicht werden. Die Dauer der initialen Extravasation und deren Höhe ist nach dem Fick'schen Gesetz dosisabhängig <sup>101</sup>. In unserem Versuch erreichten wir 15 min nach FITC-Gabe einen steady-state. Die im weiteren Verlauf erhobenen Werte stellen relative Veränderungen der FITC-Extravasation im Verhältnis zum anfänglich bereits vorhandenen Leck dar. Renkin und Bekker weisen darauf hin, dass

isolierte Ein-Organ/Gefäßmessungen bzw. in vitro Versuche allgemein höhere Permeabilitäts- und niedrigere Reflexionskoeffizienten ergeben.

Bedingt durch die Auslagerung zeigte sich kein Unterschied zwischen der Extravasation der Kontroll- und Endotoxintiere. C-1-INH konnte dieses, demnach nicht alleine durch LPS induzierte, CLS nach 1 und 2 h Versuchablauf signifikant reduzieren.

Ein durch Photobleaching hervorgerufener Einfluss auf die Werte ist nicht auszuschließen, betrifft jedoch alle Gruppen in gleicher Weise<sup>60</sup>.

Unsere Ergebnisse zur FITC-Extravasation im Mesenterium stehen trotz einer 7- bzw. 14-fach höheren C1-INH-Dosis und gleichzeitiger Gabe von Verum und Noxe, trotz Gegensatz zum pretreatment-Modell, in Einklang mit Schmidt et al.<sup>78</sup>.

Uneinigkeit besteht darüber, wodurch eine erhöhte Extravasation maßgeblich verursacht wird. Schmidt et al. konnten in zahlreichen Untersuchungen eine Korrelation zwischen Anzahl permanent adhärenter Leukozyten und Extravasation zeigen<sup>57, 58</sup>. Ebenso ergab sich diese Korrelation unter Einbezug der transmigrierten Leukozyten bei Neviere et al.<sup>41</sup>. Auch unsere Ergebnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen Leukozytenadhärenz und Extravasation hin. Walther et al. konnte durch die Gabe von Fucoidin die Leukozytenadhärenz signifikant vermindern, während die Extravasation gegenüber der LPS-Gruppe erhöht war (nicht signifikant)<sup>102</sup>. Dies wertet der Autor als Hinweis auf eine leukozytenunabhängige Extravasation. Weitere Arbeiten dieser Arbeitsgruppe belegen eine PAF- und Serotonin-abhängige sowie eine Histamin- bzw. Mastzell-unabhängige leukozytenunabhängige Extravasation<sup>103 - 105</sup>. Eine Übersichtsarbeit von Lentsch geht auf die Frage des leukozytenvermittelten Gefäßschadens ausführlich ein<sup>47</sup>. Es ist hierzu anzumerken, dass die dort genannten Untersuchungen, die eine durch TNF- $\alpha$  und IL-1 leukozytenabhängige erzeugte erhöhte Permeabilität zeigen, allesamt in vitro-Untersuchungen sind. Denkbar ist also auch, dass die leukozytenvermittelte Extravasation in vivo ausgeprägter ist.

Interessanterweise konnte Bevilacqua et al. ebenfalls in vitro zeigen, dass die isolierte Stimulation von Granulozyten mit TNF- $\alpha$  und IL-1 nicht zu einer erhöhten Adhärenz führte, während eine Stimulation der Endothelzellen eine erhöhte Adhärenz ergab<sup>106</sup>.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse und der Ergebnisse von Solvik et al. erscheint die Endothelzelle weniger Substrat der Extravasation als vielmehr Promotor dieses Prozesses zu sein<sup>96</sup>. In diesem Zusammenhang sei auf die Arbeit von Boros et al. hingewiesen<sup>45</sup>. Sie zeigt die Auslösung einer erhöhten Leukozytenadhärenz durch Endothelin, vermutlich ET-A-Rezeptor vermittelt. Verschiedene Arbeiten zeigen ferner eine durch Endothelin (meist ET-A)-Rezeptorblockade verminderte Permeabilität in den unterschiedlichsten Geweben, wie Pankreas, Kolon, Herz und Lunge<sup>46, 107, 108</sup>.

Kurose postuliert, dass sich die durch Endothelin-3 stimulierten venösen Endothelzellen durch ein erhöhtes zytosolisches Calcium kontrahieren und es so zu einer erhöhten Permeabilität kommt<sup>109</sup>. Möglicherweise ist dieser Mechanismus durch nicht-spannungsabhängige Calciumkanäle und ET-B-Rezeptoren gesteuert.

Metcalf et al. zeigen in einem Rattenmodell und Erfassung der Extravasation durch Bestimmung der Plasma-Clearance und des Gewebeplasmavolumens mittels zweier Isotope radioaktiv markierten Albumins, dass sich 3 und 5 h nach Gabe von 3 mg/kg LPS kein erhöhtes Gewebeplasmavolumen in den meisten von ihnen untersuchten Geweben ergab<sup>110</sup>. Diese Daten stehen in direktem Widerspruch zu den von uns und anderen Arbeitsgruppen erhobenen Ergebnissen.

Inwiefern die Leukozytenadhärenz und Emigration ursächlich für die Extravasation sind, sie die Extravasation über die Alteration des Endothels möglicherweise nur verstärkt, oder ob man diese beiden Phänomene eher als parallel ablaufende inflammatorische Prozesse werten muss, kann hier nicht abschliessend geklärt werden.

Wir konnten eine verminderte Leukozytenadhärenz im Sinne eines antiinflammatorischen Effektes des C1-INH feststellen und gleichzeitig eine verminderte Extravasation zeigen. Ob Ersteres Letzteres bedingt oder die durch C1-INH ausgelöste Immunmodulation (s.unten) hierfür massgeblich verantwortlich zu machen ist, kann nicht abschliessend geklärt werden.

## **6.8 Zytokine**

### **6.8.1 Tumor-Nekrose-Faktor-alpha**

TNF-alpha gilt als ein früher Mediator in der Sepsis. TNF-alpha wird von aktivierten Monozyten/Makrophagen sezerniert. Er ist verantwortlich für die klinischen Symptome einer Sepsis wie Fieber, Tachykardie, Vasodilatation und Hyperventilation<sup>73, 111 - 113</sup>.

Durch eine Infusion von Endotoxin kommt es bei gesunden Probanden innerhalb von 30 Minuten zu einem Anstieg der TNF-alpha-Spiegel und einer maximalen Konzentration nach 90 - 120 min<sup>114</sup>.

Er fördert die Adhärenz von Granulozyten am Endothel und ermöglicht hiermit eine Diapedese ins Entzündungsgebiet über die Expression von Adhäsionsmolekülen<sup>62, 115</sup>.

Es kommt zur weiteren Ausschüttung sekundärer proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 und -6 sowie zur Sekretion weiterer sekundärer Mediatoren wie PAF oder Prostaglandinen und NO. Zusammen mit Interleukin-6 aktiviert es die Akute-Phase-Proteine (CRP, Leukozyten-Elastase, Fibrinogen) und die Komplementkaskade<sup>116</sup>.



TNF-alpha wirkt über verschiedene zelluläre Rezeptoren und unterschiedliche Signaltransduktionewege und kann hierdurch zu einer akuten oder chronischen Entzündung führen, aber auch ein Apoptose in der Zielzelle auslösen <sup>117</sup>.

In tierexperimentellen Studien konnte eine Anti-TNF-alpha-Strategie zum Teil die letalen Effekte von Endotoxin positiv beeinflussen. Hierbei zeigt sich, dass es bei einer therapeutischen Intervention auf den Zeitpunkt, aber auch auf die Art des jeweiligen Sepsismodells ankommt. So konnte insbesondere in einem CLP-Modell, das einem eher prolongiertem Sepsismodell entspricht, kein Nutzen der Antagonisierung von TNF-alpha nachgewiesen werden <sup>69, 118</sup>.

In klinischen Studien konnte durch ein Anti-TNF-alpha-Konzept die Mortalität bislang nicht wesentlich beeinflusst werden <sup>119, 120</sup>. Die klinische Bedeutung dieses Mediators unterstreichen Untersuchungen zu TNF-Polymorphismen. Bei homozygoten Allelen, die mit einer erhöhten TNF-alpha-Freisetzung einhergehen, resultiert eine erhöhte Letalität. Bei schwerer Sepsis kam es bei homozygotem TNFB-2 Allel sogar zu einer geschlechtsassoziierten, erhöhten Mortalität <sup>121, 122</sup>.

In der durch uns vorgelegten Untersuchung konnten wir im Rahmen der Endotoxinämie erhöhte TNF-alpha-Spiegel im Serum mittels eines rattenspezifischen ELISA bestimmen. Die Kinetik entspricht im wesentlichen der Kinetik vorheriger Ergebnisse. Ein therapeutischer Effekt liess sich nicht nachweisen. Hervorzuheben ist jedoch der signifikante Unterschied zur Kontrollgruppe. So zeigte sich trotz des operativen Traumas keine ausgeprägte induzierte inflammatorische Reaktion im Sinne einer Zytokinantwort.

Durch Bestimmung dieses Parameters konnte die Wirksamkeit des applizierten Endotoxins eindeutig belegt werden.

### **6.8.2 Interleukin-10**

Durch Applikation des C1-Esterase-Inhibitors im Rahmen der Endotoxinämie kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Konzentration des Interleukin-10 im Serum unserer Versuchstiere.

Welche Rolle wird diesem Zytokin in der Pathophysiologie der Sepsis zugeschrieben ?

Interleukin-10 wird durch TH-2-Lymphozyten und Makrophagen generiert. Es ist ein Inhibitor für die Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen, Lipidmediatoren durch Neutrophile und Makrophagen und verringert den oxidativen Stress, der durch diese Zellen verursacht wird <sup>123 - 126</sup>.

Im Verlauf der Sepsis kommt es zu einer überwiegend prokoagulatorischen Aktivität u.a. durch eine Inhibierung der Fibrinolyse durch erhöhte „plasminogen-activator-inhibitor-1“-Spiegel, der einen schlechten prognostischen Faktor darstellt <sup>127</sup>.

Interleukin-10 inhibiert die Aktivierung von Gewebethromboplastin (tissue factor) als prokoagulatorischen Faktor und hemmt die durch Endotoxin verursachte Hemmung der

Fibrinolyse über erniedrigte PAI-1-Spiegel und moduliert damit die Gerinnung und die Fibrinolyse <sup>128</sup>.

Dies zeigt die Vernetzung von Inflammation und Gerinnung in der Sepsis und könnte ein protektiver Mechanismus dieses Zytokins darstellen.

Seine Wirkung entfaltet Interleukin-10 auf zellulärer Ebene durch eine Inhibierung des nukleären Faktors- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) auf der Ebene der Transkription der Genexpression inflammatorischer Zytokine (u.a. IL- $\beta$ 1, IL-6, IL-8, TNF-alpha) <sup>129</sup>. Es konnte in einem Sepsismodell gezeigt werden, dass exogen appliziertes Interleukin-10 die Mortalität in septischen Tieren reduziert. Desweiteren zeigen Mäuse, die homozygot defizient für die Generierung von Interleukin-10 sind, eine größere Empfindlichkeit im Rahmen einer Endotoxinämie, im Sinne einer 20-fach niedrigeren Dosis zur Auslösung eines septischen und lethalen Schocks, aufweisen <sup>130 - 133</sup>.

Vor Gabe einer sublethalen Dosis von LPS konnte durch Immunoneutralisation von Interleukin-10 eine erhöhte Mortalität ausgelöst werden <sup>134</sup>. Interleukin-10 ist demnach ein anti-inflammatorisches Zytokin welches die pathophysiologischen Abläufe einer Sepsis in protektiver Art und Weise beeinflussen kann.

In einer intravitalmikroskopischen Studie zeigte Hickey et al., im Hinblick auf das anti-inflammatorische Potenzial dieses Zytokins, einen Einfluß auf drei wesentliche pathophysiologische Elemente der Sepsis (Leukozytenaktivierung, hämodynamische Alteration/Dysfunktion, „capillary leakage“).

Interleukin-10 defiziente Mäuse zeigen im Rahmen der Endotoxinämie eine erhöhte Leukozyten-Endothel-Interaktion und eine größere Nettoakkumulation von Leukozyten im Gewebe. Dies könnte über eine Regulation von chemotaktischen Molekülen wie MIP-1-alpha, MIP-2 oder PAF kontrolliert sein <sup>135</sup>.

Die Rekrutierung von Leukozyten kann durch Interleukin-10 auch im Rahmen eines Ischämie-Reperfusionsschadens reduziert werden <sup>136</sup>.

Es kommt bei Endotoxinämie zu einer mikrozirkulatorischen Dysfunktion, die sich zum einen in einer dosisabhängigen Neigung zur Hypotension, aber auch in normotensiven Bereichen in höheren Scherraten ausdrückt und damit eine erhöhte Leukozyten-Endothel-Interaktion ermöglicht. Dies könnte durch eine Hemmung der induzierbaren NO-Synthetase bedingt sein <sup>119</sup>. Endogenes Interleukin-10 reduziert die durch eine Endotoxinämie induzierte kapilläre Leckage. Dies kann zum einen durch die erhöhte Leukozytenaktivierung bei Interleukin-10-defizienz, aber auch durch eine Hemmung der leukozytenunabhängigen Plasmaextravasation bedingt sein. So reguliert Interleukin-10 u.a. Interleukin-8, den plättchenaktivierenden Faktor und Prostaglandin E2 <sup>137</sup>.

Es gibt einige tierexperimentelle Hinweise für eine protektive Funktion des Interleukin-10.

In einem Versuch mit antioxidativer Strategie wurde in einem Pretreatment-Modell die Interleukin-10 Konzentration erhöht<sup>138</sup>. Kotake et al. konnten in einem Endotoxin- und einem Modell der Coecumperforation (CLP) bei antioxidativer Therapie desweiteren eine durch Interleukin-10 vermittelte reduzierte Lethalität nachweisen, die durch einen Antikörper zur Immunoneutralisation von Interleukin-10 aufgehoben werden konnte<sup>139</sup>. In einem weiteren Modell mit intraperitonealer Applikation von LPS konnte durch Melatonin ein immunomodulatorischer Effekt und eine erniedrigte Lethalität bei erhöhten Interleukin-10-Spiegeln gezeigt werden<sup>140</sup>.

Der Phosphodiesterasehemmer Pentoxifyllin zeigt in Endotoxinmodellen eine Vielzahl antiinflammatorischer Effekte und senkt die Letalität. Es kommt zu einer reduzierten Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch eine erniedrigte Phosphorylierung von I $\kappa$ B. Auch hier zeigt sich eine immunmodulatorische Veränderung durch prolongiert erhöhte Interleukin-10-Spiegel<sup>141</sup>.

Es ist zu beachten, dass es sich im Rahmen unserer Versuche um eine Veränderung der Kinetik der endogenen Interleukinspiegel handelt und sich damit von Versuchen unterscheiden, in denen bereits zu Beginn ein erniedrigter endogener Zytokinspiegel vorliegt. Auch wenn dies natürlich für das Aufzeigen von pathophysiologischen Zusammenhängen geeignet sein kann. Bei unseren Versuchen zeigt sich ein im Verlauf erhöhter Interleukin-10 Spiegel, der durch die Applikation des C1-Esterase-Inhibitors bedingt sein kann und im Rahmen unserer Ergebnisse eine anti-inflammatorische Wirkung erzielt haben könnte. Zumindest kann nicht ausreichend differenziert werden, ob die beobachteten antiinflammatorischen Effekte durch eine Hochregulierung einer Interleukin-10 Expression bedingt sein könnten oder durch eine C1-Esterase-Inhibitor vermittelte Komplementinaktivierung erfolgten.

In diesem Zusammenhang sei ferner auf den zeitlichen Verlauf einer Sepsis im Sinne einer Früh- und Spätphase hingewiesen. So kommt es im Verlauf zu einer kompensatorisch, hypoinflammatorischen Sekundärphase. Diese kann bei reduzierter Immunkompetenz auch auf zellulärer Ebene bis zur Anergie und Immunsuppression führen und auf diesem Wege zur Letalität dieses Krankheitsbildes beitragen<sup>142</sup>.

In einer Studie zum Interleukin-10-Polymorphismus konnten Stanilova et al. jedoch auch eine erhöhte Interleukin-10-Konzentration nach Stimulation peripherer mononukleärer Zellen mittels LPS nachweisen<sup>143</sup>. Diese war jedoch mit schwerer Sepsis und einer erhöhten Mortalität assoziiert.

Schröder et al., die sich in einer Studie mit den geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Sepsis beschäftigten, halten im klinischen Kontext einen erhöhten Interleukin-10-Spiegel hingegen für protektiv, da er bei weiblichen, jedoch nicht bei männlichen Patienten mit einer erniedrigten Mortalität einherging<sup>144</sup>.

Weitere Versuche zeigten, dass im Hinblick auf Letalität oder prognostische Faktoren die Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Faktoren im Vordergrund stehen. So

profitieren durch eine Interleukin-10-Substitution männliche aber nicht weibliche Spezies. Eine Substitution dieses Zytokins hatte bei Kontrolltieren sogar negative Einflüsse und kann insofern als eine überschießende antiinflammatorische Situation im Sinne einer Immunsuppression bewertet werden <sup>133, 145</sup>.

### **6.9 Klinische und tierexperimentell beschriebene C1-Esterase-Inhibitor-Wirkungen**

Hack et al. <sup>89</sup> untersuchten, 1992 in Lancet veröffentlicht, 5 Patienten im septischen Schock. Sie erhielten eine Initialdosis von 2000 U C1-INH und im Verlauf 1000 U alle 12 h über 5 Tage. Vier Patienten zeigten unter diesem Regime einen verminderten Vasopressorbedarf. Bei zwei Patienten konnten diese am 2. und 4. Tag abgestellt werden. Es konnten bei diesen Patienten durch die C1-INH-Gabe verminderte C3a und C5a-Werte sowie erhöhte F XII und Präkallikrein-Werte dokumentiert werden. Ein Patient zeigte bei sich verschlechternder hepato-renalener Funktion einen erhöhten Vasopressorbedarf. Bei diesem Patienten waren die F XII und Präkallikreinwerte nicht angestiegen. Alle Patienten überlebten den Beobachtungszeitraum ohne Anzeichen von Nebenwirkungen. Eine Dosissteigerung auf Initial 6000 U und Folgedosen von 3000 und 1000 U zeigte keinen weiteren Nutzen aber auch keine Nebenwirkungen. Ferner zeigte eine dosisäquivalente C1-INH-Gabe, dass eine bis zu 2,7-fach höhere IL-2-Medikation bei onkologischen Patienten möglich war ohne die damit einhergehende Toxizität zu erhöhen. Vermutlich war dies auf die Reduktion des hierbei auftretenden bedrohlichen vascular leakage syndrome zurückzuführen <sup>146</sup>.

Nürnberg und Göbel berichten in Biomedical Progress über 2 pädiatrische Fälle in denen nach Knochenmarkstransplantation durch die C1-INH-Gaben von 60, 2 x 30 und anschliessend 4 x 15 U/kg KG das CLS aufgehoben wurde, der C4d-Wert normalisiert und die C1-INH-Aktivität auf > 140% angehoben werden konnte <sup>147</sup>. Weitere pädiatrische Einzelfallberichte über positive Effekte von C1-INH bei Chemotherapie- oder sepsisinduziertem CLS existieren vom selben Autor <sup>148, 149</sup>.

In der gleichen Ausgabe findet sich eine Untersuchung von Stieh et al. <sup>150</sup>. Unter der Standardtherapie bei Vorliegen eines CLS nach CPB (Kardiopulmonaler Bypass)-Operation erhielten 29 Kinder (5,2 ± 7,6 Monate) initial 300 U C1-INH/kg KG, dann 2 x 150 nach 8 h, 2 x 100 und 2 x 50 U im Abstand von je 8 h. Dieses Protokoll führte insgesamt zu einer klinischen, hämodynamischen und respiratorischen Verbesserung mit Verminderung des Katecholamin- und Volumenbedarfs sowie in vielen Fällen zur Stabilisierung der renalen Funktion unter Furosemid- und Katecholaminreduktion. 11 Patienten zeigten keine Zunahme des Blutdruckes, 3 benötigten weiterhin einen massiven Volumenersatz und 6 Kinder zeigten keine Verbesserung der Nierenfunktion.

Als sehr bedeutsam muss das Auftreten von Thrombosen in der Vena cava (nach Transposition der großen Arterien) in 2 Fällen und einer Nierenvenenthrombose bewertet werden. Trotz

einem verminderten Auftreten des MOV im Vergleich zu einer anderen Studie konnte C1-INH in dieser Studie das Überleben bei MOV nicht beeinflussen.

Neben einem weiteren u.g. tierexperimentellen Bericht sind die hier genannten Nebenwirkungsbeschreibungen die einzigen uns vorliegenden Beschreibungen von Nebenwirkungen der C1-INH-Gabe in bestimmten Dosisbereichen unter experimentellem Einsatz.

Ein weiterer Fallbericht existiert von der Arbeitsgruppe Marx et al.<sup>151</sup>. Bei Vorliegen eines septischen Krankheitsbildes nach kombinierter Leber- und Nierentransplantation wurde initial mit 60, dann mit 30 U/kg KG C1-INH alle 24 h behandelt. Wenige Stunden nach Therapiebeginn zeigte sich eine hämodynamische Stabilisierung, eine Verminderung des Vasopressorbedarfs bei gleichzeitig möglicher negativer Flüssigkeitsbilanzierung. Aufgrund der großen Bedeutung des Komplementsystems für die unterschiedlichsten pathophysiologischen Vorgänge existieren tierexperimentell neben den in den vorangegangenen Kapiteln bereits genannten Arbeiten zahlreiche weitere Untersuchungen zum erfolgreichen Einsatz von C1-INH in verschiedenen Indikationsbereichen. Ein großer Anteil davon beschäftigt sich mit der Fragestellung Mikrozirkulation und Sepsis. Einige davon sollen hier kurz erwähnt werden:

So konnten Kochilas et al. 1997 in einem Rattenmodell bei traumatischem Schockzustand durch die Gabe von 15 U/kg KG C1-INH 10 min posttrauma das Kurzzeitüberleben von 157 auf 248 min verlängern und damit die Überlebensrate von 66% auf 83% erhöhen<sup>152</sup>.

Buerke et al. beschreiben in einem Ischämie/Reperusionsmodell am Herz durch den Einsatz von 100 U/kg KG C1-INH eine verminderte Myeloperoxidaseaktivität im ischämischen Areal sowie eine verminderte P-Selektin- und ICAM-1-Expression als Zeichen einer verminderten Leukozytenadhärenz<sup>153</sup>.

Akita et al. unterstreichen durch eine Ischämie/Reperusionsstudie der Arteria cerebri media bei Ratten im Jahr 2001 den möglichen Nutzen des C1-INH<sup>154</sup>. So wurde 48 h nach Reperfusion durch den Einsatz von 50 U/kg KG C1-INH ein signifikant kleineres Infarktareal sowie eine signifikant verminderte Myeloperoxidaseaktivität gefunden.

Auch für die Leber ist eine protektive C1-INH-Wirkung (100 U/kg KG) im Ischämie/Reperusions-Rattenmodell beschrieben<sup>155</sup>.

Des Weiteren fanden Guerrero<sup>156</sup> in einem pretreatment-Modell mit 500 U C1-INH an Hunden eine Reduktion der endotoxämisch bedingten Hypoxämie im Schock und konsekutivem Lungenversagen.

Scherer et al. untersuchten 1996 in einem durch E.coli induzierten Hyperkoagulationsmodell am Hasen den Einfluss von C1-INH auf hämodynamische- und Gerinnungsparameter<sup>90</sup>.

Dabei zeigte sich durch eine Bolusgabe von 400 U/kg KG C1-INH und weiteren 400 U/4 h eine signifikante MAP-Stabilisierung, eine signifikant verbesserte zentralvenöse Oxygenierung, ein

verminderter AT-III-Abfall sowie eine insgesamt um 30% reduzierte Fibrinablagerung (signifikant in Leber und Lunge). Obwohl sich ein deutlicher Einfluss auf weitere Gerinnungsfaktoren zeigte postulieren die Autoren keine Reduktion des prokoagulatorischen Umsatzes.

Sonntag et al. zeigten in einem Rattenmodell, dass sich durch die Gabe von 200 U/kg KG C1-INH 15 min nach Induktion einer nekrotisierenden Enterokolitis (NEC) weder ein septischer Schock verhindern liess noch ein Unterschied des makroskopischen Gewebeschadens festzustellen war <sup>157</sup>. Da in beiden Gruppen nach 90 min zusätzlich eine Hypoxie durch eine FiO<sub>2</sub>-Reduktion auf 0,05 ausgelöst wurde und keine Hypoxiekontrollgruppe existiert, sind die pathophysiologischen Aussagen nur bedingt verwertbar. Es konnte jedoch bei nachweislich adäquater Substitution auf 116%, bei auf 30% gefallener C1-INH-Aktivität unter NEC, ein signifikant verlängertes Überleben und ein verzögerter Schockverlauf in der Therapiegruppe dokumentiert werden.

Abschliessend sei auf eine Arbeit von Horstick et al. aus dem Jahre 2001 hingewiesen <sup>158</sup>. Hier wurde in einem kardialen Ischämie/Reperfusionsmodell am Schwein durch 40 U/kg KG C1-INH eine Reduktion der Nekrosefläche, von Troponin T, Creatininkinase und der lokalen C3a und C5a-Gewebespiegel festgestellt. Ein weiterer Effekt konnte durch eine Dosissteigerung auf 100 und 200 U nicht erreicht werden. Allerdings zeigten sich bei Dosen von 200 U/kg KG Thromben während der venösen Blutentnahmen als Hinweis auf mögliche ernsthafte Nebenwirkungen.

## 7. Zusammenfassung

Im Rahmen einer Sepsis oder experimentellen Endotoxinämie zeigt sich eine Aktivierung des Gerinnungs-Fibrinolyse-Systems, des Kontakt- und Komplementsystems. Es kommt es zu einer erhöhten Leukozyten-Endothelinteraktion, einer endothelialen Dysfunktion und einem Capillary-leakage-Syndrom. Bei Sepsis-Patienten kann eine verminderte Konzentration des funktionellen C1-Esterase-Inhibitors festgestellt werden. Durch exogene Zufuhr konnte in klinischen und tierexperimentellen Untersuchungen eine Verminderung des capillary leakage und eine hämodynamische Stabilisierung erreicht werden.

Ziel unserer Untersuchungen war die Bestimmung des Einflusses des C1-INH auf hämodynamische, biochemische und intravitalmikroskopische Parameter der Mikrozirkulation unter Endotoxinämie.

Die Untersuchungen wurden in zwei Teilstudien durchgeführt. Zum einen erfolgten Untersuchungen an der Darmwand (Submukosa-Muskularis-Mukosa), des weiteren am Mesenterium.

In beiden Studien bestand in den Verumgruppen nach 90 min ein hyperdynamer Kreislaufzustand, der bis Versuchsende andauerte. Die Hämodynamik blieb durch den C1-INH im Wesentlichen unbeeinflusst.

Es zeigte sich eine Reduktion der funktionellen Kapillardichte der Mukosa des Darmes durch die Endotoxinämie. Die funktionelle Kapillardichte war in der Tunica muscularis circularis im Sinne eines „mismatch“ erhöht. Somit zeigte sich eine typische septische Mikrozirkulationsstörung. Die Gabe von C1-INH konnte die Mukosadurchblutung ohne Einfluss auf dieses „mismatch“ signifikant erhöhen.

Die Endotoxinämie führte zu einer vermehrten Leukozytenadhärenz. C1-INH konnte diese Endotoxinwirkung signifikant vermindern. Nach unseren Erkenntnissen ist dies der erste intravitalmikroskopische Nachweis einer verminderten Leukozyten-Endothel-Interaktion durch C1-INH in postkapillären Venolen der Darmwand.

Die zur Quantifizierung des Capillary-leakage-Syndroms gemessene Plasmaextravasation konnte durch C1-INH ebenfalls reduziert werden. Als biochemischen Parameter einer proinflammatorischen Immunantwort zeigte sich ein erhöhter TNF-alpha-Spiegel in beiden Verumgruppen. Im Gegensatz dazu ergab sich durch die Applikation von C1-INH ein Anstieg der Konzentration des antiinflammatorischen Interleukin-10.

Zusammenschauend könnten diese C1-INH-Wirkungen, insbesondere eines verminderten capillary leakage, entweder auf die verminderte Leukozytenadhärenz oder die beobachtete Immunmodulation zurückzuführen sein. In wie weit die Hemmung des Komplement- und Kontaktsystems für diese Phänomene verantwortlich ist, ist durch die vorliegende Arbeit nicht zu klären. Nach Analyse der Literatur scheint der von uns gefundene erhöhte Interleukin-10-Spiegel in der Frühphase der Sepsis einen positiven Einfluss aufzuweisen. Weitere tierexperimentelle Arbeiten sollten Adhäsionsmoleküle sowie Parameter des Kontakt- und Komplementsystems erfassen.

Ferner stellt sich die Frage nach dem Applikationszeitpunkt. Die wesentlichen Fragen für die klinische Evaluierung sind jedoch die der Relevanz und des zeitlichen Auftretens des C1-INH-Konzentrations-Abfalls im Verlauf der Sepsis. Um diese Fragen zu klären wären zunächst C1-INH sowie IL-10-Spiegel-Messungen im Rahmen einer Sepsis in Korrelation mit klinischen Scores (SOFA, APACHE II, PIRO) wünschenswert. Abschliessend sei auf die beschriebenen prokoagulatorischen Nebenwirkungen des C1-INH als möglicherweise limitierende Größe hingewiesen.



## 8. Literaturverzeichnis

1. Schuster HP, Werdan K. Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen. 3. Auflage ed. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio: Springer, 2000.
2. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* 2007; 33:606-618.
3. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J. Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:617-624.
4. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101:1644-1655.
5. Marx G, Schuerholz T, Reinhart K. New approaches to intensive care for sepsis. *Chirurg* 2005; 76:845-855.
6. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30:580-588.
7. Finfer S, Bellomo R, Lipman J, French C, Dobb G, Myburgh J. Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med* 2004; 30:589-596.
8. Brun-Buisson C. The epidemiology of the systemic inflammatory response. *Intensive Care Med* 2000; 26 Suppl 1:S64-S74
9. Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2002; 28:108-121.
10. Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A, et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA* 1995; 274:968-974.
11. Jaimes F, Garces J, Cuervo J, Ramirez F, Ramirez J, Vargas A, et al. The systemic inflammatory response syndrome (SIRS) to identify infected patients in the emergency room. *Intensive Care Med* 2003; 29:1368-1371.

12. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003; 31:1250-1256.
13. Bannerman DD, Goldblum SE. Direct effects of endotoxin on the endothelium: barrier function and injury. *Lab Invest* 1999; 79:1181-1199.
14. Deitch EA. Bacterial translocation of the gut flora. *J Trauma* 1990; 30:S184-S189
15. Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 1990; 125:403-404.
16. Deitch EA, Specian RD, Berg RD. Endotoxin-induced bacterial translocation and mucosal permeability: role of xanthine oxidase, complement activation, and macrophage products. *Crit Care Med* 1991; 19:785-791.
17. Goris RJ, Boekholtz WK, van B, I, Nuytinck JK, Schillings PH. Multiple-organ failure and sepsis without bacteria. An experimental model. *Arch Surg* 1986; 121:897-901.
18. Schuster JM, Nelson PS. Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease. *J Leukoc Biol* 2000; 67:767-773.
19. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; 274:10689-10692.
20. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* 1999; 11:115-122.
21. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 2001; 413:78-83.
22. Horng T, Barton GM, Medzhitov R. TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat Immunol* 2001; 2:835-841.
23. Henneke P, Golenbock DT. TIRAP: how Toll receptors fraternize. *Nat Immunol* 2001; 2:828-830.
24. Whitworth PW, Cryer HM, Garrison RN, Baumgarten TE, Harris PD. Hypoperfusion of the intestinal microcirculation without decreased cardiac output during live *Escherichia coli* sepsis in rats. *Circ Shock* 1989; 27:111-122.
25. Schirmer WJ, Schirmer JM, Naff GB, Fry DE. Systemic complement activation produces hemodynamic changes characteristic of sepsis. *Arch Surg* 1988; 123:316-321.

26. Zeerleder S, Caliezi C, Redondo M, Devay J, Wuillemin WA. Activation of plasma cascade systems in sepsis: role of C1 inhibitors. *Schweiz Med Wochenschr* 1999; 129:1410-1417.
27. Fearon DT, Ruddy S, Schur PH, McCabe WR. Activation of the properdin pathway of complement in patients with gram-negative bacteremia. *N Engl J Med* 1975; 292:937-940.
28. Hugli TE, Muller-Eberhard HJ. Anaphylatoxins: C3a and C5a. *Adv Immunol* 1978; 26:1-53.
29. Bjork J, Hugli TE, Smedegard G. Microvascular effects of anaphylatoxins C3a and C5a. *J Immunol* 1985; 134:1115-1119.
30. Walport MJ. Complement. Second of two parts. *N Engl J Med* 2001; 344:1140-1144.
31. Opal SM. Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit Care Med* 2000; 28:S77-S80
32. ten Cate H. Pathophysiology of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28:S9-11.
33. Hack CE. Tissue factor pathway of coagulation in sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28:S25-S30
34. Cochrane CG, Revak SD, Wuepper KD, Johnston A, Morrison DC, Ulevitch R. Soluble mediators of injury of the microvasculature; Hageman factor and the kinin forming, intrinsic clotting and the fibrinolytic systems. *Microvasc Res* 1974; 8:112-121.
35. Zbilut JP. Incidence of disseminated intravascular coagulation in patients admitted through the emergency department: a 5 year retrospective study. *Heart Lung* 1980; 9:833-835.
36. Caliezi C, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol Rev* 2000; 52:91-112.
37. Abraham E. Tissue factor inhibition and clinical trial results of tissue factor pathway inhibitor in sepsis. *Crit Care Med* 2000; 28:S31-S33
38. Vincent JL. New therapeutic implications of anticoagulation mediator replacement in sepsis and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 2000; 28:S83-S85
39. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91:3527-3561.

40. Suzuki Y, Deitch EA, Mishima S, Duran WN, Xu DZ. Endotoxin-induced mesenteric microvascular changes involve iNOS-derived nitric oxide: results from a study using iNOS knock out mice. *Shock* 2000; 13:397-403.
41. Neviere R, Mordon S, Marechal X, Buys B, Guery B, Mathieu D, et al. Inhaled nitric oxide modulates leukocyte kinetics in the mesenteric venules of endotoxemic rats. *Crit Care Med* 2000; 28:1072-1076.
42. Kubes P, Granger DN. Nitric oxide modulates microvascular permeability. *Am J Physiol* 1992; 262:H611-H615
43. 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. *FASEB J* 1999; 13:1039-1046.
44. Baatz H, Pleyer U. Modulation of leukocyte-endothelium interaction by nitric oxide synthase inhibitors: effects on leukocyte adhesion in endotoxin-induced uveitis. *Inflamm Res* 2001; 50:534-543.
45. Boros M, Massberg S, Baranyi L, Okada H, Messmer K. Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine. *Gastroenterology* 1998; 114:103-114.
46. Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ, Foitzik T. Effect of endothelin and endothelin receptor blockade on capillary permeability in experimental pancreatitis. *Gut* 2000; 46:390-394.
47. Lentsch AB, Ward PA. Regulation of inflammatory vascular damage. *J Pathol* 2000; 190:343-348.
48. Vestweber D. Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol* 2000; 190:281-291.
49. Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* 1993; 178:449-460.
50. Wuillemin WA, Minnema M, Meijers JC, Roem D, Eerenberg AJ, Nuijens JH, et al. Inactivation of factor XIa in human plasma assessed by measuring factor XIa-protease inhibitor complexes: major role for C1-inhibitor. *Blood* 1995; 85:1517-1526.
51. Nuijens JH, Eerenberg-Belmer AJ, Huijbregts CC, Schreuder WO, Felt-Bersma RJ, Abbink JJ, et al. Proteolytic inactivation of plasma C1- inhibitor in sepsis. *J Clin Invest* 1989; 84:443-450.
52. de Boer JP, Creasey AA, Chang A, Roem D, Eerenberg AJ, Hack CE, et al. Activation of the complement system in baboons challenged with live *Escherichia coli*: correlation with mortality and evidence for a biphasic activation pattern. *Infect Immun* 1993; 61:4293-4301.

53. Ammons WS, Kung AH. Recombinant amino terminal fragment of bactericidal/permeability- increasing protein prevents hemodynamic responses to endotoxin. *Circ.Shock* 1993; 41:176-184.
54. Theuer CJ, Wilson MA, Steeb GD, Garrison RN. Microvascular vasoconstriction and mucosal hypoperfusion of the rat small intestine during bacteremia. *Circ.Shock* 1993; 40:61-68.
55. Gore RW, Bohlen HG. Microvascular pressures in rat intestinal muscle and mucosal villi. *Am.J.Physiol.* 1977; 233:H685-93.
56. Bohlen HG, Gore RW. Preparation of rat intestinal muscle and mucosa for quantitative microcirculatory studies. *Microvasc.Res.* 1976; 11:103-110.
57. Schmidt H, Schmidt W, Muller T, Bohrer H, Bach A, Gebhard MM, et al. Effect of the 21-aminosteroid tirilazad mesylate on leukocyte adhesion and macromolecular leakage during endotoxemia. *Surgery* 1997; 121:328-334.
58. Schmidt H, Schmidt W, Muller T, Bohrer H, Gebhard MM, Martin E. N-acetylcysteine attenuates endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo. *Crit.Care Med.* 1997; 25:858-863.
59. Shigematsu S, Ishida S, Gute DC, Korthuis RJ. Bradykinin prevents postischemic leukocyte adhesion and emigration and attenuates microvascular barrier disruption. *Am J Physiol* 1999; 277:H161-H171
60. Rumbaut RE, Harris NR, Sial AJ, Huxley VH, Granger DN. Leakage responses to L-NAME differ with the fluorescent dye used to label albumin. *Am J Physiol* 1999; 276:H333-H339
61. Laux V, Seiffge D. Mediator-induced changes in macromolecular permeability in the rat mesenteric microcirculation. *Microvasc Res* 1995; 49:117-133.
62. Ley K. Leukocyte adhesion to vascular endothelium. *J Reconstr Microsurg* 1992; 8:495-503.
63. Schmid SG, Zweifach BW, Kovalcheck S. The application of stereological principles to morphometry of the microcirculation in different tissues. *Microvasc.Res.* 1977; 14:303-317.
64. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980; 29:189-201.
65. Baker CC, Chaudry IH, Gaines HO, Baue AE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 1983; 94:331-335.
66. Lang CH, Bagby GJ, Bornside GH, Vial LJ, Spitzer JJ. Sustained hypermetabolic sepsis in rats: characterization of the model. *J Surg Res* 1983; 35:201-210.

67. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun* 1996; 64:4733-4738.
68. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 2000; 13:110-116.
69. Bagby GJ, Plessala KJ, Wilson LA, Thompson JJ, Nelson S. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor-alpha in intravascular and peritonitis models of sepsis. *J Infect Dis* 1991; 163:83-88.
70. Remick D, Manohar P, Bolgos G, Rodriguez J, Moldawer L, Wollenberg G. Blockade of tumor necrosis factor reduces lipopolysaccharide lethality, but not the lethality of cecal ligation and puncture. *Shock* 1995; 4:89-95.
71. Wyler F, Neutze JM, Rudolph AM. Effects of endotoxin on distribution of cardiac output in unanesthetized rabbits. *Am J Physiol* 1970; 219:246-251.
72. Fink MP, Morrissey PE, Stein KL, Clement RE, Fiallo V, Gardiner WM. Systemic and regional hemodynamic effects of cyclo-oxygenase and thromboxane synthetase inhibition in normal and hyperdynamic endotoxemic rabbits. *Circ Shock* 1988; 26:41-57.
73. Traber DL, Flynn JT, Herndon DN, Redl H, Schlag G, Traber LD. Comparison of the cardiopulmonary responses to single bolus and continuous infusion of endotoxin in an ovine model. *Circ Shock* 1989; 27:123-138.
74. Redl H, Bahrami S, Schlag G, Traber DL. Clinical detection of LPS and animal models of endotoxemia. *Immunobiology* 1993; 187:330-345.
75. Evans TJ, Carpenter A, Moyes D, Martin R, Cohen J. Protective effects of a recombinant amino-terminal fragment of human bactericidal/permeability-increasing protein in an animal model of gram-negative sepsis. *J Infect Dis* 1995; 171:153-160.
76. Yoshikawa T, Takano H, Takahashi S, Ichikawa H, Kondo M. Changes in tissue antioxidant enzyme activities and lipid peroxides in endotoxin-induced multiple organ failure. *Circ Shock* 1994; 42:53-58.
77. Lehmann C, Georgiew A, Weber M, Birnbaum J, Kox WJ. Reduction in intestinal leukocyte adherence in rat experimental endotoxemia by treatment with the 21-aminosteroid U-74389G. *Intensive Care Med* 2001; 27:258-263.
78. Schmidt W, Stenzel K, Gebhard MM, Martin E, Schmidt H. C1-esterase inhibitor and its effects on endotoxin-induced leukocyte adherence and plasma extravasation in postcapillary venules. *Surgery* 1999; 125:280-287.
79. Hinshaw LB. Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. *Crit Care Med* 1996; 24:1072-1078.

80. Schmidt H, Secchi A, Wellmann R, Bach A, Bohrer H, Gebhard MM, et al. Effect of endotoxemia on intestinal villus microcirculation in rats. *J Surg.Res* 1996; 61:521-526.
81. Xu D, Qi L, Guillory D, Cruz N, Berg R, Deitch EA. Mechanisms of endotoxin-induced intestinal injury in a hyperdynamic model of sepsis. *J.Trauma*. 1993; 34:676-682.
82. Schmidt H, Secchi A, Wellmann R, Bach A, Bohrer H, Martin E. Dopexamine maintains intestinal villus blood flow during endotoxemia in rats. *Crit.Care Med*. 1996; 24:1233-1237.
83. Minamiya Y, Abo S, Kitamura M, Izumi K, Kimura Y, Tozawa K, et al. Endotoxin-induced hydrogen peroxide production in intact pulmonary circulation of rat. *Am J Respir.Crit Care Med* 1995; 152:348-354.
84. Secchi A, Wellmann R, Martin E, Schmidt H. Dobutamine maintains intestinal villus blood flow during normotensive endotoxemia: an intravital microscopic study in the rat. *J Crit Care* 1997; 12:137-141.
85. Lam C, Tymi K, Martin C, Sibbald W. Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. *J.Clin.Invest*. 1994; 94:2077-2083.
86. Curtis SE, Cain SM. Regional and systemic oxygen delivery/uptake relations and lactate flux in hyperdynamic, endotoxin-treated dogs. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:348-354.
87. Jones CG, Titheradge MA. The effect of treatment of the rat with bacterial endotoxin on gluconeogenesis and pyruvate metabolism in subsequently isolated hepatocytes. *Biochem J* 1993; 289 ( Pt 1):169-172.
88. Hasibeder W, Germann R, Wolf HJ, Haisjackl M, Hausdorfer H, Riedmann B, et al. Effects of short-term endotoxemia and dopamine on mucosal oxygenation in porcine jejunum. *Am J Physiol* 1996; 270:G667-G675
89. Hack CE, Voerman HJ, Eisele B, Keinecke HO, Nuijens JH, Eerenberg AJ, et al. C1-esterase inhibitor substitution in sepsis. *Lancet* 1992; 339:378(8799):990
90. Scherer RU, Giebler RM, Schmidt U, Paar D, Kox WJ. The influence of C1-esterase inhibitor substitution on coagulation and cardiorespiratory parameters in an endotoxin-induced rabbit model of hypercoagulability. *Semin Thromb Hemost* 1996; 22:357-366.
91. Janssen GH, Tangelder GJ, oude EM, Reneman RS. Spontaneous leukocyte rolling in venules in untraumatized skin of conscious and anesthetized animals. *Am J Physiol* 1994; 267:H1199-H1204
92. Fiebig E, Ley K, Arfors KE. Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp*. 1991; 10:127-144.

93. Mayrovitz HN. Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice. *Am J Physiol* 1992; 262:H157-H161
94. Scalia R, Armstead VE, Minchenko AG, Lefer AM. Essential role of P-selectin in the initiation of the inflammatory response induced by hemorrhage and reinfusion. *J Exp Med* 1999; 189:931-938.
95. Baatz H, Pleyer U, Thiel HJ, Hammer C. In vivo study of leukocyte-endothelium interaction in endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995; 36:1960-1967.
96. Solvik UO, Haraldsen G, Fiane AE, Boretti E, Thorsby E, Mollnes TE. C1-inhibitor attenuates human serum induced E-selectin expression of pig aortic endothelial cells. *Transplant Proc* 2001; 33:789-790.
97. Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385:290-298.
98. Hickey MJ, Granger DN, Kubes P. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions: studies in iNOS-deficient mice. *Acta Physiol Scand* 2001; 173:119-126.
99. Crouser ED, Julian MW, Weinstein DM, Fahy RJ, Bauer JA. Endotoxin-induced ileal mucosal injury and nitric oxide dysregulation are temporally dissociated. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:1705-1712.
100. Boughton-Smith NK, Evans SM, Laszlo F, Whittle BJ, Moncada S. The induction of nitric oxide synthase and intestinal vascular permeability by endotoxin in the rat. *Br J Pharmacol* 1993; 110:1189-1195.
101. Renkin EM, Tucker VL. Measurement of microvascular transport parameters of macromolecules in tissues and organs of intact animals. *Microcirculation* 1998; 5:139-152.
102. Walther A, Weihrauch M, Schmidt W, Gebhard MM, Martin E, Schmidt H. Leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia. *Crit Care Med* 2000; 28:2943-2948.
103. Walther A, Yilmaz N, Schmidt W, Bach A, Gebhard MM, Martin E, et al. Role of platelet-activating factor in leukocyte-independent plasma extravasation and mast cell activation during endotoxemia. *J Surg Res* 2000; 93:265-271.
104. Walther A, Yilmaz N, Schmidt W, Bach A, Gebhard MM, Martin E, et al. Methysergide attenuates leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia. *J Crit Care* 2001; 16:121-126.
105. Walther A, Jager M, Secchi A, Schmidt W, Bach A, Martin E, et al. Effects of histamine-1 receptor antagonism on leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia. *J Crit Care* 2001; 16:24-31.



106. Bevilacqua MP, Pober JS, Wheeler ME, Cotran RS, Gimbrone MAJ. Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines. *J Clin Invest* 1985; 76:2003-2011.
107. Filep JG, Sirois MG, Foldes-Filep E, Rousseau A, Plante GE, Fournier A, et al. Enhancement by endothelin-1 of microvascular permeability via the activation of ETA receptors. *Br J Pharmacol* 1993; 109:880-886.
108. Khimenko PL, Moore TM, Taylor AE. Blocked ETA receptors prevent ischemia and reperfusion injury in rat lungs. *J Appl Physiol* 1996; 80:203-207.
109. Kurose I, Miura S, Fukumura D, Tsuchiya M. Mechanisms of endothelin-induced macromolecular leakage in microvascular beds of rat mesentery. *Eur.J.Pharmacol.* 1993; 250:85-94.
110. Metcalf K, Sundqvist T, Lisander B. Intravenous endotoxin does not increase tissue extravasation of albumin in rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 1998; 42:966-973.
111. Fisher CJJ, Opal SM, Lowry SF, Sadoff JC, LaBrecque JF, Donovan HC, et al. Role of interleukin-1 and the therapeutic potential of interleukin-1 receptor antagonist in sepsis. *Circ Shock* 1994; 44:1-8.
112. Horgan MJ, Palace GP, Everitt JE, Malik AB. TNF-alpha release in endotoxemia contributes to neutrophil-dependent pulmonary edema. *Am J Physiol* 1993; 264:H1161-H1165
113. van Deuren M. Kinetics of tumour necrosis factor-alpha, soluble tumour necrosis factor receptors, interleukin 1-beta and its receptor antagonist during serious infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13 Suppl 1:S12-S16
114. Granowitz EV, Santos AA, Poutsika DD, Cannon JG, Wilmore DW, Wolff SM, et al. Production of interleukin-1-receptor antagonist during experimental endotoxaemia. *Lancet* 1991; 338:1423-1424.
115. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76:301-314.
116. Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med* 1996; 24:163-172.
117. Werdan K., Schuster HP, Müller-Werdan U. Sepsis und MODS. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005.
118. Zanetti G, Heumann D, Gerain J, Kohler J, Abbet P, Barras C, et al. Cytokine production after intravenous or peritoneal gram-negative bacterial challenge in mice. Comparative protective efficacy of antibodies to tumor necrosis factor-alpha and to lipopolysaccharide. *J Immunol* 1992; 148:1890-1897.

119. Abraham E, Wunderink R, Silverman H, Perl TM, Nasraway S, Levy H, et al. Efficacy and safety of monoclonal antibody to human tumor necrosis factor alpha in patients with sepsis syndrome. A randomized, controlled, double-blind, multicenter clinical trial. TNF-alpha MAb Sepsis Study Group. *JAMA* 1995; 273:934-941.
120. Reinhart K, Wiegand-Lohnert C, Grimminger F, Kaul M, Withington S, Treacher D, et al. Assessment of the safety and efficacy of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody-fragment, MAK 195F, in patients with sepsis and septic shock: a multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-ranging study. *Crit Care Med* 1996; 24:733-742.
121. Stuber F, Petersen M, Bokelmann F, Schade U. A genomic polymorphism within the tumor necrosis factor locus influences plasma tumor necrosis factor-alpha concentrations and outcome of patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1996; 24:381-384.
122. Schroder J, Kahlke V, Book M, Stuber F. Gender differences in sepsis: genetically determined? *Shock* 2000; 14:307-310.
123. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 1991; 174:1549-1555.
124. Bussolati B, Mariano F, Montrucchio G, Piccoli G, Camussi G. Modulatory effect of interleukin-10 on the production of platelet-activating factor and superoxide anions by human leucocytes. *Immunology* 1997; 90:440-447.
125. Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Burdick MD, Kunkel SL. Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10. *J Immunol* 1994; 152:3559-3569.
126. Kasama T, Strieter RM, Lukacs NW, Lincoln PM, Burdick MD, Kunkel SL. Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis. *J Clin Invest* 1995; 95:2868-2876.
127. Pralong G, Calandra T, Glauser MP, Schellekens J, Verhoef J, Bachmann F, et al. Plasminogen activator inhibitor 1: a new prognostic marker in septic shock. *Thromb Haemost* 1989; 61:459-462.
128. Veltrop MH, Langermans JA, Thompson J, Bancsi MJ. Interleukin-10 regulates the tissue factor activity of monocytes in an in vitro model of bacterial endocarditis. *Infect Immun* 2001; 69:3197-3202.
129. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 1995; 270:9558-9563.

130. Gerard C, Bruyns C, Marchant A, Abramowicz D, Vandenabeele P, Delvaux A, et al. Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177:547-550.
131. Santucci L, Fiorucci S, Chiorean M, Brunori PM, Di Matteo FM, Sidoni A, et al. Interleukin 10 reduces lethality and hepatic injury induced by lipopolysaccharide in galactosamine-sensitized mice. *Gastroenterology* 1996; 111:736-744.
132. Berg DJ, Kuhn R, Rajewsky K, Muller W, Menon S, Davidson N, et al. Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance. *J Clin Invest* 1995; 96:2339-2347.
133. Kahlke V, Dohm C, Mees T, Brotzmann K, Schreiber S, Schroder J. Early interleukin-10 treatment improves survival and enhances immune function only in males after hemorrhage and subsequent sepsis. *Shock* 2002; 18:24-28.
134. Marchant A, Bruyns C, Vandenabeele P, Ducarme M, Gerard C, Delvaux A, et al. Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *Eur J Immunol* 1994; 24:1167-1171.
135. Hickey MJ, Issekutz AC, Reinhardt PH, Fedorak RN, Kubes P. Endogenous interleukin-10 regulates hemodynamic parameters, leukocyte-endothelial cell interactions, and microvascular permeability during endotoxemia. *Circ Res* 1998; 83:1124-1131.
136. Hayward R, Nossuli TO, Scalia R, Lefer AM. Cardioprotective effect of interleukin-10 in murine myocardial ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol* 1997; 334:157-163.
137. Mertz PM, DeWitt DL, Stetler-Stevenson WG, Wahl LM. Interleukin 10 suppression of monocyte prostaglandin H synthase-2. Mechanism of inhibition of prostaglandin-dependent matrix metalloproteinase production. *J Biol Chem* 1994; 269:21322-21329.
138. Yan JJ, Jung JS, Hong YJ, Moon YS, Suh HW, Kim YH, et al. Protective effect of protocatechuic acid isopropyl ester against murine models of sepsis: inhibition of TNF-alpha and nitric oxide production and augmentation of IL-10. *Biol Pharm Bull* 2004; 27:2024-2027.
139. Kotake Y, Moore DR, Vasquez-Walden A, Tabatabaie T, Sang H. Antioxidant amplifies antibiotic protection in the cecal ligation and puncture model of microbial sepsis through interleukin-10 production. *Shock* 2003; 19:252-256.

140. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, Fernandez-Santos JM, Martin-Lacave I, Guerrero JM, et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects. *J Pineal Res* 2005; 39:400-408.
141. Ji Q, Zhang L, Jia H, Xu J. Pentoxifylline inhibits endotoxin-induced NF-kappa B activation and associated production of proinflammatory cytokines. *Ann Clin Lab Sci* 1906; 34:427-436.
142. Bone RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 1996; 125:680-687.
143. Stanilova SA, Miteva LD, Karakolev ZT, Stefanov CS. Interleukin-10-1082 promoter polymorphism in association with cytokine production and sepsis susceptibility. *Intensive Care Med* 2006; 32:260-266.
144. Schroder J, Kahlke V, Staubach KH, Zabel P, Stuber F. Gender differences in human sepsis. *Arch Surg* 1998; 133:1200-1205.
145. Kahlke V, Dohm C, Brotzmann K, Schreiber S, Schroder J. Gender-related therapy: early IL-10 administration after hemorrhage restores immune function in males but not in females. *Shock* 2000; 14:354-359.
146. Ogilvie AC, Baars JW, Eerenberg AJ, Hack CE, Pinedo HM, Thijs LG, et al. A pilot study to evaluate the effects of C1 esterase inhibitor on the toxicity of high-dose interleukin 2. *Br J Cancer* 1994; 69:596-598.
147. Nurnberger W, Heying R, Burdach S, Gobel U. C1 esterase inhibitor concentrate for capillary leakage syndrome following bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 1997; 75:95-101.
148. Nurnberger W, Gobel U, Stannigel H, Eisele B, Janssen A, Delves U. C1-inhibitor concentrate for sepsis-related capillary leak syndrome. *Lancet* 1992; 339(8799):990.
149. Nurnberger W, Michelmann I, Schwamborn D, Laws HJ, Burdach S, Gobel U. Capillary leakage syndrome complicating chemotherapy in an Infant with Wilms tumor. *International Journal of Pediatric Hematology/Oncology* 1995; 2:453-456.
150. Stieh J, Harding P., Scheewe J., Dütschke P., Kramer H.H. Capillary Leak Syndrome after Open Heart Surgery for Congenital Heart Defects: Therapy with C1-Inhibitor. *Biomedical Progress* 1996; 9:13-16.
151. Marx G, Nashan B, Cobas MM, Vangerow B, Schlitt HJ, Ziesing S, et al. Septic shock after liver transplantation for Caroli's disease: clinical improvement after treatment with C1-esterase inhibitor. *Intensive Care Med* 1999; 25:1017-1020.

152. Kochilas L, Campbell B, Scalia R, Lefer AM. Beneficial effects of C1 esterase inhibitor in murine traumatic shock. *Shock* 1997; 8:165-169.
153. Buerke M, Murohara T, Lefer AM. Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995; 91:393-402.
154. Akita N, Nakase H, Kanemoto Y, Kaido T, Nishioka T, Sakaki T. The effect of C1 esterase inhibitor on ischemia: reperfusion injury in the rat brain. *No To Shinkei* 2001; 53:641-644.
155. Lehmann TG, Heger M, Munch S, Kirschfink M, Klar E. In vivo microscopy reveals that complement inhibition by C1-esterase inhibitor reduces ischemia/reperfusion injury in the liver. *Transpl Int* 2000; 13 Suppl 1:S547-S550
156. Guerrero R, Velasco F, Rodriguez M, Lopez A, Rojas R, Alvarez MA, et al. Endotoxin-induced pulmonary dysfunction is prevented by C1-esterase inhibitor. *J Clin Invest* 1993; 91:2754-2760.
157. Sonntag J, Wagner MH, Liu G, Vogel M, Walka MM, Maier RF. Effect of C1-inhibitor in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Biol Neonate* 1999; 76:235-241.
158. Horstick G, Berg O, Heimann A, Gotze O, Loos M, Hafner G, et al. Application of C1-esterase inhibitor during reperfusion of ischemic myocardium: dose-related beneficial versus detrimental effects. *Circulation* 2001; 104:3125-3131.

## 9. Erklärung über Einzelanteile

Kapitel 1, 2, 3 und 4.1- 4.5, 4,7 - 4.8	Oskar Rückbeil und Carsten Hansen
Kapitel 4.6.1	Oskar Rückbeil
Kapitel 4.6.2 und 4.6.3	Carsten Hansen
Kapitel 5.1	Carsten Hansen
Kapitel 5.2	Oskar Rückbeil
Kapitel 5.3	Oskar Rückbeil und Carsten Hansen
Kapitel 6 und 7	Oskar Rückbeil und Carsten Hansen

Unterschrift.....

Unterschrift.....

Oskar Rückbeil

Carsten Hansen

Die oben genannten Angaben werden bestätigt

.....  
Prof. Dr. med Christian Lehmann

## 10. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erklären wir an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation selbständig ausgeführt und keine anderen Hilfsmittel, als die darin aufgeführten, verwendet wurden.

Wir erklären, dass diese Dissertation bisher an keiner anderen Fakultät vorgelegt wurde.

Wir erklären, dass wir bisher keine Promotionsverfahren erfolglos beendet haben und dass eine Aberkennung eines bisher erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt

Berlin, den 12.12.2007

Unterschrift.....

Unterschrift.....

Oskar Rückbeil

Carsten Hansen

## 11. Lebensläufe

### 11.1. Lebenslauf Oskar Rückbeil

Name: Oskar Rückbeil  
geboren am: 10.07.1974 in Heidelberg

#### Beruflicher Werdegang

seit 01.01.2007	Weiterbildung im Sana Klinikum Lichtenberg, Berlin Allgemein- und Viszeralchirurgie, Prof. Dr. med. K. Gellert
01.01.2006 bis 31.12.2006	Rotation im Rahmen der Weiterbildung auf die interdisziplinäre Intensivstation und Besetzung der interdisziplinären Rettungstelle, Leitung Prof. Dr. P. Dorow DRK Kliniken Berlin/Mark Brandenburg – Dr.med. S. Kljucar DRK Kliniken Berlin/Westend
15.04.2005 bis 15.10.2005	Rotation im Rahmen der Weiterbildung in die gefäßchirurgische Abteilung, Dr. med. I. Flessenkämper DRK Kliniken Berlin/Mark Brandenburg
01.01.2005 bis 15.04.2005	Assistenzarzt in der Allgemein-und Thoraxchirurgie PD. Dr. med. P. Schneider DRK Kliniken Berlin/Mark Brandenburg
01.10.2003 bis 31.12.2004	Arzt im Praktikum und Assistenzarzt in der Allgemein-und Thoraxchirurgie, Prof. Dr. med. H.D.Clevert DRK Kliniken Berlin/Mark Brandenburg

#### Ausbildung und Forschung

13.02.2006	Koautor in Critical Care Medicine, Birnbäum J, Hein OV, Lührs C, Rückbeil O, Spies C, Ziemer S, Gründling M, Usichenko T, Meissner K, Pavlovic D, Kox WJ, Lehmann C. 2006 Feb;10(1):R29: „Effects of coagulation factor XIII on intestinal functional capillary density, leukocyte adherence and mesenteric plasma extravasation in experimental endotoxemia“
01.10.2004	Erlangung der Vollapprobation als Arzt



- 23.10.2003 Veröffentlichung im Rahmen der Promotionsarbeit als Koautor in Intensive Care Medicine, Lehmann C, Birnbaum J, Lührs C, Rückbeil O, Spies C, Ziemer S, Gründling M, Pavlovic D, Usichenko T, Wendt M, Kox WJ. 2004; 30 (2):309-314: „Effects of C1 esterase inhibitor administration on intestinal functional capillary density, leukocyte adherence and mesenteric plasma extravasation during experimental endotoxemia“
- 30.06.2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung. Abschluss des Medizinstudiums Freie Universität Berlin
- 29.04.2002 bis 28.03.2003 Praktisches Jahr
- Wintersemester 1995/96 Beginn des Studiums Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
- 04.07.1994 bis 30.09.1995 Zivildienst auf einer endokrinologischen Kinderstation des Olgahospitals Stuttgart
- 17.06.1994 Erlangung der Hochschulreife

Berlin, den 12.12.2007

.....

Oskar Rückbeil

## 11.2 Lebenslauf Carsten Hansen

Name: Carsten Hansen ( geb. Lührs )

geboren am: 05.02.1970 in Friesoythe

### Mai 1989:

Erwerb der allgemeinen Hochschulreife am Herbartgymnasium in Oldenburg

### November 1989 - Januar 1991:

Zivildienst auf der Hals-Nasen-Ohren-Station in den Städt. Kliniken zu Oldenburg

### April 1991- September 1992:

Student an der Freien Universität Berlin ; Studium der Rechtswissenschaften

### Oktober 1992 - September 1995:

Ausbildung zum Krankenpfleger am Rudolf-Virchow-Klinikum mit Abschluß des Staatsexamens

### Oktober 1995 - März 1998:

vorklinischer Studienabschnitt der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin; Physikum

### April 1998 - Februar 2002:

klinischer Studienabschnitt am Universitätsklinikum Benjamin-Franklin in Berlin

### April 2002 - März 2003:

Absolvierung des Praktischen Jahres

### 15.Mai 2003:

3. Staatsexamen

### 01.Oktober - 31.Dezember 2003:

Aufnahme der Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universitätsklinik Greifswald unter der Leitung von Prof. Dr. med. Michael Wendt

### seit 15. Januar 2004:

Fortführung meiner Ausbildung als Arzt im Praktikum im Fachgebiet der Anästhesiologie in der Klinik für Anästhesie, Operative Intensivmedizin und Rettungsmedizin des Klinikums Wolfsburg unter der Leitung von Prof. Dr. med. Matthias Menzel

### seit 01. Oktober 2004:

Assistenzarzt in der Anästhesiologie; Approbation

01. Oktober 2005 - 30.März 2006:

Assistenzarzt in der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie  
DRK Kliniken Berlin Westend unter der Leitung von  
Dr. med. Sascha Kljucar

seit 01. April 2006:

wissenschaftlicher Mitarbeiter der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
der Charité - Campus Benjamin Franklin unter der Leitung von  
Prof. Dr. med. Christoph Stein

Veröffentlichungen:

Postervortrag:

Einfluß von Faktor XIII auf die intestinale Leukozytenadhärenz bei Endotoxinämie  
im Tierexperiment

C. Lührs, O. Rückbeil, Ch. Lehmann, J. Birnbaum, S. Ziemer, W.J. Kox  
Berlin - Mai 2001 - Hauptstadtkongress für Anästhesie und Intensivmedizin

Artikel:

Effects of C1 esterase inhibitor administration on intestinal functional capillary density,  
leukocyte adherence and mesenteric plasma extravasation during experimental  
endotoxemia.

Lehmann C, Birnbaum J, Lührs C, Rückbeil O, Spies C, Ziemer S, Gründling M, Pavlovic D,  
Usichenko T, Wendt M, Kox WJ.: Intensive Care Med. 2004 Feb;30(2):309-14.

Effects of coagulation factor XIII on intestinal functional capillary density, leukocyte  
adherence and mesenteric plasma extravasation in experimental endotoxemia

Birnbaum J, Hein OV, Lührs C, Rückbeil O, Spies C, Ziemer S, Gründling M, Usichenko T,  
Meissner K, Pavlovic D, Kox WJ, Lehmann C.: Crit Care. 2006 Feb; 10(1):R29.

Berlin, den 12.12.2007

.....  
Carsten Hansen

## 12. Danksagung

Unser Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian Lehmann für die interessante Aufgabenstellung und die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft und Anregungen, insbesondere in der schwierigen Phase der Etablierung einer neuen Methode zur Messung der Plasmaextravasation. Wir danken ihm für die sehr gewissenhafte Durchsicht unserer Arbeit und für die stetige Motivierung diese Arbeit zum Abschluss zu bringen.

Wir danken der Klinik für Anästhesiologie der Universität Heidelberg und den Projektleitern der Arbeitsgruppe für intestinale Mikrozirkulation, Herrn Dr. med. Werner Schmidt und Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Walther, die uns im Rahmen unserer Vorversuche zur Untersuchung des Mesenteriums eine Hospitation ihres mikrozirkulatorischen Arbeitsplatzes ermöglichten.

Nicht versäumen möchten wir Herrn Prof. Dr. H. Habazettl am Institut für Physiologie der Freien Universität Berlin für seine Begutachtung unserer ersten Videosquenzen der mesenterialen Plasmaextravasation zu danken.

Frau Dr. Sabine Ziemer vom Institut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie der Charité und Frau B. Egerer danken wir für die Beratung und tatkräftige Unterstützung.

Ein sehr herzlicher Dank gilt unseren Familien und Freunden, die auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und uns in der Erhaltung unserer Freundschaft während der schwierigen experimentellen Zeit stetig unterstützten.