

Aus dem Institut für Physiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

**Effekte der regionalen Sympathikolyse  
auf die Barrierefunktion des Darmes  
in der Endotoxinämie**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Antje Elisabeth Maria Wagner, geb. Elster  
aus Leer (Ostfriesland)

Datum der Promotion: 23.06.2013

## **Meiner Familie**

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	3
<b>1. Einleitung</b> .....	6
<b>1.1 Die epitheliale Barriere des Darms</b> .....	6
<b>1.2 Stickstoffmonoxid und die epitheliale Barriere</b> .....	8
<b>1.3 Sepsis und Endotoxinämie</b> .....	9
<b>1.4 Stickstoffmonoxid in der Endotoxinämie</b> .....	11
<b>1.5 Sympathisches Nervensystem und Inflammation</b> .....	11
<b>1.6 Auswirkungen der Thorakalen Epiduralanästhesie</b> .....	12
<b>1.7 Fragestellung</b> .....	14
<b>2. Material und Methoden</b> .....	16
<b>2.1 Tiere</b> .....	16
<b>2.2 Experimentelles Protokoll</b> .....	16
<b>2.3 Instrumentierung</b> .....	18
2.3.1 Epiduralkatheter.....	18
2.3.2 Halspräparation.....	19
<b>2.4 Ligierte Ileumschlinge</b> .....	19
<b>2.5 Quantifizierung der epithelialen Permeabilität</b> .....	20
<b>2.6 Quantifizierung der Gewebskonzentration von Nitrat und Nitrit</b> .....	20
<b>2.7 Immunhistochemische Quantifizierung der induzierbaren NO-Synthase</b> .....	21
<b>2.8 Histologische Bestimmung der Makrophagen</b> .....	22
<b>2.9 Quantifizierung der endothelialen Permeabilität</b> .....	22
<b>2.10 Quantifizierung der Gewebskonzentration von 8-Isoprostan</b> .....	22
<b>2.11 Statistische Analyse</b> .....	23
<b>3. Ergebnisse</b> .....	24
<b>3.1 Hämodynamische Daten</b> .....	24

3.1.1 Mittlerer arterieller Druck.....	24
3.1.2 Herzfrequenz.....	26
3.1.3 Zentralvenöser Druck.....	27
<b>3.2 Hämatokrit.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Säure-Basen-Status und andere systemische Variablen.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4 Epitheliale Permeabilität.....</b>	<b>31</b>
<b>3.5 Konzentration von Nitrat und Nitrit.....</b>	<b>32</b>
3.5.1 Dünndarm.....	32
3.5.2 Leber.....	33
3.5.3 Lunge.....	34
3.5.4 Niere.....	35
3.5.5 Plasma der Portalvene.....	36
3.5.6 Herz.....	37
<b>3.6 Immunhistochemische Quantifizierung der induzierbaren NO-Synthase im Darm ..</b>	<b>38</b>
<b>3.7 Histologische Bestimmung der Makrophagen im Darm.....</b>	<b>39</b>
<b>3.8 Endotheliale Permeabilität.....</b>	<b>41</b>
<b>3.9 Konzentration von 8-Isoprostan im Dünndarm.....</b>	<b>42</b>
<b>3.10 Lage des Epiduralkatheters.....</b>	<b>42</b>
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Hämodynamische Daten.....</b>	<b>43</b>
4.1.1 Mittlerer arterieller Druck.....	43
4.1.2 Herzfrequenz.....	44
4.1.3 Zentralvenöser Druck.....	45
<b>4.2 Hämatokrit, Hämoglobin-Wert und Blutzellen.....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Säure-Basen-Status.....</b>	<b>46</b>
<b>4.4 Epitheliale Permeabilität.....</b>	<b>47</b>
<b>4.5 Konzentration von Nitrat und Nitrit.....</b>	<b>48</b>

4.5.1 Mechanismus der Immunzellbeeinflussung.....	48
4.5.2 Intrazelluläre Signaltransduktion in der Inflammation .....	51
4.5.3 Molekulare Mechanismen der epithelialen Barriere.....	51
<b>4.6 iNOS-Expression in Makrophagen .....</b>	<b>53</b>
<b>4.7 Endotheliale Permeabilität .....</b>	<b>54</b>
<b>4.8 8-Isoprostan.....</b>	<b>55</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>56</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>58</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>61</b>
<b>8. Anhang .....</b>	<b>73</b>
<b>8.1 Lebenslauf .....</b>	<b>73</b>
<b>8.2 Publikationen .....</b>	<b>74</b>
<b>8.3 Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>75</b>
<b>8.4 Danksagung .....</b>	<b>76</b>

## **1. Einleitung**

### **1.1 Die epitheliale Barriere des Darms**

Der Darm des Menschen und der Säugetiere dient der Zerkleinerung der Nahrung und der anschließenden Aufnahme der einzelnen Bestandteile in den Körper. Hierbei erfüllt das Epithel des Gastrointestinaltraktes die wichtige Aufgabe, die Aufnahme von Stoffen zu selektieren und die feinregulierte Homöostase des Interstitiums vor der völlig anders zusammengesetzten Umgebung des Darmlumens zu schützen.

Die Schädigung einer intakten epithelialen Barriere steht mit einigen Krankheitsbildern in Verbindung, z.B. cholestatischer Ikterus(1), Keratokonjunktivitis sicca(2) und *Graft-versus-Host-disease*(3) oder ist, wie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, eng mit dem Krankheitsverlauf assoziiert(4). Akute Zustände nach Trauma, Hämorrhagie, Verbrennung oder septischer Inflammation werden ebenfalls mit erhöhter Durchlässigkeit der epithelialen Barriere in Verbindung gebracht. So war z.B. die intestinale Permeabilität für oral verabreichte Zuckerlösungen bei Patienten mit Verbrennungen, die zusätzlich eine Infektion erlitten, signifikant erhöht(5). Hämorrhagischer Schock – und damit zelluläre Hypoxie – und oxidativer Stress erhöhten ebenfalls die intestinale epitheliale Permeabilität im Tierversuch(6).

Diese epitheliale Barriere im Darm zeichnet sich durch besondere Verbindungen zwischen den Epithelzellen aus. Neben *Adherens Junctions*, Desmosomen und *Gap Junctions* spielen die *Tight Junctions* (früher *Zonula occludens*, ZO) als die am meisten apikal gelegenen Zell-zu-Zell-Verbindungen eine Hauptrolle in der Schrankenfunktion (s. Abb.1.1). Diese *tight junctions* bestehen aus transmembranären Proteinen wie den Claudinen und Occludin, sowie aus zytoplasmatischen peripheren Membran-Proteinen, die mit dem Aktin-Myosin-Skelett der angrenzenden Zellen verbunden sind (ZO-1, -2, -3). Außerdem gehören die *junctional adhesion molecules* und Tricellulin(7) zu den *tight junction*-Proteinen. Die genannten Proteine regulieren bzw. blockieren den Transport von Lipiden, Proteinen und anderen, auch unerwünschten, Molekülen, namentlich Mikroben und Toxine, vom Darmlumen in den parazellulären Raum, ins Gewebe und die angrenzenden Gefäße und bilden damit eine selektive Permeabilitätsbarriere. Einflüsse auf die *tight junction*-Permeabilität und damit die Kontrolle über die intakte Barriere werden entweder über direkte Veränderung der *tight junction*-Proteine, etwa Phosphorylierung, oder durch Effekte auf das Zytoskelett vermittelt(8).

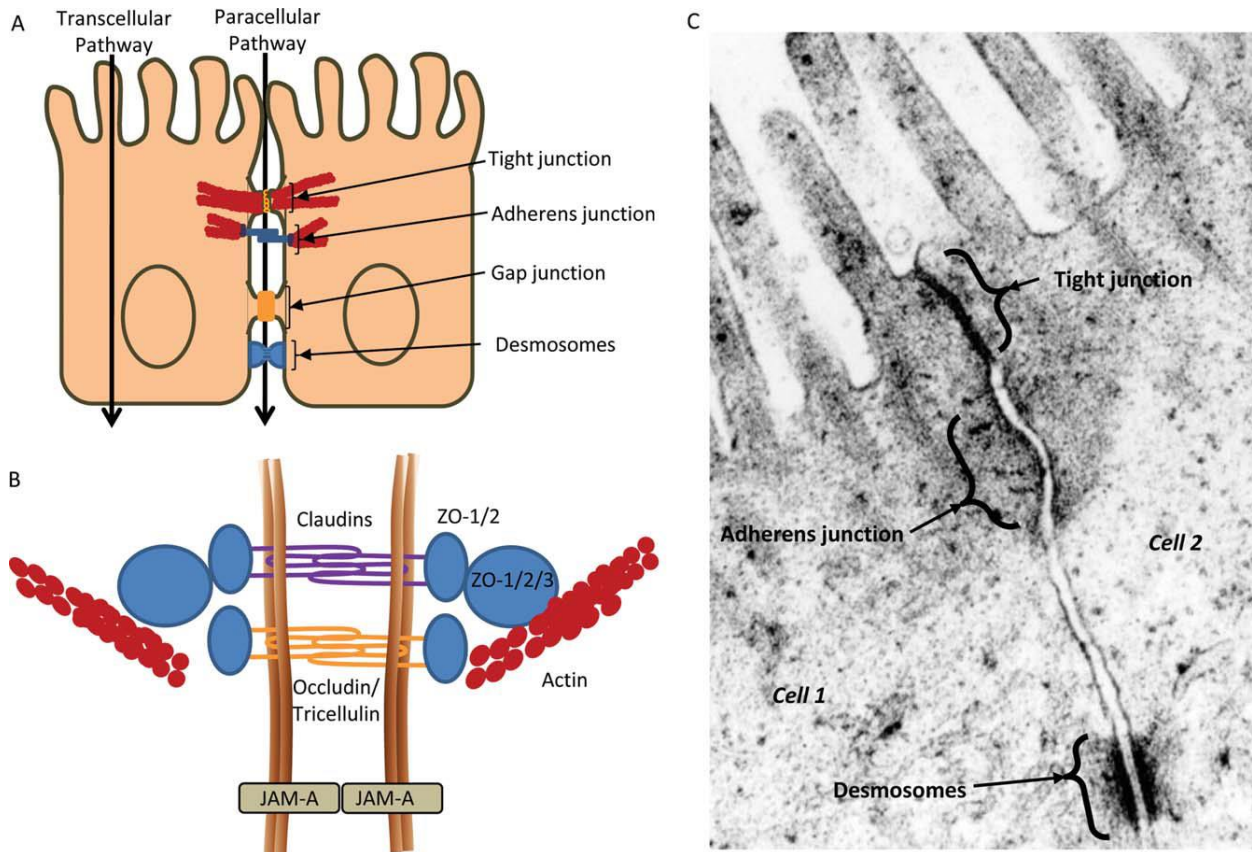


Abb.1.1 modifiziert nach Salim et al(9). A) Darstellung der Zell-Zell-Verbindungen des intestinalen Epithels und der zwei möglichen Wege von Molekülen (transzellulär und parazellulär). B) Aufbau der *tight junctions*. C) Elektronenmikroskopisches Bild der apikalen Zell-Zell-Verbindungen zwischen zwei intestinalen Epithelzellen menschlicher Mukosa des Ileums. Mit freundlicher Genehmigung von John Wiley and Sons.

Die Regulation der *tight junction*-Proteine ist einem komplizierten Regelkreis durch vielfältige Mediatoren unterworfen; hier spielen Wachstumsfaktoren, Medikamente, Hormone und das Immunsystem eine Rolle. Proinflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )(10), Interleukin (IL)-1 $\beta$  und IL-6(11) sorgen für diskontinuierliche Expressierung der *tight junction*-Proteine im Experiment(8) und erhöhen so die Permeabilität. Eine Mischung aus IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  erhöhte in Zellkulturen die Permeabilität durch Stickstoffmonoxid-abhängige und -unabhängige Mechanismen, die den Aufbau der *tight junction*-Proteine veränderten(12).

## 1.2 Stickstoffmonoxid und die epitheliale Barriere

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein gasförmiges freies Radikal, das sehr kurzlebig ist (Halbwertszeit < 15 Sek.)(13). NO wird aus L-Arginin unter Mitwirkung des Enzyms NO-Synthase (NOS) gebildet. 3 Isoformen des Enzyms wurden identifiziert: nNOS (NOS-1) kommt vor allem in neuronalen Zellen vor(14), eNOS (NOS-3) wird in Endothelzellen exprimiert(15). Beide Enzyme werden  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig reguliert(16) und gehören zu den konstitutiven Enzymen.

Dagegen ist die iNOS (NOS-2) nicht ständig vorhanden, ihre Synthese wird induziert. Dies kann in den unterschiedlichsten Entzündungs- und Gewebszellen geschehen, dazu gehören Makrophagen, Endothel-(17) und Nervenzellen, Zellen der glatten Muskulatur des Gefäßsystems(18) und Kupffersche Zellen der Leber(19).

Die Induktion und Regulation der iNOS-Synthese sind hochkomplexe Vorgänge und Gegenstand aktueller Forschung. Anders als die anderen NOS wird dieses Enzym Calcium-unabhängig reguliert(20). Die Bildung von iNOS kann durch proinflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  induziert werden(21;22); es wird postuliert, dass ein lokaler Anstieg von Sauerstoffradikalen in Anwesenheit dieser Zytokine die iNOS induziert, was zu vermehrtem Anstieg von NO-Produkten in Gewebe und Plasma führt(23). Die Regulierung der Enzymsynthese erfolgt über Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- $\kappa$  B, der die Bildung der iNOS induzieren kann(24).

Es wurde postuliert, dass die Hyperpermeabilität des Darmepithels zumindest teilweise über die NO-Produktion vermittelt wird, da die Zytokine, die die *tight junctions* beeinflussen, auch die Synthese der iNOS induzieren können(25).

Die physiologischen Konzentrationen von NO im gesamten Körper, die von den beiden konstitutiven Isoformen des Enzyms gebildet werden, sind eher gering(26). Diese geringe NO-Konzentration hat einen protektiven Effekt auf den Darm, der wahrscheinlich durch erhöhte Perfusion der Mukosa und die Synthese reaktiver NO-Metaboliten mit antimikrobieller Wirkung erzielt wird(27). So wird auch eine Schädigung der Darmbarriere in der frühen Endotoxinämie verhindert(28) und Hemmung der endogenen NO-Produktion durch N<sup>o</sup>-Nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME) resultiert in erhöhter intestinaler Permeabilität(29).

Die Menge von NO, die während der Entzündungsantwort durch iNOS produziert wird, übersteigt die des NO aus der n- und eNOS-Produktion jedoch bei weitem(30). Diese massive Produktion von NO nach Induktion der iNOS scheint den protektiven Effekt der geringeren Konzentration von NO aufzuheben(27).



Eine mukosale Erhöhung der NO-Konzentration steigert die Permeabilität des Epithels und die bakterielle Translokation(31), die als Passage von Mikroorganismen oder deren Anteilen über die intakte intestinale Mukosa definiert ist(27). Nach Inkubation mit NO-Donoren erweiterten sich die *tight junctions* in Zellkulturen, es zeigten sich Desorganisation im Aktin-Skelett, verminderte ATP-Konzentrationen und erhöhte Permeabilität(32). Hemmung der iNOS führte zur Verbesserung der durch E. coli verursachten Änderungen der *tight junction*-Proteine und der mukosalen Barrierefunktion(33).

### **1.3 Sepsis und Endotoxinämie**

Die Sepsis ist eine komplexe systemische inflammatorische Wirtsreaktion auf eine Infektion. Trotz moderner Techniken und verbesserter Behandlungsmöglichkeiten stellen septische Erkrankungen mit einer Inzidenz von 226 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner pro Jahr und insgesamt 60000 Todesfällen pro Jahr noch immer die dritthäufigste Todesursache in Deutschland dar(34). Die genauen Mechanismen der Sepsis bedürfen noch intensiverer Erforschung, um die Therapien zu optimieren und damit die Mortalität und Kosten im Gesundheitssystem zu senken.

Einige dieser Mechanismen sind bereits bekannt. Dazu gehören die Synthese proinflammatorischer Zytokine und die Aktivierung von Immun- und Endothelzellen und des Gerinnungssystems. Diese führen bei komplizierten Fällen zu disseminierter intravasaler Gerinnung (DIC), multiplen Organdysfunktions-Syndrom (MODS) und multiplen Organversagen (MOV). Die Hyperpermeabilität des Darmepithels wird als eine wichtige Komponente des MODS diskutiert(25). Somit spielt der Magen-Darm-Trakt eine wichtige Rolle in der Genese der Sepsis.

Lipopolysaccharide (LPS) sind Bestandteile der Zellwand von gramnegativen Bakterien, die als Endotoxine pathophysiologische Abläufe hervorrufen, welche zum septischen Schock führen können(30). So führen Endotoxine zu Gewebshypoxie(35), zur Aktivierung des Gerinnungssystems, zur Mediatorenbildung und zur Produktion von Eicosanoiden und freien Sauerstoffradikalen. Der Endotoxinschock ist charakterisiert durch Hypotension, erhöhte vaskuläre Permeabilität, Hämokonzentration, gastrointestinale Schäden und intravaskuläre Gerinnung. Diese Schäden werden entweder durch das Endotoxin direkt verursacht, durch

Interaktion des LPS mit dem Endothel oder durch Zytokine, deren Synthese durch das LPS induziert wird(36).

Im Plasma findet eine Bindung des LPS an LPS-bindendes Protein (LBP) statt(37), und dieser Komplex bindet an CD14, ein Protein auf der Oberfläche von Monozyten(38) oder an das lösliche Pendant sCD14 im Blut, das dann Endothelzellen aktiviert(39). Ein weiterer Signalmechanismus entsteht durch die Bindung von LPS an den *Toll-like-Receptor* 4 (TLR4) in Anwesenheit des Moleküls MD-2, und dieser Prozess wird auch durch CD14 beeinflusst(40). Durch diese Bindungen werden Zell-Signalmechanismen in Gang gesetzt, die die Produktion proinflammatorischer Zytokine stimulieren. An der Regulation dieser Signalketten sind u.a. MAP (*mitogen-activated protein*)-Kinasen wie JNK und p38 beteiligt(41).

Endotoxine triggern so die Bildung von Zytokinen, Adhäsions-Molekülen, Sauerstoff- und anderen freien Radikalen(39) aus Immun- und Endothelzellen, das wiederum führt zu gesteigerter epithelialer Permeabilität, zur Steigerung der Leukozyten-Endothel-Interaktion und nachfolgender Extravasation(42). Die Produktion von freien Radikalen führt zu Lipidoxigenierung der Membranen und dadurch zu erhöhter endothelialer Permeabilität mit der Bildung von Gewebsödemen(36). Endotoxine induzieren also die Steigerung der Permeabilität; die nachfolgende Zerstörung der epithelialen Barriere kann die Absorption von toxischen Mediatoren und Mikroorganismen in das splanchnische Gefäßbett begünstigen(43), und die hierdurch aufrechterhaltene bzw. sogar verstärkte Immunantwort des Körpers trägt möglicherweise zum multiplen Organversagen bei(44).

Unter oxidativem Stress versteht man das Ungleichgewicht von freien Sauerstoffradikalen, die zur Oxidation von Lipiden, Membranen und Proteinen in der Lage sind, und deren neutralisierenden Antioxidantien im Gewebe. Die auftretende Zellschädigung kann zu einer Sepsis führen(45), gleichfalls können inflammatorische Stimuli über verschiedene Wege zur vermehrten Bildung freier Sauerstoffradikale führen, so dass die Sepsis auch oxidativen Stress aufrechterhält(46).

Isoprostane sind Prostaglandin-ähnliche Moleküle, die Cyclooxygenase-unabhängig, in Gegenwart freier Radikale, durch Peroxidation aus der Arachidonsäure entstehen(47). Deshalb gelten Isoprostane als gute Marker für oxidativen Stress im Organismus(48).

Die Mechanismen, die oxidativen Stress auslösen können, scheinen zumindest teilweise über das NO-System vermittelt zu werden; so konnte nachgewiesen werden, dass bei iNOS-Knockout-Mäusen in einem Sepsis-induzierten *Acute lung injury*-Modell der pulmonale oxidative Stress ausblieb(49).

### **1.4 Stickstoffmonoxid in der Endotoxinämie**

LPS gilt als Aktivator der iNOS(50) und triggert so die Bildung von NO(39). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Hemmung der NOS bei Mäusen die durch LPS induzierte NO-Produktion, die bakterielle Translokation sowie die Permeabilität des Epithels vermindert wurden(31).

NO aktiviert die Guanylatcyclyase in glatten Muskelzellen der Gefäßwand und vermittelt so über einen Anstieg von cGMP eine Vasodilatation und einen Anstieg der vaskulären Permeabilität(20). Damit ist NO während der Entstehung des septischen Schocks hauptverantwortlich für den Verlust der Gefäßreaktivität, der zur Hypotension führt(51).

Auch kommt es durch diese Störung der endothelialen Funktion zu Mikrozirkulationsstörungen und damit letztendlich zu Gewebsschäden.

### **1.5 Sympathisches Nervensystem und Inflammation**

Das Vegetative Nervensystem ist an der Regulation fast aller Organe und Gewebe im Körper beteiligt und besteht aus drei Komponenten: sympathisch und parasympathisch aus Neuronen des Zentralen Nervensystems und enterisch – hier liegen die Plexus Auerbach und Meissner in der Darmwand und weisen eine dichte Innervation durch Sympathikus(52) über das Ganglion coeliacum und durch den parasympathischen N. vagus auf. Die Organe des Splanchnikusgebiets werden sympathisch durch Nervenfasern aus dem Grenzstrang versorgt; die zugehörigen Nervenkerne liegen im Thorakolumbarmark (Th 1 – L 3). Durch die Innervierung von glattem Muskel, Gefäßen, endokrinen Drüsen, Immunzellen(52) und Enterozyten(53) übt das sympathische Nervensystem (SNS) einen starken Einfluss auf den Magen-Darm-Trakt aus. In der Mukosa der Darmwand im Jejunum und Ileum befinden sich zahlreiche Immunzellen, u.a. organisiert in Form so genannter Peyer'scher Plaques, einer Anhäufung von Lymphfollikeln, die dem Mukosa-assoziierten Lymphgewebe (MALT) zugeordnet sind, ebenfalls vom SNS innerviert werden und eine wichtige Rolle in der lokalen Immunabwehr spielen.

Die Transmitter des SNS sind die Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin. Die Antwort des Körpers auf Stress führt zu erhöhter zentraler SNS-Aktivität, das wiederum führt zu vermehrter Freisetzung peripheren Noradrenalins(54).

Für Schweinedarm haben in-vitro-Experimente gezeigt, dass erhöhte Noradrenalin-Konzentrationen mit verstärkter Adhäsion von Bakterien an der Mukosa assoziiert sind(53) und

die Wachstumsrate kommensal vorhandener E.coli steigern(55). Es wurde auch nachgewiesen, dass  $\alpha$ -adrenerge Innervation zu Darmbarrieren-Fehlfunktion und bakterieller Translokation führt(56). So kann man postulieren, dass die Aktivierung des SNS unter septischen Bedingungen die ohnehin ausgeprägte Vulnerabilität der intestinalen Mukosa und ihrer epithelialen Barriere noch erhöht.

Bei der sympathischen Aktivierung wird die intestinale Perfusion sowohl direkt über die Innervation der mesenterialen und intestinalen Widerstandsgefäße vermindert, als auch über humoral vermittelte Vasokonstriktion durch Noradrenalin aus dem Nebennierenmark. Bei Patienten mit gram-negativer Sepsis wurden im Plasma erhöhte Katecholamin-Spiegel gemessen(57), und es wurde gezeigt, dass während der systemischen Inflammation der Darm ein wichtiger Produktionsort für lokal sezerniertes Noradrenalin darstellt(58).

Das SNS nimmt auch auf Zellebene Einfluss auf die Immunantwort des Körpers. Monozyten mit dem Oberflächenrezeptor CD14 exprimieren  $\beta$ -Adrenorezeptoren und unter bestimmten Bedingungen auch  $\alpha$ -Rezeptoren. Katecholamine inhibieren selektiv die zelluläre Immunantwort auf Monozytenebene (durch die Hemmung von IL-12-Produktion über  $\beta$ -Rezeptoren) und verlagern dadurch das Gewicht auf die humorale Immunantwort(54). So inhibiert Adrenalin die TNF $\alpha$ - & IL-1-Produktion, verstärkt aber die IL-8- & IL-10- Produktion von Monozyten(59).

Ebenso wird unter LPS-Einfluss die Sezernierung von IL-8 aus Monozyten durch  $\beta$ -adrenerge Übermittlung der Katecholamine potenziert(54).

Es wurde aber auch eine über  $\alpha$ -Rezeptoren vermittelte Steigerung der TNF $\alpha$ -Produktion von Maus-Makrophagen durch Noradrenalin gezeigt(60). Die Reaktionen der Zellen nach Aktivierung des SNS fallen also unterschiedlich aus und sind noch nicht vollständig geklärt.

## **1.6 Auswirkungen der Thorakalen Epiduralanästhesie**

Die thorakale Epiduralanästhesie (TEA) stellt eine weit verbreitete Anwendung der Regionalanästhesie bei thorakalen und abdominellen Eingriffen und zur perioperativen Schmerztherapie dar. Die Injektion von Lokalanästhetika in den Epiduralraum führt zu einer reversiblen Blockade nicht nur von sensorischen und motorischen Nervenfasern, sondern auch von Fasern des sympathischen Nervensystems. Abhängig von der epiduralen segmentalen Ausbreitung des Lokalanästhetikums resultiert eine Sympathikolyse in den durch die Spinalnerven innervierten Organen (s. Abb.1.2).

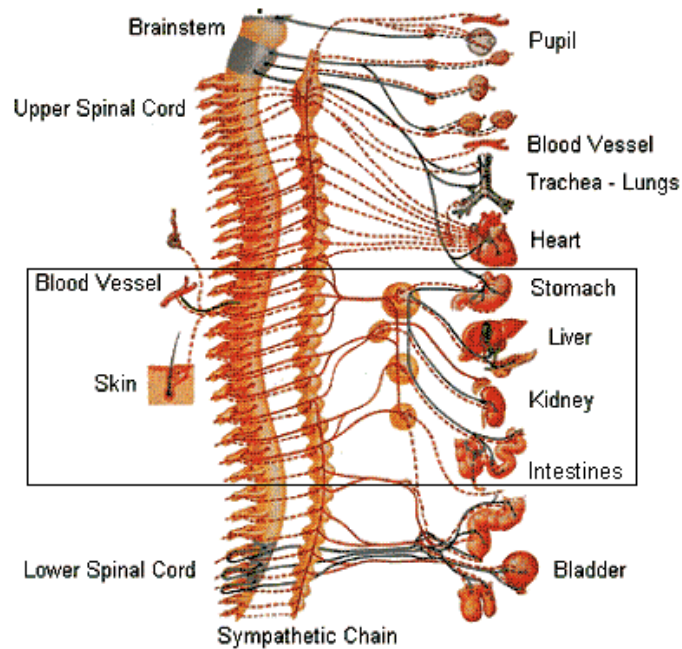


Abb.1.2 modifiziert nach Frank H. Netter, Anatomische Bildtafel Rücken IX, Vegetatives Nervensystem (Novartis). Im Kasten dargestellt die Sympathikolyse der vorliegenden Arbeit mit den betroffenen Organen.

Aufgrund der Verteilung der vegetativen Neurone wird durch die TEA der Sympathikus und nicht der Parasympathikus erreicht, da dessen Nervenkerne im Hirnstamm und im Sakralmark liegen.

Einige positive Wirkungen auf das Splanchnikus-Gebiet durch diese Anästhesiemethode konnten bereits gezeigt werden. So wird durch Epiduralanästhesie die intestinale Paralyse nach großen Baueingriffen wesentlich verkürzt, so dass die Genesung der Patienten schneller vonstatten geht(61). Trotz der vorübergehenden systemischen Hypotension durch verminderten peripheren Gefäßwiderstand wurden positive Effekte der TEA auf die intestinale Perfusion verzeichnet: Die TEA verbesserte im Splanchnikus-Gebiet bei Patienten während Bauchoperationen signifikant den Blutfluss in Ileum und Kolon (62). In Versuchen an Ratten mit experimenteller Sepsis verbesserte die TEA die Mikrozirkulation in der intestinalen Muskularis(63). Eine andere Arbeitsgruppe konnte Verbesserungen in der mukosalen Mikrozirkulation nachweisen(64). Positive Auswirkungen auf die Mikrozirkulation der Ileummukosa fanden sich zudem bei Ratten mit experimenteller Pankreatitis(65). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass unter TEA in der Endotoxinämie bei Ratten die gastrointestinale Durchblutung im Vergleich zu den Kontrolltieren verbessert wurde, ohne die Perfusion anderer wichtiger Organe abzuschwächen(66), und dass die

Hämodynamik bei Schafen mit endotoxämischem Schock durch TEA nicht verschlechtert wird(67).

Bei Kaninchen unter progressiver Hypoxie schwächte TEA die mukosale Azidose ab und verminderte die Translokation von Endotoxinen im portalvenösen Blut(68). In endotoxämischen Kaninchen verminderte TEA die intestinale Permeabilität und den morphologischen intestinalen Schaden(23).

Effekte der TEA auf das Immunsystem zeigten Ratten nach hämorrhagischem Schock und anschließender Volumentherapie: Im terminalen Ileum verhinderte die TEA einen Anstieg des ischämie-induzierten Leukozyten-Rollens in Venolen der Submukosa (69). Zudem wurden günstige Effekte der TEA auf die Stress-induzierte Immunzelldepression berichtet: Bei operierten Patienten wurde durch TEA die postoperative Verschiebung der Relationen der verschiedenen Lymphozyten-Subtypen(70) sowie der Abfall der Aktivität der Lymphokine(71) gehemmt. Die unter Allgemeinanästhesie beobachtete und durch die Operation induzierte Minderung der Monozytenfunktion wurde ebenfalls durch epidurale Anästhesie verhindert(72;73).

## **1.7 Fragestellung**

Die vorgenannten Untersuchungen suggerieren, dass eine sympathische Blockade des Splanchnikus-Gebietes lokale und zirkulierende Immunzellen beeinflussen und somit Einfluss auf den Verlauf des septischen Krankheitsbildes nehmen kann.

Die Schädigung des Darmepithels scheint eine entscheidende Rolle in der Entwicklung und Unterhaltung der Sepsis zu spielen; dabei ist NO aus Gewebemakrophagen zumindest teilweise an der Regulation der mukosalen Barriere beteiligt.

Die Hypothese der vorliegenden Arbeit war, dass die TEA in der normotensiven Endotoxinämie durch Beeinflussung monozytärer Zellen und des von ihnen produzierten NO oxidativen Stress im Gewebe vermindert, dadurch die epitheliale Permeabilität verringert und somit schützend auf die Darmbarriere-Funktion wirkt. Die Untersuchung der Wirkung einer regionalen Sympathikolyse auf die intestinale Barrierefunktion in der Endotoxinämie sollte einen weiteren Beitrag zum besseren Verständnis der Mechanismen und Wirkungsweise der TEA sowie der

Mechanismen der Sepsis-Entstehung leisten. Dieses bessere Verständnis ist Voraussetzung für einen klinischen Einsatz der TEA am kritisch kranken Patienten.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Tiere**

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 297 (+/- 30) g (mittleres Gewicht mit Standardabweichung) verwendet. Bezogen von Charles River, Wiga, Sulzfeld, akklimatisierten sich die Tiere für eine Woche im institutseigenen Tierstall bei 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus, 23 °C und 60 % Luftfeuchtigkeit. Vor dem Versuch hatten die Tiere freien Zugang zu Standardnahrung (Altromin, Lage) und Wasser. Die Tierhaltung und Versuchsdurchführung entsprachen dem deutschen Tierschutzgesetz und wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin unter dem Aktenzeichen G 0184/03 genehmigt.

### **2.2 Experimentelles Protokoll**

Die Versuchstiere wurden mittels einer subkutanen Injektion von Urethan (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) in einer Dosierung von  $1,5 \text{ g} \times \text{kg}^{-1}$  Körpergewicht und intramuskulärer Gabe von Ketamin mit  $50 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$  Körpergewicht (Ketavet, Pharmacia GmbH, Erlangen) anästhesiert. Die Narkose wurde während des weiteren Versuchsverlaufes mit repetitiven intramuskulären Gaben von Ketamin aufrechterhalten.

Nach Einleitung der Allgemeinanästhesie wurden die Tiere instrumentiert. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAD), die Herzfrequenz (HF) sowie der zentralvenöse Druck (ZVD) wurden mithilfe eines Druckwandlers (GOULD Instruments Systems, Puerto Rico) bestimmt und während des gesamten Experimentes aufgezeichnet (Gould Pilot, Gould Instruments, Ballainvilliers, Frankreich). Der Ausgangswert wurde nach Ende der Instrumentierung bestimmt. Eine Flüssigkeitssubstitution erfolgte mittels Gabe von 5 ml NaCl (0,9 %) als Bolus, gefolgt von einer kontinuierlichen Infusion von  $6 \text{ ml} \times \text{Std.}^{-1}$ . Dann wurde die kontrollierte Beatmung (Animal Respirator Advanced 4601-1, TSE Systems GmbH, Bad Homburg) mit einem Sauerstoff-/Luft – Gemisch von 30/70 % gestartet und durch kontinuierliche Bestimmung der CO<sub>2</sub>-Konzentration in der Ausatemluft (TSE Systems GmbH, Bad Homburg) frequenzangepasst. Nach einer Stabilisierungsphase von 15 Min. wurden arterielle Blutgase (Rapid lab, Chiron



Diagnostics, Emeryville, CA, USA) sowie Blutzellen (Coulter AC.T diff<sup>TM</sup> analysator, Coulter Corporation, Miami, Florida, USA) bestimmt.

Dann wurden die Tiere in eine der folgenden drei Gruppen randomisiert:

Gruppe	Bezeichnung	LPS i.v.	Epidurale Infusion	Anzahl
Gruppe 1	LPS (+) / TEA (-)	50 mg × kg <sup>-1</sup>	NaCl 0,9 %, 30 µl × Std. <sup>-1</sup>	16
Gruppe 2	LPS (+) / TEA (+)	50 mg × kg <sup>-1</sup>	Lidocain 2 % 30 µl × Std. <sup>-1</sup>	12
Gruppe 3	LPS (-) / TEA (-)	-	NaCl 0,9 %, 30 µl × Std. <sup>-1</sup>	9

Eine Endotoxinämie wurde durch eine Bolus-Gabe von Escherichia coli-Lipopolysaccharid (LPS, Serotyp 026:B6, Sigma-Aldrich) herbeigeführt. Die Gabe von LPS erfolgte intravenös in einer Dosierung von 50 mg × kg<sup>-1</sup> Körpergewicht in 1 ml NaCl (0,9 %) über 15 Minuten unter Beobachtung des MAD. Bei Gruppe 3 wurde statt LPS NaCl (0,9 %) ohne Zusatz injiziert. Die regionale Sympathikolyse mittels thorakaler Epiduralanästhesie (TEA) erfolgte mit einem Bolus von 30 µl Lidocain – HCl 2 % (B.Braun Melsungen AG, Melsungen), über einen Zeitraum von 7 Min., gefolgt von einer kontinuierliche Infusion mit 30 µl × Std.<sup>-1</sup> mit Hilfe einer Spritzenpumpe (Genie Plus, Kent Scientific, Torrington, CT, USA). In den Gruppen 1 und 3 erfolgten gleichvolumige epidurale Gaben mit NaCl (0,9 %). Über die folgenden 300 Min. wurden MAD, HF und ZVD überwacht und halbstündlich notiert. Nach 300 Min. Endotoxinämie wurden erneut arterielle Blutgase (Rapid lab, Chiron Diagnostics, Emeryville, CA, USA) und Blutzellen (Coulter AC.T diff<sup>TM</sup> analysator, Coulter Corporation, Miami, Florida, USA) bestimmt.

Dann wurde das Abdomen eröffnet und die epitheliale Permeabilität im terminalen Ileum mittels ligierter Schlinge bestimmt. Danach wurden Organe (Dünndarmanteile, Leber, Herz, Lunge und Niere) zur Bestimmung der Nitrat- und Nitrit- und der Isoprostankonzentration, sowie des Quotienten aus Nass- und Trockengewicht (*wet-to-dry-weight ratio*) entnommen. Die Organe für die Gewebskonzentrationsbestimmungen wurden direkt nach Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

Für die immunhistochemische Quantifizierung der induzierbaren NO-Synthase durchliefen jeweils 5 Tiere pro Gruppe das experimentelle Protokoll wie oben beschrieben, bis zum Ablauf der 5 Stunden in Endotoxinämie. Darauf wurden die Ratten zunächst transkardial mit 60 ml warmem NaCl perfundiert, darauf folgte die Perfusion mit 300 ml 4% (w/v) Paraformaldehyd in 0,16 M Phosphatpuffer-Lösung (pH 7,4). Hierauf wurden drei ca. 3 cm lange Darmstücke entfernt.

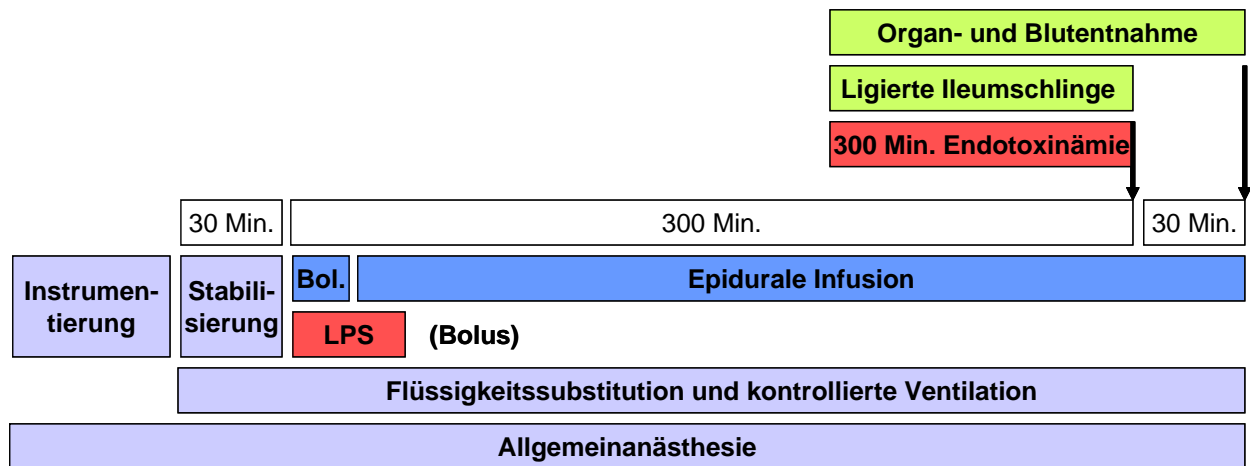


Abb.2.1 Skizze des experimentellen Protokolls.

## 2.3 Instrumentierung

### 2.3.1 Epiduralkatheter

Die Anlage des Epiduralkatheters erfolgte nach einer modifizierten Methode von Bahar(74) mit einem Polyethylen-Katheter (PE 10, innerer Durchmesser 0,28 mm, äußerer Durchmesser 0,61 mm, Becton and Dickinson & Co., Sparks, MD, USA), dessen Totraum durch Einfädeln eines monofilen Fadens (4-0 Ethicon Prolene, Johnson & Johnson GmbH, Düsseldorf) auf 6 µl verkleinert worden war. Bei einer Gesamtlänge von 200 mm wurde der Katheter 65 mm von der Spitze entfernt mit Heißkleber (Pattex hot, Henkel, Düsseldorf) markiert, um eine standardisierte Platzierung der Katheterspitze auf Höhe des thorakalen Segments 7 zu gewährleisten.

Zur Platzierung des Katheters wurden die Processus spinosi L 4 – 6 freipräpariert und der Processus spinosus des 5. Lendenwirbels entfernt. Mithilfe eines Bohrers (Micromat 40/E+, Proxxon, Niersbach) wurde der Wirbelzwischenraum dargestellt und der Epiduralraum mit einer spitzen Pinzette eröffnet. Daraufhin wurde der Katheter in den Epiduralraum nach kranial bis zur Markierung vorgeschoben, der Zugangsweg wieder verschlossen und der Katheter somit fixiert.

Die epidurale Lage und segmentale Höhe der Katheterspitze wurden nach jedem Versuch durch Autopsie bestätigt.

### 2.3.2 Halspräparation

Die Halspräparation umfasste eine Tracheotomie sowie die Kanülierung der Venae iugulares sowie der Arteria carotis. Dazu wurden die entsprechenden Strukturen freipräpariert und mit Polyethenschläuchen kanüliert (Trachea: PAE Mikroschlauch, innerer Durchmesser 1,57 mm, äußerer Durchmesser 2,08 mm; Gefäße: PAE Mikroschlauch, innerer Durchmesser 0,58 mm, äußerer Durchmesser 0,96 mm, Portex, Hythe, Kent, GB). Zur Messung des ZVD im rechten Vorhof wurde der Katheter in der rechten Vena jugularis externa 3,5 cm vorgeschoben. Die Lage der Katheterspitze wurde mittels Autopsie am Ende des Versuchs bestätigt. Um eine permanente Blutdruckmessung zu gewährleisten, wurde der arterielle Katheter mit einer heparinisierten Kochsalzlösung ( $100 \text{ IE} \times \text{ml}^{-1}$ ) gefüllt.

### 2.4 Ligierte Ileumschlinge

Die Präparation einer ligierten Ileumschlinge (*ligated loop*) erfolgte leicht modifiziert nach einer vorbeschriebenen Methode(11;75). Mithilfe eines Elektro-Kauters wurde eine mediane Laparotomie vorgenommen und das Ileum 5 cm oral des ileocecalen Übergangs eröffnet. Um die Inzision wurde eine Doppelligatur gelegt, wobei die proximale Ligatur noch nicht festgezogen wurde. 10 cm weiter oral erfolgte die zweite Inzision, ebenfalls mit einer Doppelligatur, wobei die aborale Ligatur noch nicht festgezogen wurde. Das eröffnete Ileumstück wurde mit warmer Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS, Dulbecco, Biochrom AG, Berlin) durchspült und so von Faeces gereinigt. Die Coecum-nahe Doppelligatur wurde daraufhin festgezogen. Durch die orale Inzision wurde eine Venenverweilkanüle (20 G) eingeführt, um die herum auch die zweite Doppelligatur festgezogen wurde, so dass eine Ileumschlinge von 10 cm entstand. Durch die Verweilkanüle wurde Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat (FITC) – Dextran (Molekulargewicht 4 kD, Sigma-Aldrich) in einer Lösung von 10 mg in 1 ml PBS injiziert. Während der Präparation wurde der Situs mit warmem PBS angefeuchtet und anschließend mit in PBS getränkter Gaze sowie Plastikfolie bedeckt.

Nach 30 Min. Inkubationszeit wurde aus der Pfortader und der Arteria carotis Blut entnommen. Das Blut wurde mit Natriumzitat im Verhältnis 9:1 gemischt, in Eppendorfgefäße überführt und bei 4 °C für 10 Min. bei 20800 x g zentrifugiert. Der Überstand (Blutplasma) wurde bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

## **2.5 Quantifizierung der epithelialen Permeabilität**

Als Maß der epithelialen Permeabilität wurde die FITC – Dextran-Konzentration im Pfortader- und arteriellen Blut bestimmt. Dazu wurden 1:10 Verdünnungen der Plasmaproben in PBS (pH 7,4) hergestellt und die Fluoreszenz dieser Proben in einem Fluoreszenzspektrophotometer (FluoroMax-2, ISA Jobin Yvon, Spex Instruments S.A., Inc., USA) gemessen. Die Berechnung der FITC – Dextran-Plasmakonzentration erfolgte mittels einer Standardreihe, die 0,5 % bovines Albumin (Sigma-Aldrich) enthielt. Standard und Proben wurden bei einer Anregungswellenlänge von 480 nm und Extinktionswellenlänge von 520 nm gegen einen Leerwert von PBS gemessen.

## **2.6 Quantifizierung der Gewebskonzentration von Nitrat und Nitrit**

Analysiert wurde die Konzentration von Nitrat und Nitrit in Dünndarm, Leber, Herz, Portalvenenblut, Niere und Lunge. Die Bestimmung der Gewebskonzentration erfolgte mit einem kommerziellen Kit (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA). Die Organe wurden zunächst mit einem Sonicator in 400 µl PBS homogenisiert. Das Homogenisat wurde zentrifugiert und der Überstand nochmals in Ultrafiltern (10 kDa *cut-off weight*, Microcon YM-10 Centrifugal Filter Unit, Millipore, Billerica, MA, USA) zentrifugiert. Im Filtrat der Organproben sowie in den Plasmaproben wurde zunächst unter Zugabe von Nitratreduktase Nitrat zu Nitrit umgewandelt und darauf durch Zugabe der Griess-Reagenzien (Sulfanylamid und N-(1-Naphthyl)ethylendiamin) das gesamte Nitrit in eine Azoverbindung umgewandelt. Unter Verwendung einer Standardreihe konnte durch die photometrische Bestimmung der Absorption dieses Azofarbstoffes die Nitrit – Konzentration der Proben bestimmt werden. Gemessen wurde die Absorption bei 540 nm mit einem Photometer (Spectra Rainbow Thermo Reader und Magellan Software V 2.22, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim).

## **2.7 Immunhistochemische Quantifizierung der induzierbaren NO-Synthase**

Die nach dem Versuch entnommenen Darmabschnitte wurden für 90 Min. in Paraformaldehyd fixiert und danach über Nacht bei 4 °C in PBS, das 10 % Saccharose enthält, gelagert. Darauf wurde das Gewebe in Tissue-Tek (O.C.T., Miles Inc. Elkhart, Indiana, USA) eingebettet und eingefroren. Die Darmschnitte (8 µm Dicke) wurden auf mit Gelatine beschichteten Objektträgern fixiert.

Die Schnitte wurden immunhistochemisch mit einem kommerziell erhältlichen Vectastain Avidin-Biotin – Peroxidase – Komplex Kit (Vector Laboratories) wie vorbeschrieben<sup>(76)</sup> weiterbehandelt. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Inkubationen bei Raumtemperatur durchgeführt und zum Waschen nach jedem Schritt PBS (dreimal für 10 Min.) verwendet. Die Gewebsschnitte wurden für 45 Min. in PBS mit 0,6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 50 % Methanol inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blockieren. Darauf folgte die Inkubation für 60 Min. in PBS mit 0,3 % Triton X-100, 1 % bovinem Serum-Albumin, 5 % Ziegenerum und 5 % Eselserum (Blocklösung), um nicht-spezifische Bindungen zu hemmen. Die Schnitte wurden danach über Nacht mit Antikörpern gegen die induzierbare NO-Synthase (iNOS) (1:1000) inkubiert, hierauf für 90 Min. mit einem zweiten Antikörper (Ziege gegen Kaninchen, mit Biotin beschichtet) und für nochmals 90 Min. mit Avidin-Biotin-konjugierter Peroxidase inkubiert. Schließlich wurden die Schnitte gewaschen und mit 3',3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB, Sigma), das 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 0,05 M dreifach gepufferte Kochsalzlösung (*Tris-buffered saline*, pH 7.6) enthielt, für 3 – 5 Min. angefärbt.

Nach der Enzymreaktion wurden die auf Objektträgern fixierten Schnitte in Leitungswasser gewaschen, mit Thionin gegengefärbt, in Alkohol dehydriert, in Xylol gereinigt und auf Kunstharz-Medium (DPX, Merck, Darmstadt) fixiert.

Um die Spezifität der Färbung nachzuweisen, wurden Kontrollen einbezogen, indem eine Präabsorption von verdünntem Antikörper gegen iNOS mit synthetischem Peptid-Antigen der iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) für 24 Std. bei 4 °C durchgeführt wurde. Zudem wurden entweder die primären Antisera, der zweite Antikörper oder der Avidin-Biotin-Komplex ausgelassen.

Zur Quantifizierung wurden iNOS-immunreaktive Zellen von einem verblindeten Experimentator in 4 Gewebsschnitten pro Tier gezählt. Fünfzehn Quadrate (à 384 µm<sup>2</sup>) pro Gewebsschnitt wurden mit einem Zeiss Mikroskop (Objektiv X20 x 10) bestimmt. Die Bilder wurden in 200facher Vergrößerung angefertigt.

## **2.8 Histologische Bestimmung der Makrophagen**

Um die Makrophagen zu identifizieren, wurden die Bilder der iNOS-Quantifizierung verwendet und um den Faktor 2 vergrößert, so dass hier mit 400facher Vergrößerung gearbeitet wurde.

Immunreaktive Zellen wurden anhand der folgenden morphologischen Kriterien identifiziert: (1) Makrophagen/Monozyten durch große Zellkörper, vakuolisiertes Zytoplasma und unregelmäßig geformte Zellkerne; (2) Lymphozyten durch kleine Zellkörper, große Zellkerne und eine geringe Menge an Zytoplasma; (3) Polymorphkernige Leukozyten durch große Zellkörper und multisegmentierte Zellkerne. Die Kennzeichnung der Makrophagen erfolgte beispielhaft durch Pfeile.

## **2.9 Quantifizierung der endothelialen Permeabilität**

Um den endothelialen Schaden zu quantifizieren, wurde der Quotient aus Nass- und Trockengewicht (*wet-to-dry weight ratio*) verschiedener Organe bestimmt. Dazu wurden jeweils ein Stück Dünndarm und Leber sowie die linke Niere und die linke Lunge entnommen, gesäubert, gewogen und bei 54 °C in einem Vakuum-Exsikkator inkubiert. Nach 24 Std. wurde das Trockengewicht bestimmt und der Quotient errechnet. Dieser Quotient ist ein Maß für das entstandene Gewebeödem und somit für den endothelialen Schaden.

## **2.10 Quantifizierung der Gewebskonzentration von 8-Isoprostan**

Die Bestimmung der Konzentration von 8-Isoprostan im Dünndarm wurde mittels eines kommerziellen Kits (8-Isoprostane EIA Kit, Catalog No. 516351, Cayman Chemical Company) durchgeführt. Dazu wurden die Darmproben in 1000 µl Homogenisierungspuffer, bestehend aus NaHPO<sub>4</sub>, EDTA und Indomethacin in Reinstwasser, zerkleinert. Nach Zentrifugation bei 20000 g wurde auf der Platte eine kompetitive Bindungsreaktion des im Dünndarm befindlichen freien 8-Isoprostan mit einem 8-Isoprostan-Acetylcholinesterase-Konjugat an 8-Isoprostan-spezifischem Antiserum herbeigeführt. Durch Waschen wurden die nicht gebundenen Komponenten entfernt. Darauf folgte durch Zugabe des Ellman's Reagens, einem Substrat für die Acetylcholinesterase, eine enzymatische Reaktion, deren Produkt eine gelbe Farbe hat und bei 412 nm stark absorbiert. Durch die Absorptionsmessung wurde indirekt die Menge des

gebundenen 8-Isoprostan-Acetylcholinesterase-Konjugats bestimmt; diese ist umgekehrt proportional zur Menge des gebundenen (vorher freien) 8-Isoprostans. Die Absorption wurde bei 405 nm mit dem Photometer (Tecan) gemessen.

## **2.11 Statistische Analyse**

Alle statistischen Tests wurden unter Verwendung des Computerprogramms Sigma Stat 3.1 (Systat Software GmbH, Erkrath) durchgeführt. Die Daten wurden anhand des Kolmogorov-Smirnov Tests auf Normalverteilung geprüft.

Bei den hämodynamischen Daten wurden jeweils die Integrale der Messkurve jedes einzelnen Tieres gebildet (*area under the curve*) und Zwischengruppenvergleiche mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (*One way ANOVA*) getestet. Die Korrektur für multiple Vergleiche wurde mit dem Student-Newman-Keuls-Test durchgeführt. Zum Vergleich von Messwerten und ihrer Ab- und Zunahme an bestimmten Zeitpunkten wurden die Absolutwerte genommen bzw. die Differenzen zweier, aufeinander folgender, Werte gebildet und die daraus entstandenen Mittelwerte mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse oder – bei nicht-normalverteilten Daten – einer Kruskal-Wallis ANOVA *on Ranks* getestet. Auch hier wurden die multiplen Vergleiche mit dem Student-Newman-Keuls- bzw. Dunn's Test korrigiert. Bei der graphischen Darstellung dieser Daten wurde der Übersichtlichkeit halber auf die Kennzeichnung der statistisch signifikanten Unterschiede bei der Ab- und Zunahme der Werte verzichtet; diese sind im Text erläutert.

Die restlichen Daten wurden bei den Vergleichen zwischen den Gruppen und zwischen Anfang und Ende des Versuchs für jede Gruppe mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse bzw. einer Kruskal-Wallis ANOVA *on Ranks* getestet. Die Korrektur für multiple Vergleiche erfolgte mit dem Student-Newman-Keuls- bzw. Dunn's Test.

Normalverteilte Daten wurden als Mittelwert mit Standardabweichung in Blockdiagrammen dargestellt. Nicht normalverteilte Daten wurden mittels *Box-Whisker-Plots* als Mediane mit Quartilen sowie 10. und 90. Perzentile (*whisker*) dargestellt.

In den Tabellen wurde bei nicht-normalverteilten Ergebnissen der Median [25./75. Perzentile] und bei normalverteilten Daten der Mittelwert (+/- Standardabweichung) angegeben.

Unterschiede zwischen Messwerten wurden als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  kleiner als 5 % war.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Hämodynamische Daten**

##### **3.1.1 Mittlerer arterieller Druck**

Im Zeitverlauf ergab die Testung keine Unterschiede zwischen den Gruppen (*area under the curve*-Analyse). Bei den Ausgangswerten zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abb.3.1). Die Injektion des NaCl-Bolus induzierte bei den Tieren aller Gruppen einen vergleichbaren deutlichen Blutdruckanstieg. Nach der Gabe von LPS fiel der Blutdruck in den Gruppen 1 und 2 vorübergehend deutlich ab, normalisierte sich aber wieder bis zur nächsten Messung nach 30 Min. Dagegen führte die Injektion von NaCl ohne LPS in Gruppe 3 zu keiner wesentlichen Blutdruckreaktion. Im weiteren Verlauf traten keine wesentlichen Änderungen des Blutdrucks auf, und auch zwischen den Gruppen gab es nur noch vereinzelte signifikante Differenzen (s. Abb.3.1).



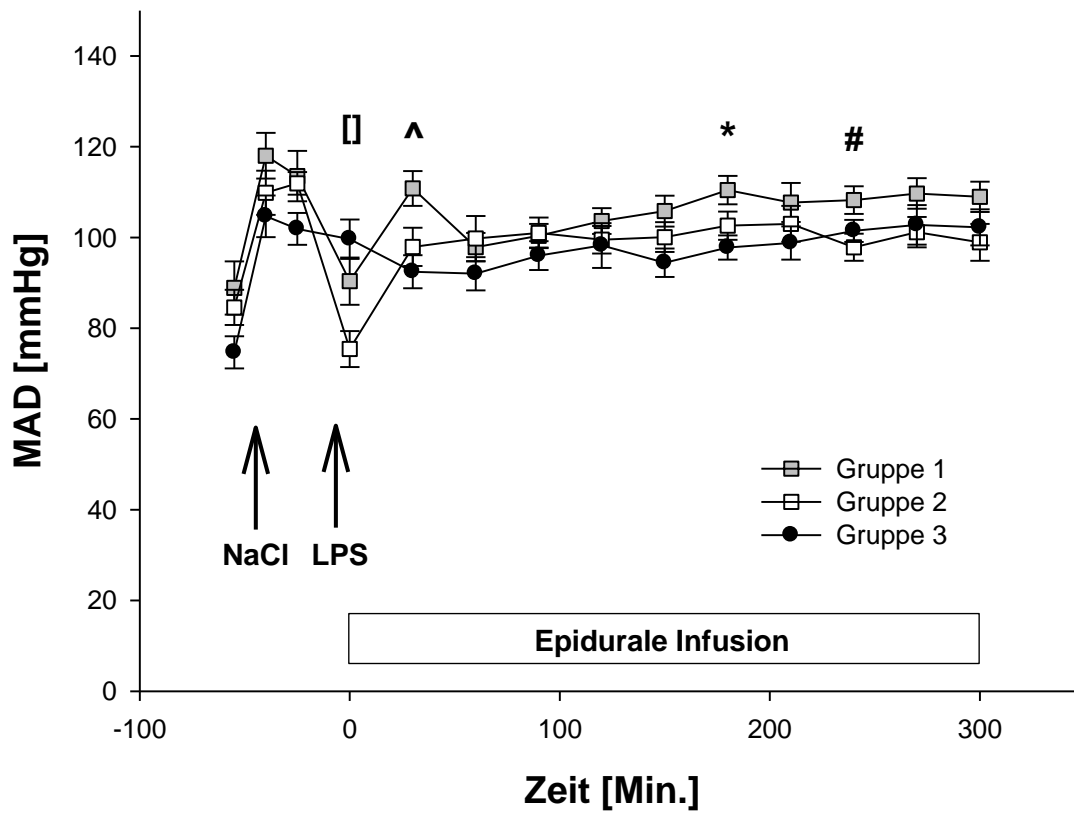


Abb.3.1 Mittlerer arterieller Druck.

MAD = Mittlerer arterieller Druck, NaCl = Natriumchlorid, LPS = Lipopolysaccharid; dargestellt sind Mittelwerte der 3 Gruppen zu jedem der 14 Messzeitpunkte mit Standardfehler.

[]  $p < 0,05$  Gruppe 1 und 3 versus Gruppe 2, ^  $p < 0,05$  Gruppe 2 und 3 versus Gruppe 1

\*  $p < 0,05$  Gruppe 1 versus Gruppe 3, #  $p < 0,05$  Gruppe 1 versus Gruppe 2

### 3.1.2 Herzfrequenz

Zwischen den Gruppen ergab die Testung über den Versuchsverlauf keine signifikanten Unterschiede (AUC-Analyse) (Abb.3.2). Bei den Ausgangswerten zeigten die Tiere in Gruppe 3 eine höhere Herzfrequenz als die in Gruppe 1 und 2.

Die Gabe von NaCl induzierte bei allen Gruppen eine Zunahme der Herzfrequenz, nach dem LPS-Bolus fiel diese in Gruppe 1 und 2 etwas ab. In Gruppe 3 gab es diesen Abfall der Herzfrequenz nicht, diese Tiere hatten auch kein Endotoxin erhalten. Die Herzfrequenz der Tiere in Gruppe 1 und 2 stieg nach LPS- und epiduralem Bolus wieder an, um nach 60 Min. das Niveau von Gruppe 3 zu erreichen. Während der restlichen Zeit des Versuchs unterschied sich die Herzfrequenz zwischen den drei Gruppen nicht voneinander.

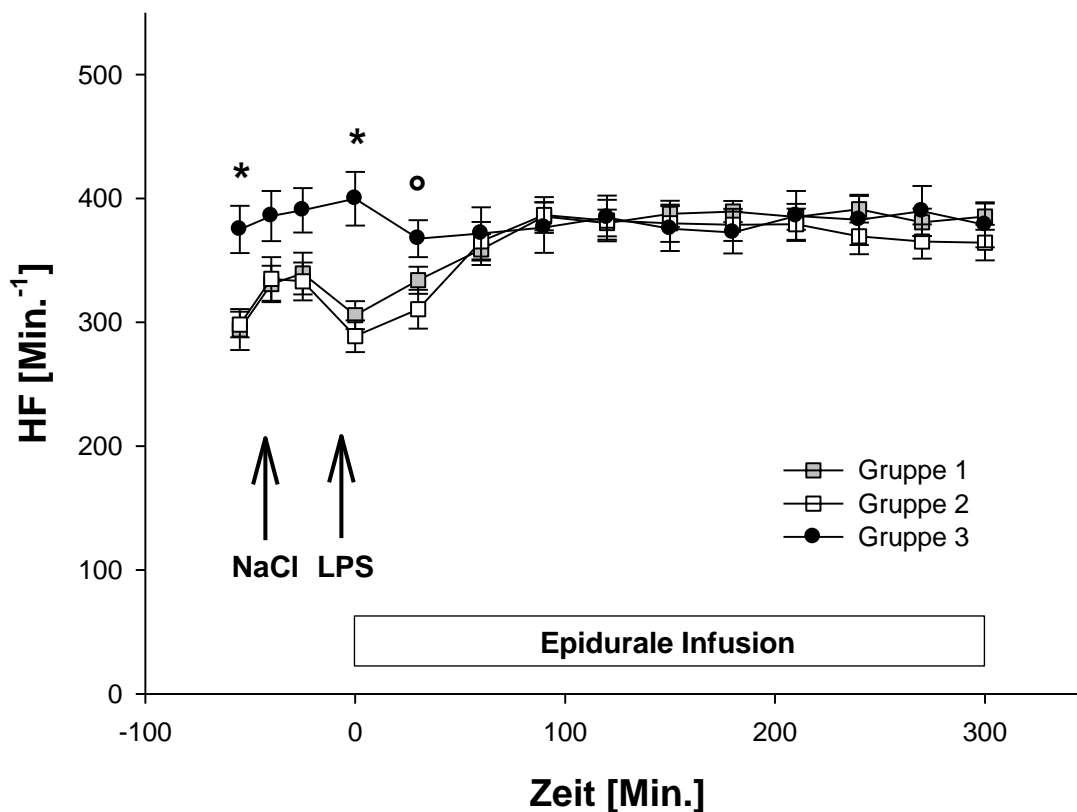


Abb.3.2 Herzfrequenz.

HF = Herzfrequenz, NaCl = Natriumchlorid, LPS = Lipopolysaccharid; dargestellt sind Mittelwerte der Gruppen zu den 14 Messzeitpunkten mit Standardfehler.

\*  $p < 0,05$  Gruppe 1 und 2 versus Gruppe 3, °  $p < 0,05$  Gruppe 2 versus Gruppe 3

### 3.1.3 Zentralvenöser Druck

Bei Ausgangsbedingungen lagen die Werte für den Zentralvenösen Druck (ZVD) in allen Gruppen bei ca. 1,5 mmHg (Abb.3.3). Die Injektion des NaCl-Bolus bewirkte in allen Gruppen einen leichten mittleren Anstieg, der jedoch nicht Signifikanzniveau erreichte. Im weiteren Verlauf blieb der ZVD im Wesentlichen unverändert und zeigte auch keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

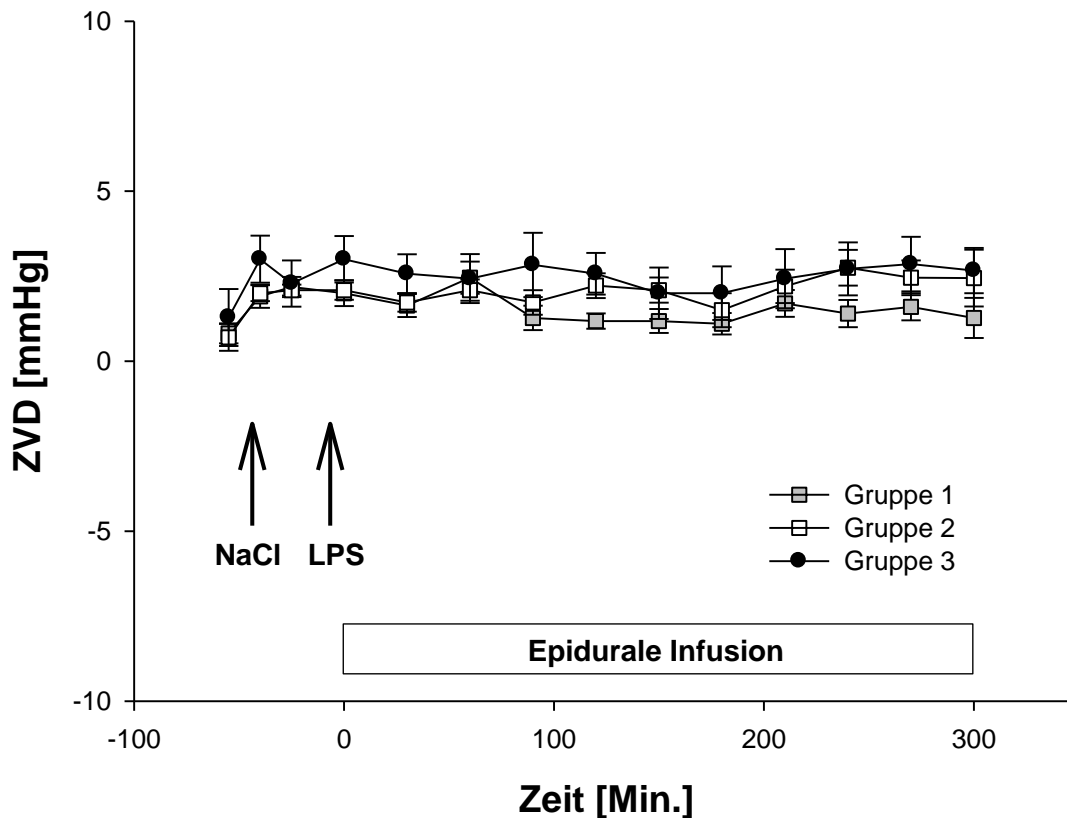


Abb.3.3 Zentralvenöser Druck.

ZVD = Zentralvenöser Druck, NaCl = Natriumchlorid, LPS = Lipopolysaccharid; dargestellt sind Mittelwerte der Gruppen zu den 14 Messzeitpunkten mit Standardfehler.

### 3.2 Hämatokrit

Die Ausgangswerte zeigten keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen. Am Ende des Versuchs war in allen Gruppen der Hämatokrit im Vergleich zum Ausgangswert gesunken, in den Gruppen 1 und 2 war der Unterschied signifikant (Abb.3.4).

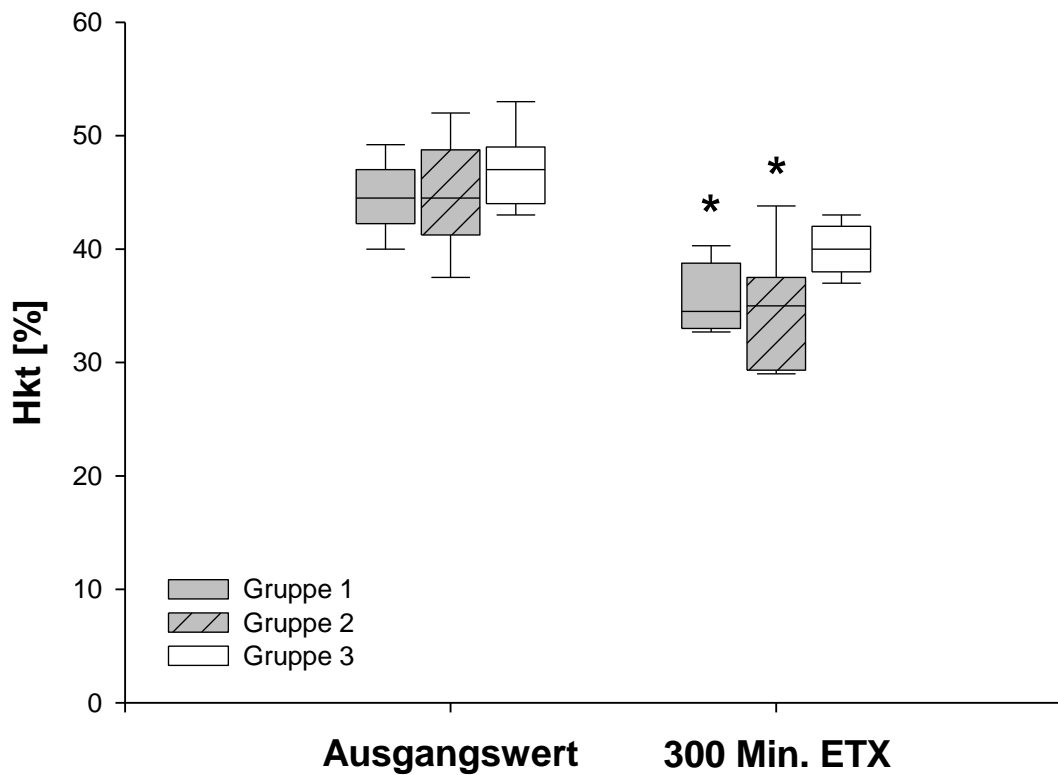


Abb.3.4 Hämatokrit.

Hkt = Hämatokrit, ETX = Endotoxinämie; dargestellt sind Mediane mit Quartilen sowie 10./90.

Perzentile (whisker) zu den zwei Messpunkten.

\*  $p < 0,05$  zum Ausgangswert

### 3.3 Säure-Basen-Status und andere systemische Variablen

	Ausgangswert	nach 300 Min. ETX
<b>pO<sub>2</sub> [mmHg]</b>		
Gruppe 1	227 [166/260]	256 [198/282]
Gruppe 2	243 [220/263]	281 [267/289] §
Gruppe 3	216 [170/256]	209 [164/252]
<b>pCO<sub>2</sub> [mmHg]</b>		
Gruppe 1	40,6 [39,4/46,1]	37,3 [35,7/40,1]
Gruppe 2	43,0 [41,9/44,4]	42,6 [35,9/48,1]
Gruppe 3	40,0 [38,5/44,5]	42,2 [35,0/43,8]
<b>pH</b>		
Gruppe 1	7,39 (+/- 0,05)	7,33 (+/- 0,04) *‡
Gruppe 2	7,37 (+/- 0,03)	7,28 (+/- 0,04) *
Gruppe 3	7,40 (+/- 0,04)	7,34 (+/- 0,04) *‡
<b>Basenüberschuss [mmol/l]</b>		
Gruppe 1	0,55 [-0,50/1,00]	-6,25 [-7,55/-4,15] *§
Gruppe 2	0,20 [-0,88/0,65]	-7,20 [-7,88/-5,80] *§
Gruppe 3	0,40 [-0,75/1,05]	-4,20 [-5,70/-3,30] *
<b>Na<sup>+</sup> [mmol/l]</b>		
Gruppe 1	139 [138/141]	142 [141/142] *
Gruppe 2	139 [137/140]	142 [141/143] *
Gruppe 3	138 [137/139]	141 [140/141]
<b>K<sup>+</sup> [mmol/l]</b>		
Gruppe 1	4,56 [4,37/5,17]	4,37 [3,97/4,93]
Gruppe 2	4,77 [4,54/5,08]	4,93 [4,66/5,41]
Gruppe 3	4,95 [4,70/5,03]	4,42 [4,28/5,28]
<b>Hämoglobin [mmol/l]</b>		
Gruppe 1	7,45 [7,30/8,15]	6,50 [5,75/6,85] *
Gruppe 2	7,35 [7,15/7,90]	6,35 [5,60/6,70] *
Gruppe 3	7,60 [7,43/8,43]	6,50 [6,40/7,20]
<b>Erythrozyten [x 10<sup>6</sup> / µl]</b>		
Gruppe 1	6,82 (+/- 0,60)	5,85 (+/- 0,54) *§
Gruppe 2	6,68 (+/- 0,68)	5,57 (+/- 0,57) *§
Gruppe 3	7,23 (+/- 0,90)	6,47 (+/- 0,45)
<b>Thrombozyten [x 10<sup>3</sup> / µl]</b>		
Gruppe 1	961 [887/1020]	672 [598/714] *§
Gruppe 2	914 [824/988]	611 [515/645] *§
Gruppe 3	973 [891/1104]	894 [810/990]

<b>Leukozyten [<math>\times 10^3</math> / <math>\mu\text{l}</math>]</b>		
Gruppe 1	10,5 [8,45/12,1]	8,70 [7,70/10,5] §
Gruppe 2	9,90 [9,18/13,0]	7,70 [6,55/8,90] §
Gruppe 3	16,3 [11,1/17,8]	15,0 [13,7/17,2]

Tab.3.1 Säure-Basen-Status und andere systemische Variablen.

ETX = Endotoxinämie; dargestellt sind Mittelwerte der jeweiligen Variable mit Standardabweichung bzw. Mediane mit Quartilen.

\*  $p < 0,05$  zum Ausgangswert, §  $p < 0,05$  versus Gruppe 3, ‡  $p < 0,05$  versus Gruppe 2

Die in der Tabelle 3.1 dargestellten Ausgangswerte zeigten im Zwischengruppenvergleich der jeweiligen Variablen keine signifikanten Unterschiede.

Der Sauerstoffpartialdruck in Gruppe 2 am Ende des Versuchs war signifikant höher als in Gruppe 3.

Die pH-Werte nahmen im Vergleich zum Ausgangswert in allen drei Gruppen ab. Gruppe 2 unterschied sich am Versuchsende von den beiden anderen Gruppen.

Der Basenüberschuss war nach Ablauf der 5 Stunden in allen drei Gruppen gegenüber dem Ausgangswert gefallen. Die Werte in den Gruppen 1 und 2 waren negativer als in Gruppe 3.

Die Natriumserumkonzentration nahm in den Gruppen 1 und 2 gegenüber dem Ausgangswert signifikant zu, die Werte am Versuchsende waren zwischen allen Gruppen jedoch vergleichbar.

Die Hämoglobin-Werte nach 5 Stunden Endotoxinämie waren in allen Gruppen gegenüber den Ausgangswerten gefallen; dieser Unterschied erreichte in den Gruppen 1 und 2 Signifikanzniveau.

Die Erythrozyten-Zahl sowie die Thrombozyten-Zahl waren in den Gruppen 1 und 2 nach 5 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert signifikant gesunken; diese beiden Gruppen unterschieden sich zum Ende auch jeweils von Gruppe 3.

Die Leukozyten-Zahl in den Gruppen 1 und 2 war zu diesem Zeitpunkt signifikant niedriger als in Gruppe 3.

### 3.4 Epitheliale Permeabilität

Die Konzentration von FITC-Dextran im Blut der Portalvene war in Gruppe 1 signifikant höher als in den Gruppen 2 und 3. Die FITC-Dextran-Konzentration im Blut der A. carotis war in Gruppe 1 ebenfalls signifikant höher als in Gruppe 3. Gruppe 2 und 3 unterschieden sich bei den Messungen in beiden Gefäßen nicht (Abb.3.5).

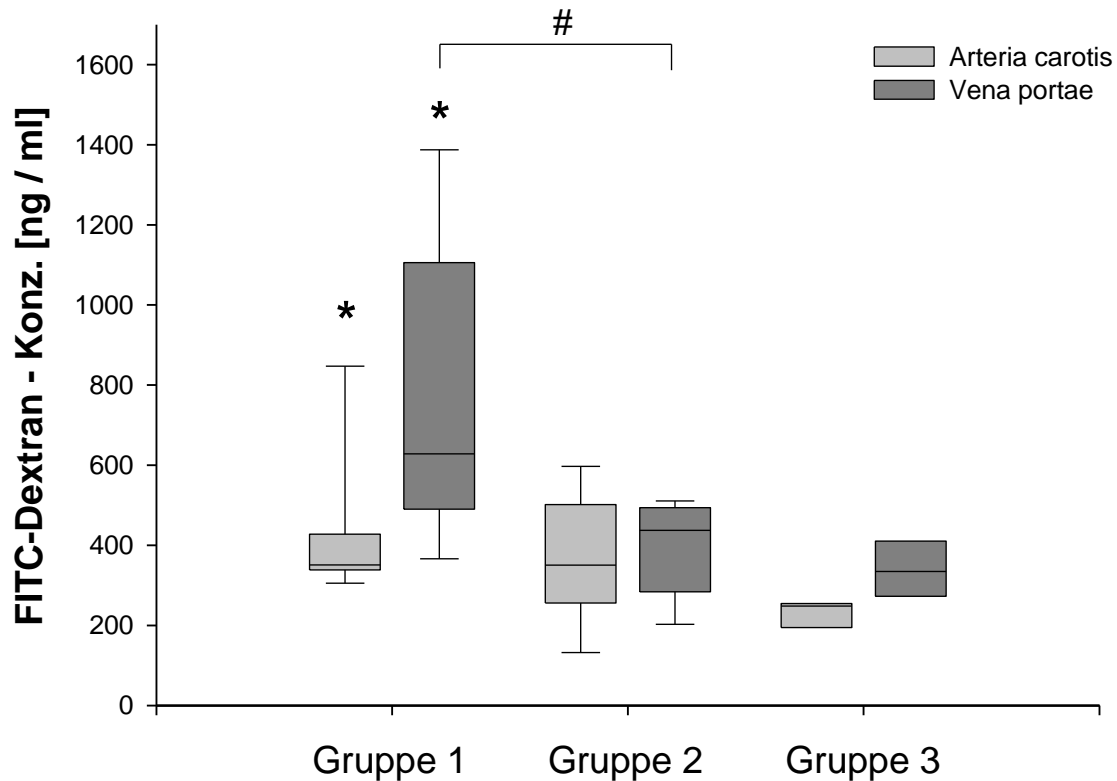


Abb.3.5 Konzentration von FITC-Dextran in Arteria carotis und Vena portae nach 300 Min. Endotoxinämie.

FITC = Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat; dargestellt sind Mediane mit Quartilen und 10./90. Perzentile.

\*  $p < 0,05$  zu Gruppe 3, #  $p < 0,05$

### 3.5 Konzentration von Nitrat und Nitrit

#### 3.5.1 Dünndarm

Die Gewebskonzentration von Nitrat/Nitrit im Dünndarm war in Gruppe 1 und 2 signifikant höher als in Gruppe 3 (Abb.3.6).

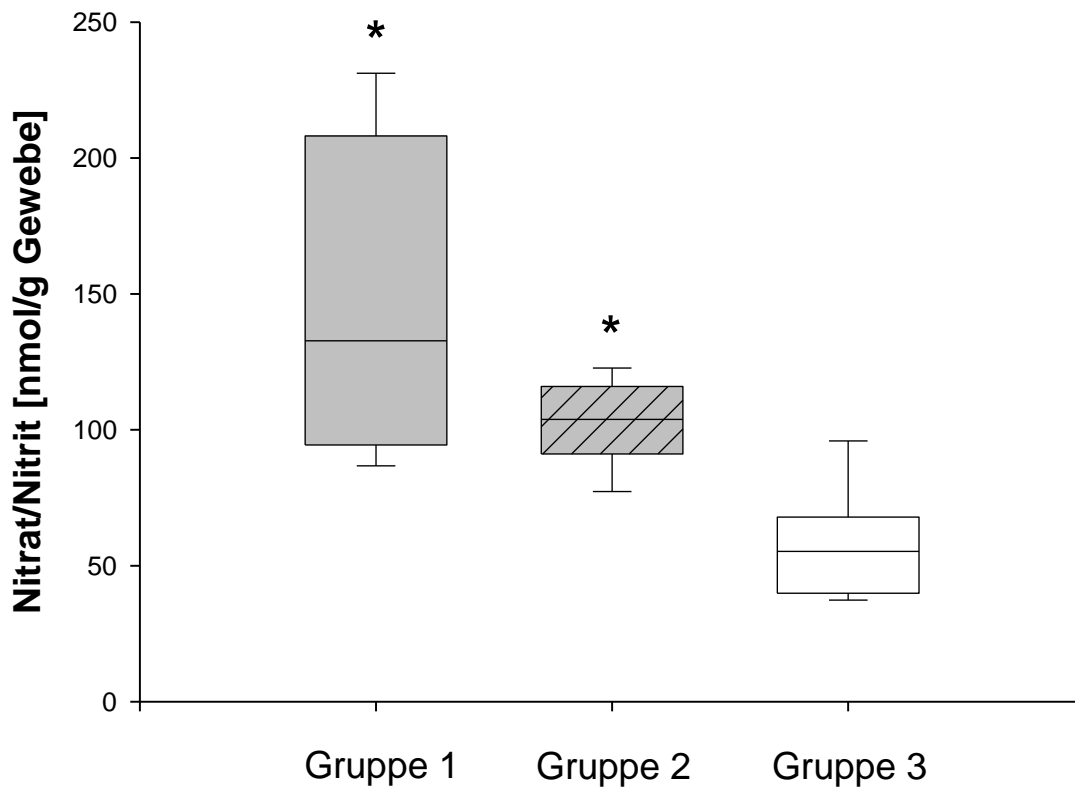


Abb.3.6 Konzentration von Nitrat/Nitrit im Dünndarm.

Box Plots stellen Mediane, Quartilen und 10./90. Perzentile dar.

\*  $p < 0,05$  zu Gruppe 3



### 3.5.2 Leber

Die Gewebskonzentration von Nitrat/Nitrit der Leber war in Gruppe 1 signifikant gegenüber Gruppe 3 erhöht (Abb.3.7). Gruppe 2 und 3 unterscheiden sich hier nicht voneinander.

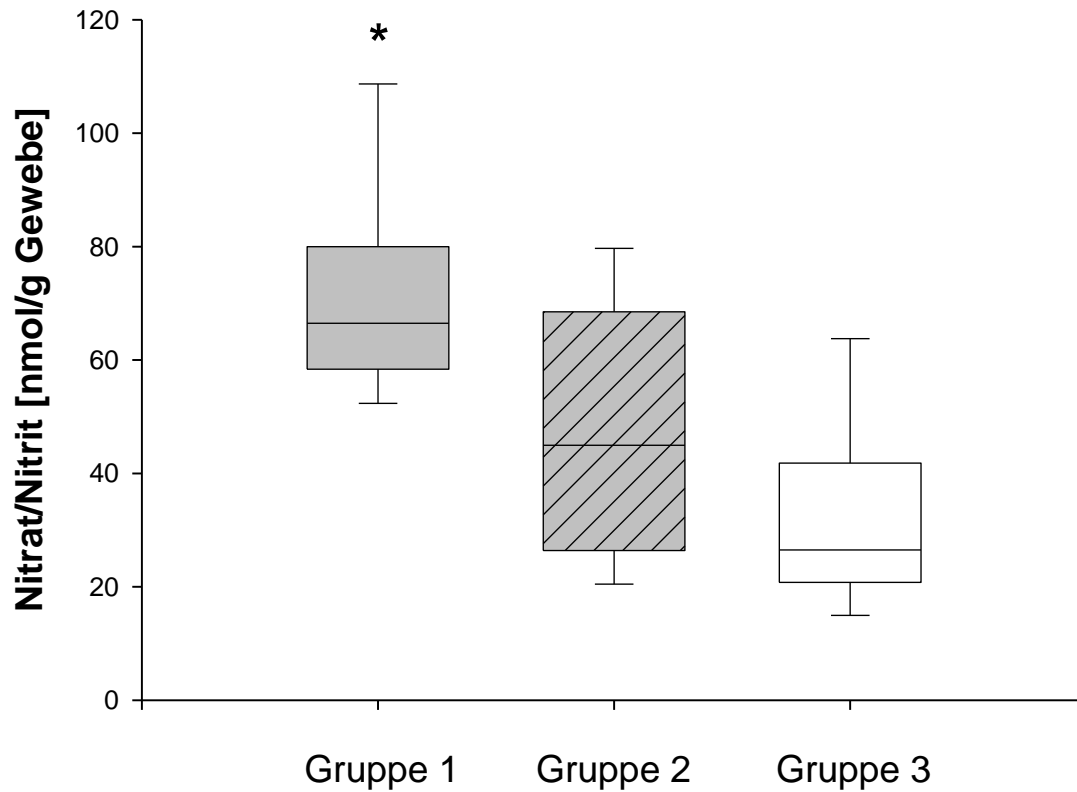


Abb.3.7 Konzentration von Nitrat/Nitrit in der Leber.

Dargestellt sind Mediane mit Quartilen und 10./90. Perzentilen.

\*  $p < 0,05$  zu Gruppe 3

### 3.5.3 Lunge

Die Gewebskonzentration von Nitrat/Nitrit in der Lunge war in Gruppe 1 und 2 höher als in Gruppe 3. In Gruppe 2 war die Konzentration jedoch signifikant niedriger als in Gruppe 1 (Abb.3.8).

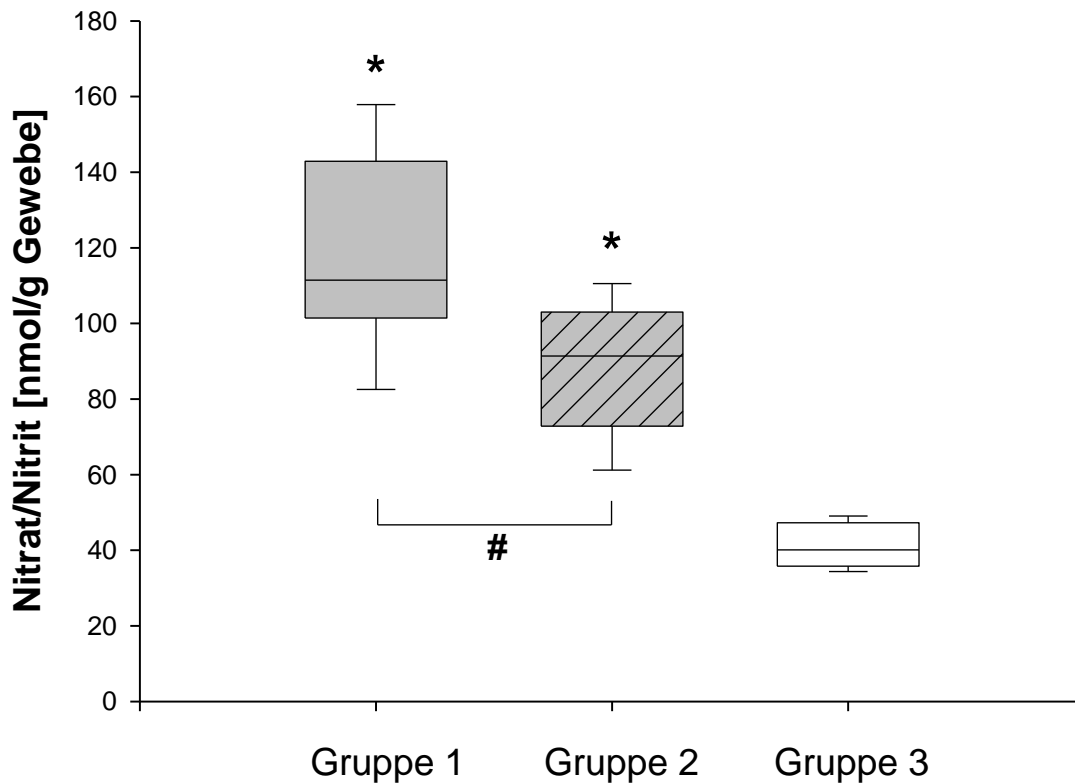


Abb.3.8 Konzentration von Nitrat/Nitrit in der Lunge.

Dargestellt sind Mediane mit Quartilen und 10./90. Perzentilen.

\*  $p < 0,05$  zu Gruppe 3, #  $p < 0,05$

### 3.5.4 Niere

In der Niere zeigten sich die Konzentrationen von Nitrat/Nitrit in Gruppe 1 und 2 signifikant gegenüber Gruppe 3 erhöht (Abb.3.9).

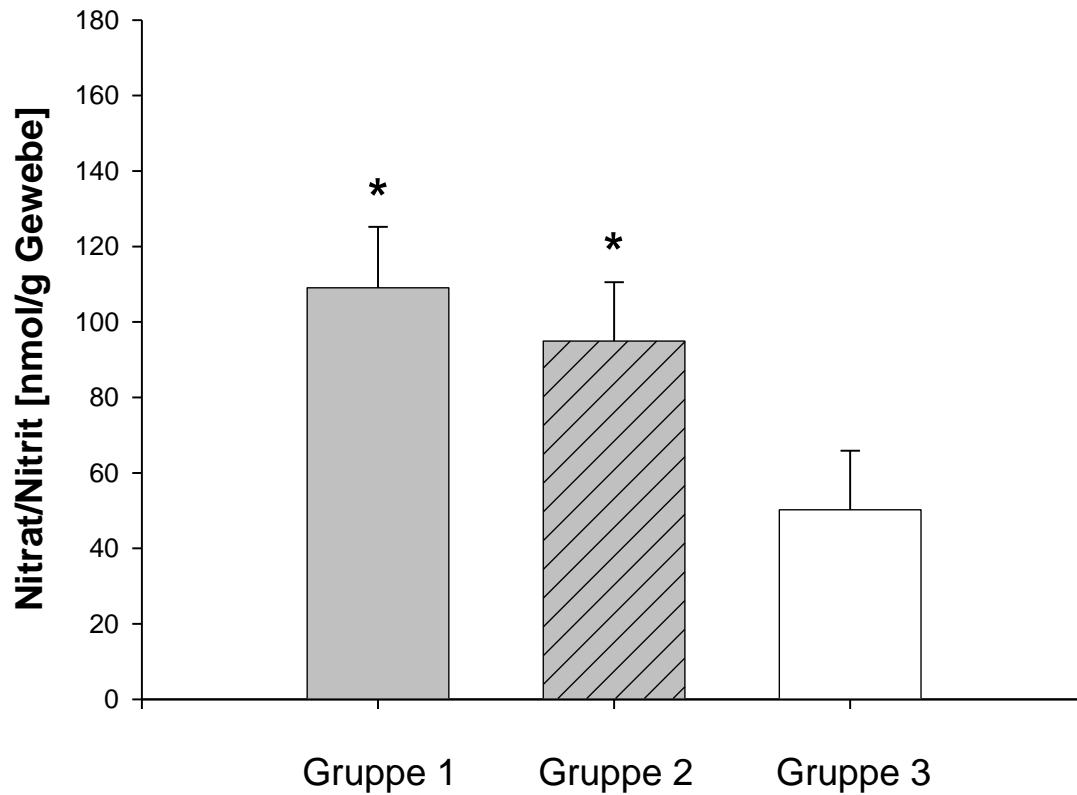


Abb.3.9 Konzentration von Nitrat/Nitrit in der Niere.

Die Darstellung zeigt Mittelwerte mit Standardabweichung.

\*  $p < 0,05$  zu Gruppe 3

### 3.5.5 Plasma der Portalvene

Die Konzentration von Nitrat/Nitrit im Portalvenenplasma war in Gruppe 1 und 2 signifikant höher als in Gruppe 3 (Abb.3.10).

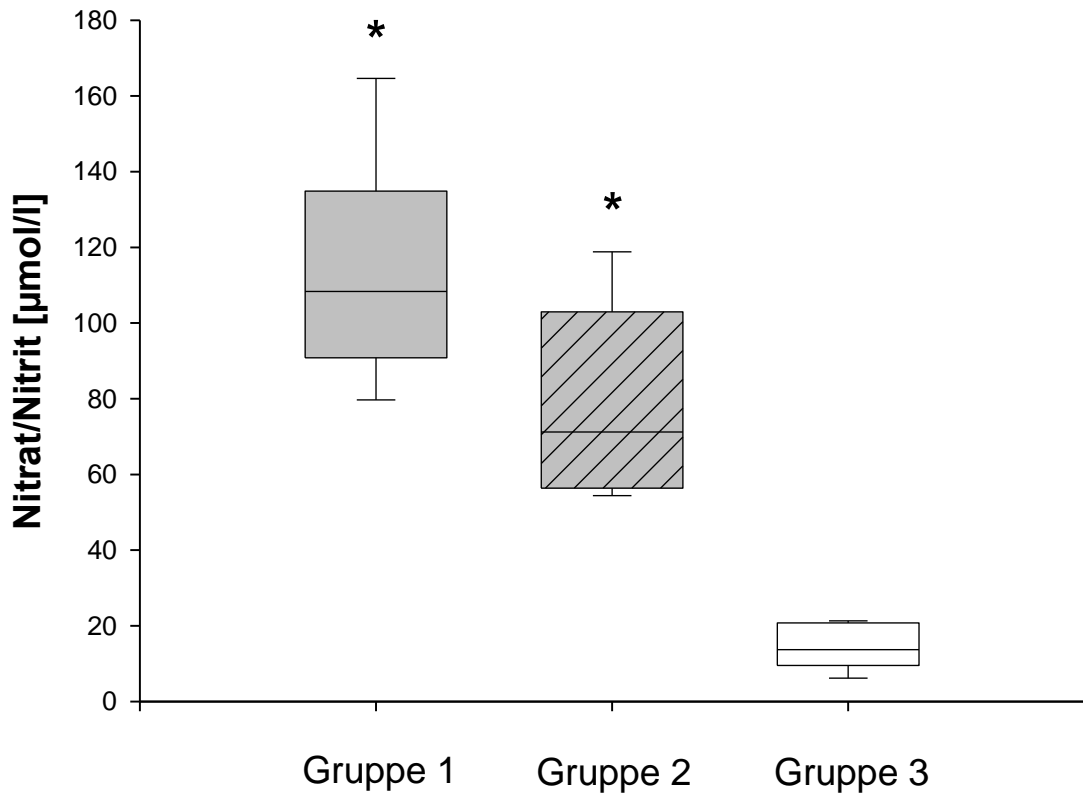


Abb.3.10 Konzentration von Nitrat/Nitrit im Plasma der Portalvene.

Dargestellt sind Mediane mit Quartilen und 10./90. Perzentilen.

\*  $p < 0,05$  zu Gruppe 3

### 3.5.6 Herz

Die Gewebskonzentration von Nitrat/Nitrit im Herzen war in Gruppe 1 und 2 höher als in Gruppe 3. In Gruppe 2 war die Konzentration jedoch signifikant niedriger als in Gruppe 1 (Abb.3.11).

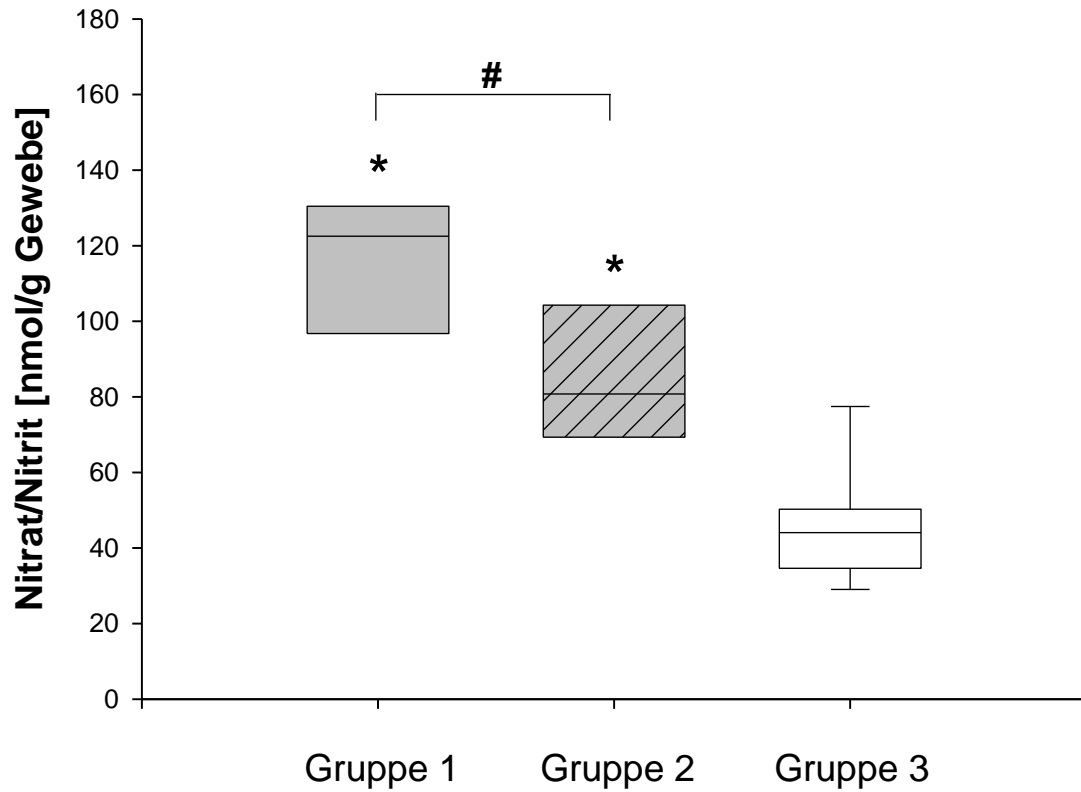


Abb.3.11 Konzentration von Nitrat/Nitrit im Herzen.

Dargestellt sind Mediane mit Quartilen und 10./90. Perzentilen.

\*  $p < 0,05$  zu Gruppe 3, #  $p < 0,05$

### 3.6 Immunhistochemische Quantifizierung der induzierbaren NO-Synthase im Darm

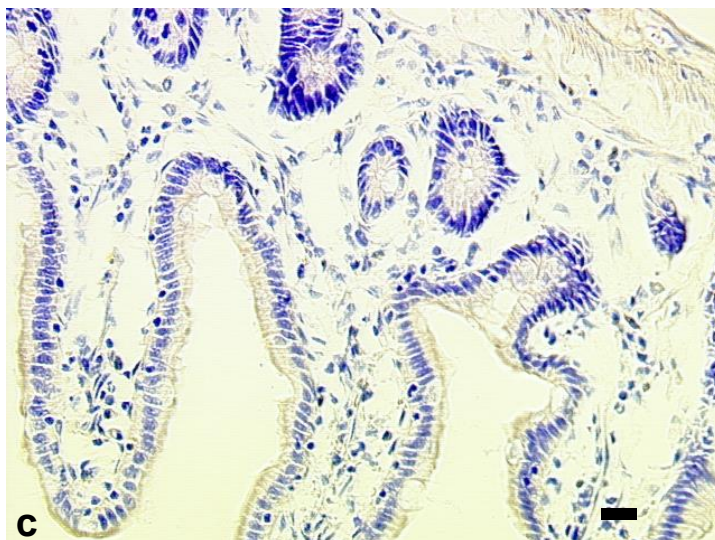
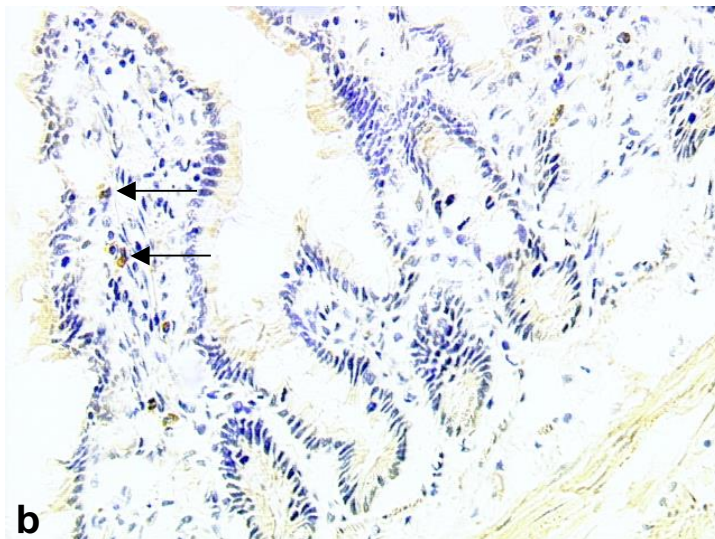
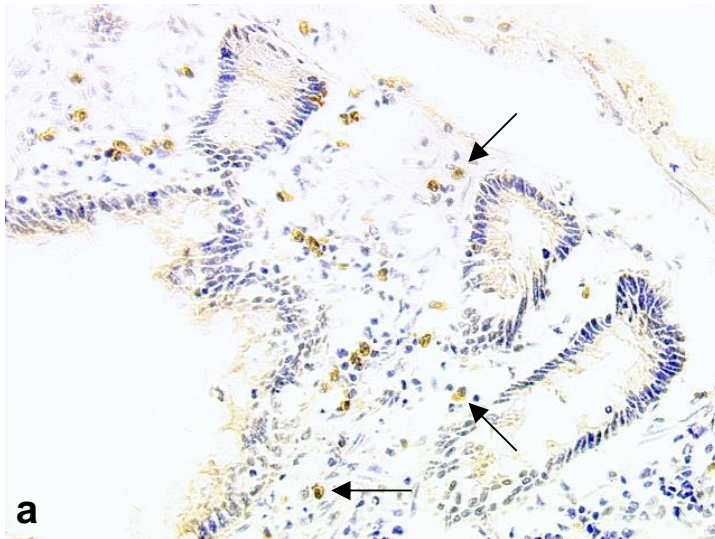


Abb.3.12 Immunhistochemische Färbungen der iNOS-exprimierenden Zellen im Darm. Zellen mit gelber Färbung (Beispiele sind mit einem  $\rightarrow$  markiert) zeigen die Expression von iNOS an.  
a Gruppe 1, b Gruppe 2, c Gruppe 3. Der Maßstab entspricht 40  $\mu$ m.

Die Auszählung der iNOS-exprimierenden Zellen pro Zählabschnitt im Darm ergab gegenüber Gruppe 1 eine signifikant erniedrigte Anzahl in Gruppe 2 und 3. Hierbei wies Gruppe 3 eine noch niedrigere Anzahl auf als Gruppe 2 (Abb.3.13).

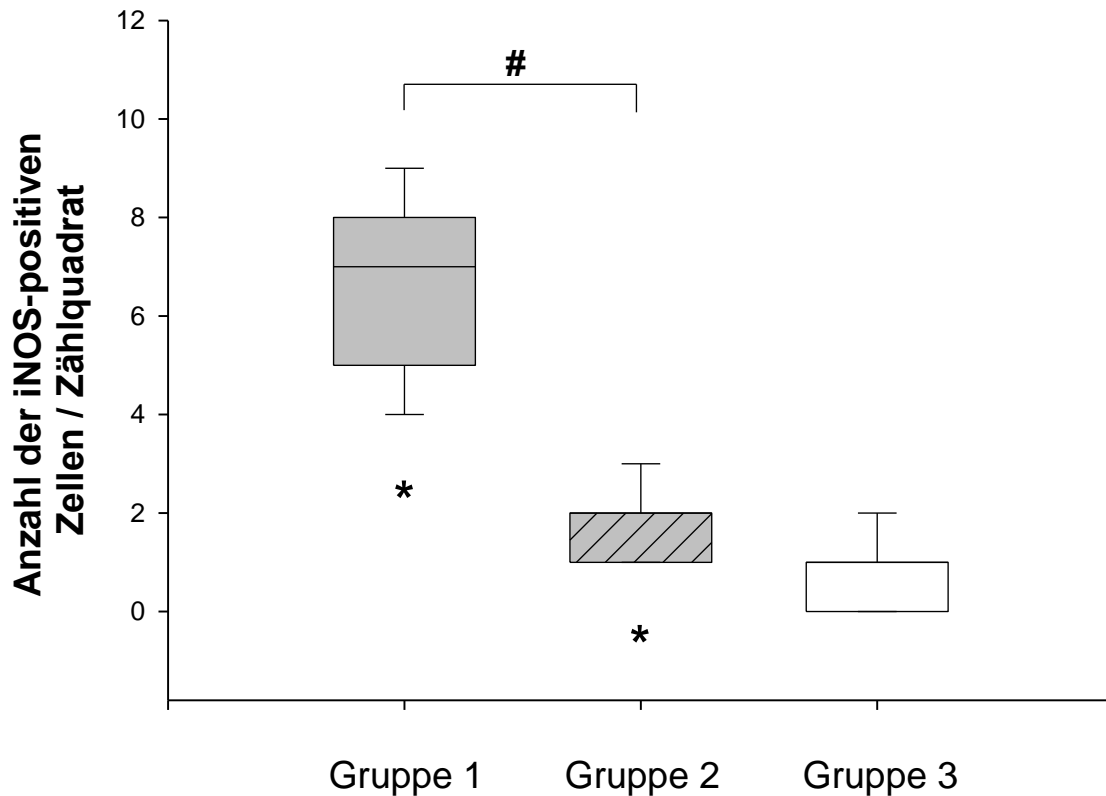


Abb.3.13 Anzahl der iNOS-positiven Zellen im Darm.

Dargestellt sind Mediane mit Quartilen und 10./90. Perzentilen.

\*  $p < 0,05$  zu Gruppe 3, #  $p < 0,05$

### 3.7 Histologische Bestimmung der Makrophagen im Darm

Die iNOS-Anfärbung zusammen mit der Zellmorphologie lässt zuverlässig darauf schließen, dass in den gewählten Quadraten alle iNOS-positiven Zellen Makrophagen sind. Die Ergebnisse der Auszählung der Makrophagen pro Zählabschnitt im Darm entsprechen daher den Ergebnissen der iNOS-positiven Zellen (s. Abb. 3.13); Gruppe 2 und 3 zeigten gegenüber Gruppe 1 eine deutlich niedrigere Anzahl an Makrophagen (s. Abb.3.14).

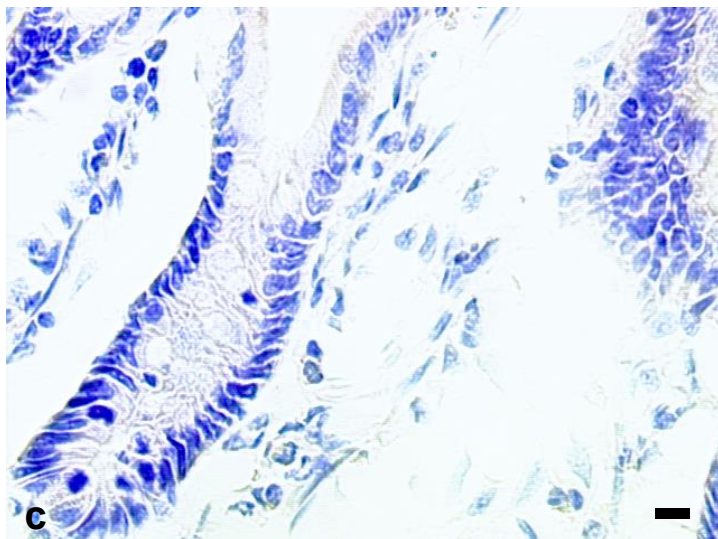
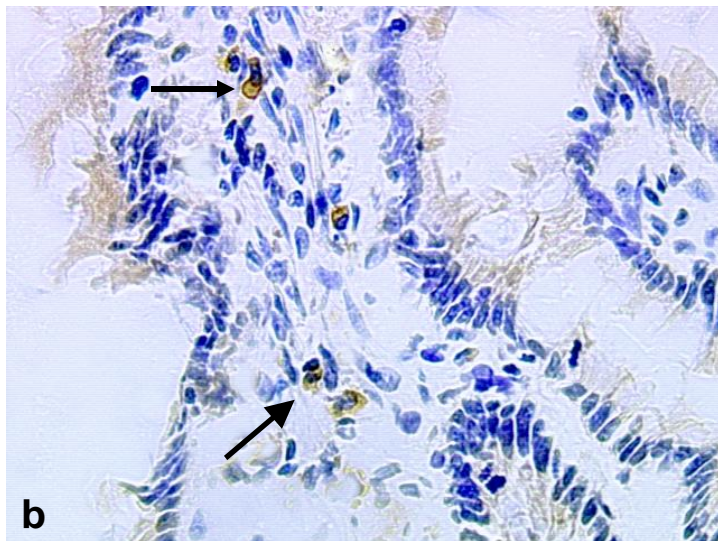
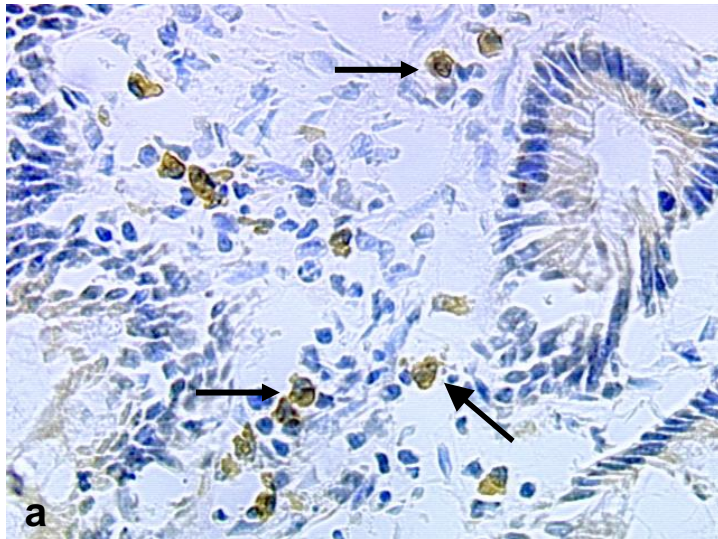


Abb.3.14  
Makrophageninfiltration  
im Darm. Beispiele sind  
durch  $\longrightarrow$  verdeutlicht.  
a Gruppe 1, b Gruppe 2,  
c Gruppe 3. Der Maßstab  
entspricht 20  $\mu\text{m}$ .



### **3.8 Endotheliale Permeabilität**

Die Ergebnisse der Bestimmung des Quotienten aus Nass- und Trockengewicht für jedes Organ sind wie folgt:

	<b>Dünndarm</b>	<b>Leber</b>	<b>Lunge</b>	<b>Niere</b>
<b>Gruppe 1</b>	4,47 (+/- 0,41)	2,80 (+/- 0,22)	4,63 (+/- 0,41)	3,83 [3,68/4,19]
<b>Gruppe 2</b>	3,96 (+/- 0,51)	2,79 (+/- 0,18)	4,50 (+/- 0,22)	4,21 [3,96/4,53] §
<b>Gruppe 3</b>	4,27 (+/- 0,39)	2,75 (+/- 0,18)	4,26 (+/- 0,39)	3,59 [3,39/3,79]

Tab.3.2 Quotienten aus Nass- und Trockengewicht.

Daten sind angegeben als Mittelwerte und Standardabweichungen bzw. Mediane und Quartile (Niere), §  $p < 0,05$  zu Gruppe 3.

Die Testung ergab einen Unterschied bei der Niere: Hier unterschieden sich die Quotienten der Gruppe 2 signifikant von denen der Gruppe 3.

### 3.9 Konzentration von 8-Isoprostan im Dünndarm

Die Gewebskonzentration von 8-Isoprostan war bei Gruppe 1 am höchsten; Gruppe 2 und 3 zeigten signifikant niedrigere Konzentrationen und unterschieden sich nicht voneinander (Abb.3.15).

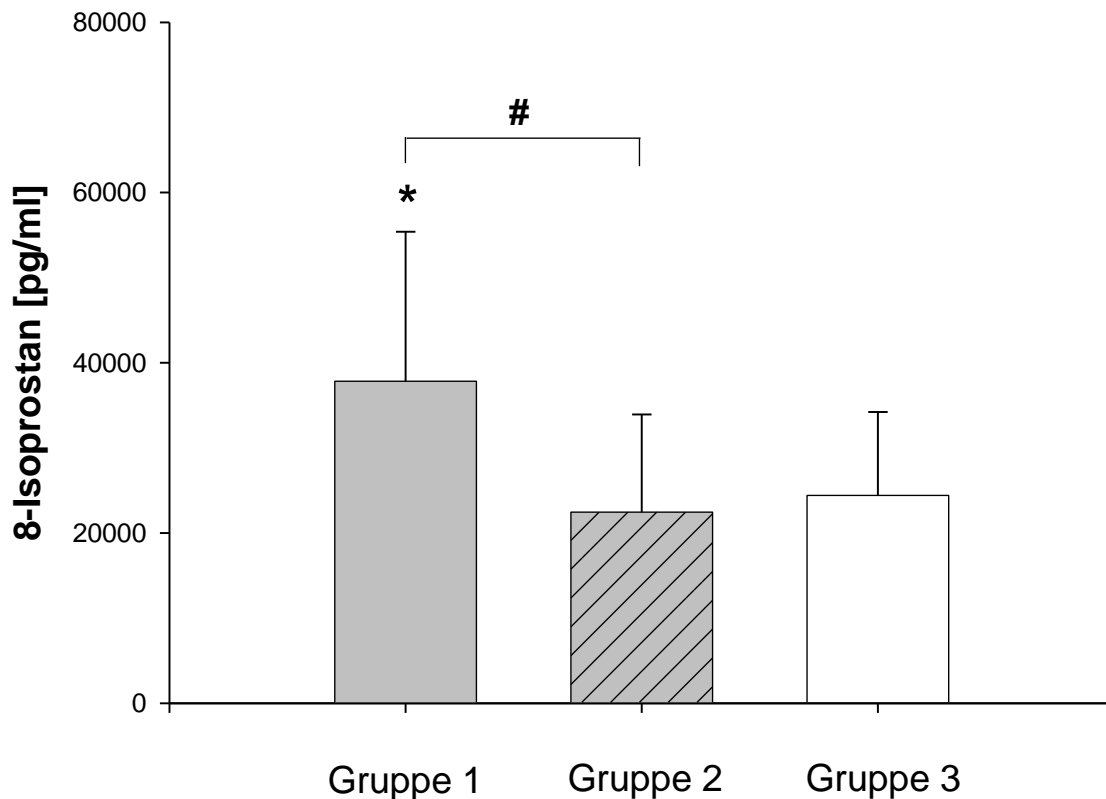


Abb.3.15 Konzentration von 8-Isoprostan im Dünndarm.

Die Darstellung zeigt Mittelwerte mit Standardabweichung.

\*  $p < 0,05$  zu Gruppe 3, #  $p < 0,05$

### 3.10 Lage des Epiduralkatheters

Die Lage der Epiduralkatheterspitze wurde in Gruppe 2 durchschnittlich auf der segmentalen Höhe Th 6 festgestellt. Bei Gruppe 1 fand sich die Lage durchschnittlich bei Th 7, bei Gruppe 3 ebenfalls bei Th 7. Die Testung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

## **4. Diskussion**

Die vorliegende Studie untersuchte die Auswirkungen der regionalen Sympathikolyse mittels thorakaler Epiduralanästhesie (TEA) auf die Endotoxin-induzierte epitheliale Permeabilitäts-erhöhung im Darm. In einem Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass der Übertritt von Fluoreszenzfarbstoff aus dem Darmlumen in das portalvenöse Blut als Maß für die epitheliale Permeabilität in Tieren mit einer normotensiven Endotoxinämie im Vergleich zu gesunden Tieren signifikant erhöht war. Eine regionale Sympathikolyse mittels TEA verminderte die epitheliale Permeabilität auf das Niveau der gesunden Tiere. Dieser Effekt war assoziiert mit einer Verminderung der intestinalen Makrophageninfiltration, sowie der intestinalen NO-Produktion und Lipidperoxidation.

### **4.1 Hämodynamische Daten**

#### **4.1.1 Mittlerer arterieller Druck**

Die Messungen zeigen, dass es sich bei diesem Modell um eine normotensive Endotoxinämie und nicht um eine Endotoxin-bedingte Hypotension handelt. Einflussfaktoren auf den MAD waren Volumen- und LPS-Gaben sowie die epidurale Gabe von Lokalanästhetikum. Durch die Gabe von 5 ml NaCl 0,9 % - dies entspricht einem prozentualen Anteil von 25% am gesamten Blutvolumen (ca. 60 - 70 ml/kg)(77) - kam es zu einem gleichmäßigen Anstieg des MAD in allen drei Gruppen. Die Volumengabe entspricht einer aggressiven Volumentherapie, wie sie auch klinisch bei *systemic inflammatory response syndrome*-/Sepsis-Patienten empfohlen wird(78). Nach dem LPS-Bolus kam es zu einem vorübergehenden Abfall des MAD. Eine LPS-induzierte Blutdrucksenkung ist in der Literatur beschrieben(79;80). Höcherl und Kollegen diskutieren als möglichen Mechanismus die Freisetzung von NO mit direkter vasodilatierender Wirkung sowie die Produktion von ebenfalls vasodilatierend wirkendem Prostacyclin.

Tiere der Gruppe 2 (TEA) zeigten zum Zeitpunkt der LPS-Gabe die geringsten Blutdruck-Werte. Dies ist durch den gleichzeitigen Beginn der regionalen Sympathikolyse und die damit einhergehende Reduktion des peripheren Widerstandes zu erklären(81;82) und wird auch bei Menschen im klinischen Bereich nach Induktion einer thorakalen Epiduralanästhesie regelmäßig beobachtet(83). Im weiteren Versuchsverlauf zeigten sich – begünstigt durch eine anzunehmende kardiovaskuläre Gegenregulation sowie die Volumentherapie – keine relevanten Unterschiede

zwischen den Versuchsgruppen. Die Blutdruckwerte blieben konstant in einem für Ratten normalen Bereich(84;85). Statistisch errechnete Unterschiede zu späteren Zeitpunkten können als klinisch unbedeutend angesehen werden.

#### 4.1.2 Herzfrequenz

In allen drei Gruppen kam es durch die initiale Volumengabe zu einer Zunahme der Herzfrequenz; in Gruppe 1 und 2 nahm die Frequenz nach den Bolusgaben von LPS und epiduralem Lidocain zunächst ab, um danach über den Versuchsverlauf wieder anzusteigen. Dieser Herzfrequenz-Anstieg wurde als LPS-Effekt auch in anderen Studien beschrieben(63;79;86) und wird als kardiovaskuläre Antwort auf den inflammatorischen Stimulus gewertet, analog zum *systemic inflammatory response syndrome* beim Menschen.

Der im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen erhöhte Herzfrequenz-Ausgangswert in Gruppe 3 muss kritisch diskutiert werden. Durch Randomisierung der Tiere wurden Einflüsse wie Unterschiede in Jahreszeit und Temperatur bei den Versuchen minimiert. Ebenso war der Gesundheitszustand der Tiere in allen drei Gruppen vergleichbar. Die Tiere in Gruppe 3 wiesen zwar eine erhöhte Leukozytenzahl im Blut auf, diese Werte unterschieden sich aber nicht signifikant von denen der anderen Gruppen (s. Kap. 3.3) und befanden sich im Normbereich für Ratten(87). Alle Tiere bekamen körpergewichtsadaptiert die gleiche Narkose, alle wurden gleich instrumentiert. Bei allen Tieren wurde dasselbe Messsystem verwendet, und auch alle übrigen Untersuchungen zeigen, dass zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede zu den anderen Gruppen bestanden. Über den gesamten Verlauf des Versuchs kam es zur Angleichung der Herzfrequenz; es wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen, so dass der Unterschied im Ausgangswert als unbedeutend für den weiteren Verlauf gewertet werden kann.

Die Tatsache, dass es bis auf einen Messwert keine Unterschiede in der Herzfrequenz zwischen Gruppe 1 und 2 gab, zeigt, dass die Nn. acceleranti (mit spinalem Ursprung in den Segmenten Th 1 – Th 4) in Gruppe 2 nicht blockiert waren. Die Autopsie der Tiere ergab eine in allen Gruppen vergleichbare durchschnittliche Lage des Epiduralkatheters auf der Höhe von Th 6 und Th 7. In einer Studie mit gleicher Methodik der TEA wurde die Ausbreitung des Lokalanästhetikums bei identischer Laufrate durch Anfärbung mittels Methylenblau bis in die Segmente Th 4 bis Th 11 dargestellt(66).

### 4.1.3 Zentralvenöser Druck

Es wurden keine gruppenspezifischen Unterschiede im ZVD gemessen. Dies lässt sich – vor allem im Versuchsverlauf – als Indikator für einen vergleichbaren Volumenstatus der Tiere werten.

## **4.2 Hämatokrit, Hämoglobin-Wert und Blutzellen**

Die Ausgangswerte im Hämatokrit sind in allen Gruppen vergleichbar. Die Abnahme des Hämatokrit am Versuchsende in den Endotoxinämie-Gruppen 1 und 2 ist als Reaktion auf das systemisch injizierte LPS zu interpretieren. Auch hier befinden sich die Werte im für Ratten physiologischen Bereich, von dem für den Sauerstofftransport im peripheren Gewebe als kritisch angesehenen Hämatokrit von 16 % (88) liegen die gemessenen Werte weit entfernt. Gleichsinnige Veränderungen konnten zudem für den vom Hämatokrit abgeleiteten Hämoglobin-Wert gezeigt werden.

Der Hämatokrit wird durch die korpuskulären Blutbestandteile definiert. Diese umfassen zu einem großen Anteil die 3 Blutzelltypen Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten. Die beim Hämatokrit beschriebenen Veränderungen finden sich folglich auch bei den Blutzellen: In Gruppe 1 und 2 hatten Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten im Vergleich zum Ausgangswert abgenommen. Bei allen drei Blutzelltypen unterschieden sich diese zwei Gruppen am Versuchsende auch von Gruppe 3. Ein Abfall der Leukozytenzahl unter die Normwertgrenze (Leukopenie) erfüllt wie die Tachykardie eines der Kriterien des systemic inflammatory response syndrome, die auch beim Menschen die systemische Antwort auf einen Entzündungsreiz repräsentieren können. Als mögliche Ursache der Abnahme der zirkulierenden Leukozyten in der Endotoxinämie konnte die Adhäsion an der venulären Gefäßwand gezeigt werden (86), die von der Auswanderung der Leukozyten in das Gewebe gefolgt ist. Auch in anderen tierexperimentellen Studien kommt es durch LPS zur Verminderung der zirkulierenden Leukozyten (89). Die Abnahme der zirkulierenden Thrombozyten, wie sie unter ähnlichen Bedingung bei anderen Autoren beschrieben wird (90), kann ebenfalls durch eine Adhäsion am Endothel und durch Mikroaggregationen erklärt werden (39). Weiterhin legen Hinweise auf die Expression des Toll-Like Rezeptor 4 (TL4R) auf der Thrombozytenoberfläche bei Mäusen nahe, dass Thrombozyten über die Bindung von LPS an diesen Rezeptor einen Teil der Immunantwort selbst vermitteln (91). Andere Autoren fanden bei TL4R-Knockout-Mäusen, dass LPS keine

Thrombozytopenie auslösen konnte; wurde Wildtypmäusen LPS gegeben, trat der erwartete Abfall der Plättchen ein, die v.a. in Lungengewebe einwanderten und an Fibrinogen adhärten(92). Die exakte Rolle der Thrombozyten beim Ablauf der Immunantwort ist sicherlich noch unklar. Die Tatsache, dass der Abfall der Thrombozyten bei den Gruppen 1 und 2 sich nicht unterschied, deutet darauf hin, dass diese Reaktion nicht durch die TEA beeinflusst wurde. Eine Abnahme an zirkulierenden Erythrozyten als Reaktion auf einen inflammatorischen Stimulus kann durch eine in vitro Untersuchung erklärt werden, die eine verstärkte Adhäsion von Erythrozyten an Endothelzellen nach Kontakt mit Endotoxin zeigte(93). Bei Rattenerthrozyten kam es nach induzierter Peritonitis ebenfalls zu einer erhöhten Aggregation(94). Erklärt wird dies z. B. durch verminderte Verformbarkeit der Zellen unter septischen Bedingungen(95). Da der Hämatokrit in Gruppe 1 und 2 in gleichem Ausmaß vermindert war, spricht dies für einen vergleichbaren LPS-Effekt auf die Adhäsion von Blutzellen und/oder auf die Extravasation von Flüssigkeit bei identischer Volumentherapie in diesen beiden Gruppen.

### **4.3 Säure-Basen-Status**

Der Basenüberschuss war nach Ablauf der 5 Stunden in allen drei Gruppen gegenüber dem Ausgangswert gefallen. Die Werte in den Gruppen 1 und 2 waren negativer als in Gruppe 3. Die pH-Werte nahmen im Vergleich zum Ausgangswert in allen drei Gruppen ab. Gruppe 2 unterschied sich am Versuchsende von den beiden anderen Gruppen. Die Abnahme des pH und des Basenüberschusses im Versuchsverlauf zeigten die metabolische Azidose der Tiere in Gruppe 1 und 2, die durch die Endotoxingabe verursacht wird(96;97). Zugrunde gelegt werden kann hier eine Endotoxin-induzierte mitochondriale Dysfunktion(98) mit vermehrtem anaeroben Metabolismus und konsekutiver Laktatazidose. Die Konzentration an Laktat im Blut wurde in den Versuchen jedoch nicht bestimmt. Dass auch in Gruppe 3 eine – wenn auch mildere – Azidose auftritt, kann im Sinne einer hyperchlorämischen Azidose nach Infusion von NaCl 0,9 % mit unphysiologisch hohem Chlorid- und Natrium-Gehalt diskutiert werden(86;99). Ebenso lässt sich der deutliche Anstieg der Natriumkonzentration im Serum in allen Gruppen dadurch plausibel deuten.

#### **4.4 Epitheliale Permeabilität**

Hier konnte bei endotoxämischen Tieren intraluminal applizierter Fluoreszenzfarbstoff (FITC-Dextran) aus dem Darm in höherer Konzentration im Portalvenenblut bestimmt werden als bei gesunden Tieren. Unter TEA konnte signifikant weniger Farbstoff aus dem Darm ins Gefäßsystem gelangen als in der Endotoxin-Gruppe ohne Therapie, die Permeabilität unterschied sich nicht von der Permeabilität der gesunden Tiere. Dies spricht für einen protektiven Effekt der TEA auf die epitheliale Barriere unter Endotoxinämie.

In einer Studie an Kaninchen(23) unter Endotoxinämie kam es durch die TEA ebenfalls zu einer Verbesserung der Darmbarriere, was auch durch Farbstoffpermeation ins Blut gezeigt wurde; hier wurde allerdings keine Differenzierung zwischen portalvenösem und systemischem Blut vorgenommen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit implizieren durch den Nachweis der verminderten Farbstoffkonzentration in der Portalvene nach TEA eine Verbesserung der Barrierestörung des Darmes durch TEA. Obwohl in dieser Studie nicht getestet, ist von einer entsprechend höheren Menge an translozierenden Bakterien in Gruppe 1 im Vergleich zu Gruppe 2 auszugehen. Untersucht wurde die Korrelation zwischen diesen beiden Entitäten u.a. durch Swank und Deitch(100), die einen direkten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Schädigung der Darmbarriere und der Anzahl der in die regionalen Lymphknoten translozierten Bakterien feststellten.

Tiere der Gruppe 1 wiesen eine höhere Konzentration an Farbstoff in der Arteria carotis gegenüber den gesunden Tieren (Gruppe 3) auf. Dies zeigt, dass selbst nach der Passage durch Herz- und Lungenstrombahn und die entsprechende systemische Verdünnung noch immer ein erhöhter Anteil an Farbstoff im Blut nachzuweisen ist, und somit der Barrierschaden in diesem Modell als ausreichend hoch angesehen werden kann. Eine Reduktion der systemischen Farbstoffkonzentration durch TEA analog zum portalen Kreislauf konnte nicht gezeigt werden. Dies mag daran liegen, dass signifikante Mengen an Farbstoff während der Leberpassage abgefangen werden (hepatische Clearance) und somit der Unterschied zwischen Gruppe 1 und 2 im systemischen Kreislauf entscheidend nivelliert wird. Mögliche Mechanismen, die der Störung der epithelialen Permeabilität zugrunde liegen, werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

## **4.5 Konzentration von Nitrat und Nitrit**

In Dünndarm, Niere und Portalvenenblut konnten in Gruppe 1 und 2 höhere Werte an Nitrat/Nitrit nachgewiesen werden als in der gesunden Kontrollgruppe 3, wobei in allen untersuchten Organen eine Tendenz zu erkennen ist, dass die Absolutwerte in der Gruppe 2 niedriger liegen als in Gruppe 1. In Herz und Lunge ist diese Tendenz auch durch einen Unterschied zwischen den Gruppen 2 und 3 statistisch abgesichert. In der Leber unterscheidet sich nur Gruppe 1 von 3, die TEA-Gruppe weist gleich wenig NO-Produkte auf wie Gruppe 3.

Der Nachweis von erhöhten NO-Abbauprodukten in allen untersuchten Organen zeigt die systemische Wirkung des LPS als Endotoxin auf die resultierende Immunantwort, vermittelt durch einen Anstieg der NO-Produktion. Ebenfalls zeigt die niedrigere Konzentration von NO-Produkten der Gruppe 2 in Herz und Lunge einen systemischen Effekt der TEA auf die Immunantwort, da die genannten Organe nicht im Bereich der direkten Nervenblockade lagen. Postuliert worden war eingangs, dass die TEA Makrophagen, also die Immunzellen, in denen NO durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) exzessiv produziert werden kann, beeinflusst. Verminderte Adhäsion und iNOS-Aktivierung dieser Zellen durch die TEA betrifft den gesamten Körper, so dass hierin eine Erklärung für die verminderte NO-Produktion in allen untersuchten Organen liegen könnte. Ein Effekt der TEA auf Leukozyten konnte bereits in Vorversuchen gezeigt werden: In einem Ratten-Modell des hämorrhagischen Schocks verminderte TEA das sonst nach Hämorrhagie und Reperfusion gesteigerte Leukozyten-Rollen im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne TEA(69).

### **4.5.1 Mechanismus der Immunzellbeeinflussung**

Als potentielle Mechanismen der Immunzellbeeinflussung sollen im Folgenden drei Möglichkeiten diskutiert werden:

1.) die indirekte Beeinflussung der Makrophagen durch Katecholamine: Die systemischen Spiegel von Katecholaminen sind in der Frühphase der Sepsis erhöht und können somit Einfluss auf das Immunsystem haben(101). So wurde nachgewiesen, dass  $\alpha$ -adrenerge Innervation zu Darmbarrieren-Fehlfunktion und bakterieller Translokation führen kann(56). Bei Patienten, die sich einem kardiovaskulären Eingriff unterzogen, kam es unter TEA und Allgemeinanästhesie postoperativ zu erniedrigten Adrenalinspiegeln im Vergleich zu Patienten mit alleiniger Allgemeinanästhesie(102;103). Diese erniedrigten Adrenalinspiegel – Ergebnis der Blockade des



Nebennierenmarks als bevorzugter Bildungsort des Adrenalins – unter der TEA könnten systemisch zu verminderter Adhäsion von Leukozyten/Immunzellen führen und damit zu verminderter iNOS-Synthese und NO-Produktion. Bei Mäusen beispielsweise wurde die Expression von Zell-Adhäsionsmolekülen auf Koronarendothelzellen durch Adrenalin hochreguliert(104). Hinweise auf die Aktivierung der Adhäsionsmoleküle durch Adrenalin in vitro finden sich auch bei anderen Autoren(59;105). Inkubation von Blut zusammen mit Adrenalin konnte auch in einer weiteren Studie die Expression des Adhäsionsmoleküls L-Selectin auf der Oberfläche von Monozyten steigern(106). In Anwesenheit von Noradrenalin konnten in einer In-vitro-Studie die Reproduktionsrate eines E.coli-Stammes vervielfacht, sowie die Ausbildung seines Virulenzfaktors (K99 Adhäsion) verstärkt exprimiert werden – hierbei wurden die Mechanismen dieser Einwirkung jedoch nicht weiter untersucht(107).

Diese Studien unterstreichen die Wirkung des sympathischen Nervensystems auf das Immunsystem. Es gibt wenige Daten über den direkten Einfluss von Katecholaminen auf die NO-Produktion. In einer Studie war die Gabe von Dobutamin in einem Kaninchen-Sepsis-Modell assoziiert mit einer Verminderung der Konzentration der NO-Produkte Nitrat und Nitrit im Serum(108). Bei einer In-vitro-Studie wurde die durch LPS aktivierte iNOS-Synthese in Makrophagen durch Katecholamine weiter verstärkt(109). In der vorliegenden Studie wurden die systemischen Katecholaminspiegel nicht bestimmt, da bereits in vorangegangenen Versuchen mit identischem TEA-Modell eine Verminderung der Adrenalin-Plasma-Konzentration gezeigt werden konnte (66).

2.) ein Effekt des systemisch aufgenommenen Lidocains bei den Tieren der Gruppe 2: Bei Kaninchen hatte Lidocain intravenös einen starken inhibitorischen Effekt auf Hämodynamik und Zytokin-Freisetzung im Endotoxinmodell(97). Bei Ratten wurde schon 1997 gezeigt, dass intravenös appliziertes Lidocain die durch LPS verursachte Leukozytenadhäsion verminderte(110). In beiden Studien wurde die systemische Lidocainkonzentration nicht gemessen. In anderen Studien wurde die Konzentration, bei der Effekte nachzuweisen waren, mit 1,0 – 5,6 µg/ml beim Menschen (Freisetzung von Superoxid-Anionen durch neutrophile Granulozyten in vitro vermindert)(111) und mit 1,2 – 2,5 µg/ml bei Kaninchen (verminderte Aktivierung der Leukozyten beim HCl-induzierten Lungentrauma)(112) angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Konzentration von Lidocain zwar nicht bestimmt; in vorherigen Versuchen mit identischem TEA-Modell lag die entsprechende Lidocainkonzentration im Plasma der Tiere bei durchschnittlich 0,51 µg/ml(69). Diese Konzentration ist zwar

vergleichsweise niedrig, eine systemische Wirkung des Lidocains kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

3.) die antiinflammatorische Wirkung des Parasympathikus: Die Zugabe von Acetylcholin zu menschlichen Makrophagen-Zellkulturen unter LPS verminderte die Bildung von TNF, IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-18(113). Bei Ratten im hämorrhagischen Schock konnte die enterale Gabe von stark fetthaltiger Nahrung über die Aktivierung von Cholecystokin (CCK) -Rezeptoren die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-6 sowie die Barrierestörung im Darm und bakterielle Translokation abschwächen. Vagotomie und Antagonisierung der Rezeptoren für CCK sowie Antagonisierung der nikotineren Acetylcholinrezeptoren verhinderte die Besserung der Situation im Vergleich zu den Kontrolltieren, so dass gefolgert wurde, dass die parasympathische Innervation einen protektiven Effekt auf Darmbarriere und Immunantwort im hämorrhagischen Schock ausübt(114). In endotoxämischen Ratten führte die elektrische Stimulation des N. vagus zu verminderter Bildung von TNF- $\alpha$  und zu verminderten Schocksymptomen(113) sowie zu verminderter Aktivierung des inflammatorischen Transskriptionsfaktors NF $\kappa$ B(115). Als mutmaßlicher Mechanismus wird eine über den  $\alpha$ 7-Subtyp des nikotineren Rezeptors auf der Makrophagenoberfläche vermittelte Verminderung der Zytokinproduktion durch Acetylcholin diskutiert(116). Neben der Verminderung von systemischen Katecholaminkonzentrationen ergibt sich somit eine weitere mögliche Erklärung für die Wirkung der TEA: Durch die Hemmung des sympathischen Nervensystems im Splanchnikusgebiet resultiert ein Überwiegen der parasympathischen cholinergen Innervation mit den eben beschriebenen Effekten auf Zytokinfreisetzung und Makrophagen in der Endotoxinämie. Auch eine direkte Nerv-Zell-Interaktion des sympathischen Nervensystems, z.B. in Peyerschen Plaques des Darmes, ist hier denkbar.

Wie unter 4.5 erwähnt, erscheint aufgrund der Tatsache, dass die NO-Produkte auch in Herz und Lunge vermindert waren, die dritte Möglichkeit mit dem regionalen Überwiegen des Parasympathikus als Mechanismus eher nicht wahrscheinlich, da hier ein systemischer Effekt der TEA vorgelegen haben muss.

Dass in dieser Studie die NO-Produkte nicht in allen Organen der Gruppe 2 im gleichen Ausmaß erniedrigt waren, deutet insgesamt auf einen Effekt der TEA auf die NO-Produktion hin, lässt aber auch den Schluss zu, dass im vorliegenden Modell die adrenerge Stimulation in der Sepsis und deren Hemmung durch die Sympathikolyse nicht die einzigen Einflussgrößen auf die NO-Produktion sind. Dies wird im Folgenden weiter erläutert.

#### 4.5.2 Intrazelluläre Signaltransduktion in der Inflammation

Die Bildung von NO durch iNOS wird durch immunstimulierende Zytokine, bakterielle Reize oder Infektion in Makrophagen, Monozyten, Mastzellen, Endothelzellen, Hepatozyten und glatten Muskelzellen induziert(18). Die Aktivität des Enzyms in Makrophagen wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Beispielsweise befinden sich zelluläre Rezeptoren wie TLR-4 und CD 14 auf der Oberfläche. LPS selbst löst die NO-Bildung bei Makrophagen in Mäusen aus(117); dies geschieht – wie in der Einleitung beschrieben – durch Bindung des LPS an LBP und nachfolgend durch Bindung dieses Komplexes an CD 14(118). Hierdurch wird die NFκB-Kaskade initiiert(119). NFκB wirkt als Transkriptionsfaktor bei der iNOS-Synthese(24). Die Zytokine, die die Bildung von iNOS auslösen können, sind z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$ . Die Bildung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wird durch den Kontakt mit LPS ausgelöst, dieser Weg wiederum wird ebenfalls durch Bindung an CD 14 vermittelt(120). IL-1 $\beta$  kann die Transkription von iNOS durch Hepatozyten in vitro hochregulieren(121). Auch Prostaglandine konnten bei endotoxämischen Ratten die Expression von iNOS und dadurch die NO-Produktion fördern(122). So ließe sich erklären, dass diese Aktivierungsmechanismen der NO-Bildung über LPS und die dadurch ausgelösten Prozesse im gesamten Körper ablaufen, unabhängig von der Sympathikolyse im thorakalen Gebiet.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Bildung von NO mit der Schädigung der Barriere korreliert, diese jedoch ebenfalls ein multifaktorielles Geschehen ist, an deren Ablauf noch weitere Mechanismen beteiligt sind.

#### 4.5.3 Molekulare Mechanismen der epithelialen Barriere

Es gibt zahlreiche Hinweise auf eine Schädigung der epithelialen Barriere durch massive NO-Bildung; in in-vitro-Versuchen konnte die Hemmung von iNOS das Zellüberleben nach LPS-Zugabe verbessern(123;124). Bei Ratten in der Endotoxinämie konnten die durch LPS verursachte iNOS-Expression, die konsekutive Nitrat- und Nitritbildung sowie die Hyperpermeabilität des Darmes und die bakterielle Translokation durch selektive Hemmung der iNOS vermindert werden(50). Nach Inkubation mit NO-Donatoren erweiterten sich die tight junctions in epithelialen Zellkulturen, es zeigten sich Desorganisation im Aktin-Skelett, verminderte ATP-Konzentrationen und konsekutiv eine erhöhte Permeabilität(32). Die Hemmung der iNOS führte bei Mäusen zur Verbesserung der durch LPS verursachten Änderungen der tight-junction-Proteine und der mukosalen Barrierefunktion(33). Mehrere Autoren konnten einen Zusammenhang von Permeabilitätserhöhung der Darmbarriere und

Anstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 sowie Änderung der *tight junction*-Proteine nachwiesen(12;125).

Die Signalkaskade, die durch IL-1 $\beta$  ausgelöst wird, wurde in Zellkulturen erforscht: Die Aktivierung der extrazellulären Signal-regulierten Kinasen 1/2 (ERK1/2) aktivierte wiederum über einen Transkriptionsfaktor (Elk-1) die *Myosin-light-chain-kinase* (MLCK), die die Öffnung der epithelialen Barriere katalysierte(126). Ein weiterer Weg, bei Zellen die MLCK zu aktivieren, wurde von derselben Arbeitsgruppe gezeigt: Hier aktivierte IL-1 $\beta$  über MEK-Kinase 1 (MEKK-1) den NF $\kappa$ B-Signalweg und hierüber die MLCK(127). Das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  bewirkte in Zellen über die Aktivierung von NF $\kappa$ B die verminderte Expression des *tight junction*-Proteins Zonula occludens (ZO)-1(128). Auch dieser Schritt wird über die MLCK-Expression vermittelt(129). Protein-Kinase-C (PKC)-Aktivierung zeigte sich bei Zellversuchen ebenfalls an der Regulation von *tight junction*-Proteinen beteiligt; hier waren die Claudine das Ziel(130).

Weitere Hinweise für die mannigfaltige und komplexe Regulation der *tight junction*-Proteine etwa durch die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase(131), GTPase RhoA(132), Glykogen-Synthase-Kinase-3 (133) ergaben sich in letzter Zeit.

Zusammenfassend ergeben sich mehrere Aspekte: LPS setzt die Bildung von iNOS und inflammatorischen Zytokinen in Gang; Die Zytokine wirken verstärkend auf iNOS und deletär auf die *tight junctions* des Epithels. Umgekehrt aktiviert die Bildung von NO die Freisetzung der Zytokine und die Schädigung der epithelialen Barriere. Das Ineinandergreifen und das gegenseitige Beeinflussen der Signalwege und Aktivierungsmechanismen auf verschiedenen Ebenen verdeutlicht die Komplexität der Vorgänge, die in der Endotoxinämie auf die epitheliale Barriere des Darmes wirken. Hier konnte gezeigt werden, dass die TEA – zumindest teilweise über die Vermittlung des vermindert gebildeten NO und dessen Produkte – die Darmbarriere gegenüber den Endotoxinämie-Tieren ohne TEA verbessern konnte.

#### **4.6 iNOS-Expression in Makrophagen**

Abb. 3.14 zeigt durch histologische Färbung identifizierte aktivierte Makrophagen, die, wie in Abb. 3.12 bestätigt, iNOS exprimieren. Die immunhistochemische Färbung der iNOS-produzierenden Zellen im Darm zeigte, dass unter TEA weniger iNOS-produzierende Makrophagen ins Gewebe einwanderten und die iNOS daher signifikant weniger exprimiert wurde als in endotoxämischen Tieren ohne TEA. Damit wurde gezeigt, dass die TEA einen abschwächenden Effekt auf die exzessive NO-Synthese in der Endotoxinämie hat. Aufgrund dieses Ergebnisses wäre eine signifikante Verminderung der NO-Produkte Nitrat und Nitrit im Darm zu erwarten gewesen (s. Ergebnisse, 3.5.1). Wenn auch die Menge der NO-Abbauprodukte durch TEA nicht signifikant verringert wird, so ist die Streuung der Daten in Gruppe 1 im Vergleich zur TEA Gruppe auffällig größer.

Unter normalen pH-Bedingungen in vivo wird NO zu Nitrat und Nitrit oxidiert(134). Die Konzentration dieser NO-Produkte wurde in der vorliegenden Studie mittels eines kolorimetrischen Assays(135) bestimmt. Zum Zeitpunkt der Versuche galten Nitrat und Nitrit als relativ stabile Endprodukte des Stoffwechselweges von NO, und deren Konzentration korrelierte gut mit der Konzentration von NO im Gewebe. Diese Bestimmung wurde auch von anderen Arbeitsgruppen entsprechend eingesetzt(23;96;136). Erst in letzter Zeit zeigte sich, dass Nitrat, insbesondere im sauren Milieu und unter Hypoxie, zu Nitrit und dieses zu NO reduziert werden kann. Als Katalysator dienen beispielsweise desoxygeniertes Myoglobin(137), die Xanthinoxidoreduktase und mitochondriale Enzyme(138). Hierdurch ist vorstellbar, dass bei den Endotoxinämie-Tieren (Gruppe 1 und 2) durch die metabolische Azidose dieser Reduktionsweg zurück zu NO die Konzentration von Nitrat und Nitrit vermindert haben könnte. Als eine weitere Quelle von Nitrat und Nitrit ist die Nahrungsaufnahme zu diskutieren – hierbei gab es bei den Tieren der drei Gruppen jedoch keine Unterschiede.

Nitrat und Nitrit sind nicht die einzigen Endpunkte von NO; NO geht mit Sauerstoffradikalen weitere Verbindungen ein. In Reaktion mit Superoxid ( $O_2^-$ ) entsteht beispielsweise Peroxynitrit ( $^-\text{OONO}$ ), das unter normalen pH-Bedingungen selbst zu Nitrat wird(139), jedoch über verschiedene Zwischenstufen andere Stoffwechselwege einschlagen und hierdurch die Struktur von Enzymen, Lipiden und anderen Makromolekülen verändern kann(140). Deshalb ist es vorstellbar, dass in Gruppe 1 mehr NO-Moleküle über diese anderen Wege reagierten als in der TEA-Gruppe, und dadurch die gemessene Konzentration an Nitrat und Nitrit das tatsächliche Ausmaß der NO-Produktion in Gruppe 1 unterschätzte.

#### **4.7 Endotheliale Permeabilität**

Bei der Bestimmung der Quotienten aus Nass- und Trockengewicht (*wet to dry weight ratio*, w/d ratio) der verschiedenen Organe ließen sich außer bei der Niere in Gruppe 2 keine Unterschiede feststellen. Dies spricht dafür, dass das Ausmaß der endothelialen Permeabilitäts-erhöhung bei Ratten nach Ablauf des Versuchs nicht hoch genug war, um Unterschiede zwischen den Tieren mit Endotoxinämie und den gesunden Kontrollen hervorzurufen oder die Methode nicht sensitiv genug ist, um vorhandene Unterschiede zu detektieren. In einer Studie an Ratten, die LPS inhalierten, zeigten sich signifikante Unterschiede bei der w/d ratio der Lunge im Vergleich zu den Kontrollen 24 Stunden nach der Inhalation(136). Andere Gruppen untersuchten die w/d ratio in Organen von Nagetieren unter Einfluss von LPS nach ähnlich langen Versuchszeiten – bei Ratten Werte von Leber, Niere und Lunge nach 18 und 24 Stunden(141) oder bei Mäusen Werte von Lungengewebe nach 24 Stunden(142). Bei Kaninchen zeigten sich nach 4 Stunden Endotoxinämie unter TEA verminderte w/d ratio-Werte des Ileums im Vergleich zu den Kontrolltieren(23). Hier müssen mehrere Faktoren diskutiert werden: zum einen sind Speziesbedingte Unterschiede zu beachten. Da die Versuche in der vorliegenden Arbeit nach 5,5 Stunden endeten, hatte die Einwirkungszeit des LPS möglicherweise nicht für den erwarteten endothelialen Schaden ausgereicht. Zum anderen hängt die endotheliale Schädigung stark von der Dosis und dem verwendeten LPS-Serotyp ab. Da die Vorversuche der Studie lediglich den Effekt des verwendeten LPS auf die epitheliale Permeabilität untersuchten, ist eine fehlende endotheliale Schädigung unter diesen Versuchsbedingungen möglich. Als Mechanismus dieser endothelialen Schädigung kommt auch hier eine iNOS-Aktivierung und konsekutive NO-Produktion infrage; dies wurde bei Mäusen nach 15 Stunden LPS-Einwirkung gezeigt(143).

Da die w/d ratio-Werte der Niere in der TEA-Gruppe höher ausfallen als in der Kontrollgruppe, lässt sich schließen, dass in den Nieren dieser Tiere die endotheliale Permeabilität stärker zugenommen hatte als in den jeweils anderen Organen und Gruppen. Diese Tatsache korrespondiert nicht mit den Messungen der NO-Produkte in der Niere und ist daher nicht schlüssig zu erklären. Insbesondere die Tatsache, dass die w/d ratio sogar höher ausfällt als bei den Endotoxinämie-Tieren, erschwert die Interpretation. Gegen einen methodischen Fehler sprechen die akkurate Trocknung unter Vakuum unter standardisierten Temperatur-Bedingungen in einem handelsüblichen Exsikkator, sowie die geringe Streuung der Werte getrockneter Gewebestücke innerhalb der Gruppen.

#### **4.8 8-Isoprostan**

In der vorliegenden Arbeit wurde 8-Isoprostan (8-iso Prostaglandin  $F_{2\alpha}$ ) im Dünndarm der Tiere bestimmt und – wie in Kap. 1.3 dargelegt – als Marker für oxidativen Stress im Gewebe gewertet. Unter Einfluss der TEA waren die 8-Isoprostan-Werte von endotoxämischen Tieren ähnlich niedrig wie bei gesunden Tieren. Dies spricht dafür, dass im Vergleich zum Gewebe der Endotoxinämie-Tiere weniger Lipidperoxidation stattfand und insgesamt der oxidative Schaden des Gewebes geringer ausfiel. Ähnliche Befunde ergaben Versuche an Schweinen, bei denen die deletären Effekte des Endotoxins durch die Gabe von Ethylpyruvat teilweise verbessert werden konnten; beispielsweise kam es hierunter zu verbesserter Hämodynamik und besserem Säure-Basen-Status. 8-Isoprostan- und Nitrat-/Nitritwerte im Blut waren nach der Gabe von Ethylpyruvat im Vergleich zu den reinen Endotoxinämie-Tieren vermindert. Auch hier wurden die Ergebnisse als Zeichen für verminderten oxidativen Stress interpretiert(144). Bei Versuchen an Schweinen mit *P. aeruginosa*-Sepsis konnten durch die Hemmung der iNOS durch den selektiven Inhibitor L-NIL (L-N6-(1-iminoethyl)-lysin) ähnlich geringe arterielle 8-Isoprostan- (und Nitrat-/Nitrit-)Werte erreicht werden. Erklärt wurde dies durch verminderte Bildung von Peroxynitrit, eine der reaktiven Stickstoffspezies, die die Bildung von Isoprostanen katalysieren können(145). Hierin könnte die Bedeutung für die vorliegende Arbeit liegen: Vermittelt durch die oben beschriebenen Effekte der TEA auf die iNOS-Synthese kam es zur verminderten Bildung reaktiver Stickstoffspezies und dadurch zu weniger Isoprostanproduktion.

Ebenso ist es möglich, dass die durch TEA verminderte Leukozytenextravasation (s. Kap. 4.6) gleichfalls die verminderte Freisetzung von Peroxidasen im Gewebe zur Folge hatte, wodurch sich weniger oxidativer Stress entwickelte und konsekutiv auch vermindert Isoprostan gebildet wurde. Bestätigt wurde diese Annahme durch eine Untersuchung an Mäusen in einem Peritonitismodell: Von aktivierten Phagozyten produzierte Myeloperoxidase vermittelte die Bildung von  $F_2$ -Isoprostanen, während bei Myeloperoxidase-Knockout-Mäusen die vermehrte Isoprostan-Produktion ausblieb(146). Vermutet wurde hier, dass die Myeloperoxidase als Katalysator für die Bildung von Stickstoffdioxid ( $NO_2$ ) und anderen reaktiven Stickstoffspezies mittelbar für die Lipidoxidation verantwortlich sein könnte, so dass sich auch beim oxidativen Stress des Gewebes in der Endotoxinämie die positiven Effekte der TEA addierten.

## **5. Zusammenfassung**

Die intakte epitheliale Barriere des Darmes ist entscheidend für die Homöostase des Organismus von Mensch und Säugetier. In der Sepsis, die noch immer die dritthäufigste Todesursache für Erwachsene in Deutschland ist, wird diese epitheliale Barriere geschwächt. Die Reaktionen des Immunsystems auf eine Infektion sind komplex und laufen auf mehreren Ebenen ab. Dabei stellen sowohl die Leukozytenadhäsion als auch die Freisetzung von Zytokinen und deren Signalwege wichtige Schritte dar. Das von der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) gebildete Stickstoffmonoxid (NO) scheint hier eine besondere Rolle zu spielen. Durch thorakale Epiduralanästhesie (TEA) und die daraus resultierende Sympathikolyse werden verschiedene Aspekte des Immunsystems beeinflusst. Die vorliegende Arbeit sollte klären, ob die TEA im normotensiven Endotoxinämie-Modell bei Ratten durch Beeinflussung monozytärer Zellen und der Menge des von ihnen produzierten NO oxidativen Stress im Gewebe vermindern kann, dadurch die epitheliale Permeabilität verringert und somit protektiv auf die Funktion der Darmbarriere wirkt.

Hierzu wurden Ratten anästhesiert, hämodynamisch überwacht, kontrolliert beatmet und mit einem thorakalen Epiduralkatheter versehen. Danach wurden sie in drei Gruppen randomisiert: In Gruppe 1 und 2 wurde die Endotoxinämie durch einen Bolus LPS induziert; epidural wurde in Gruppe 2 Lidocain, in Gruppe 1 und 3 NaCl appliziert. Gruppe 3 diente somit als gesunde Kontrollgruppe. Alle Tiere erhielten intravenöse NaCl-Infusion sowie epidurale Infusion; Blutgase und zelluläre Bestandteile des Blutes wurden bestimmt. Nach 300 Min. wurde die epitheliale Barriere indirekt mittels einer ligierten Ileumschlinge quantifiziert. Hierbei wurde der Farbstoff FITC-Dextran in das Darmlumen injiziert und nach 30 Min. dessen Konzentration im Blut bestimmt. Am Ende des Versuches wurden Organe für die Bestimmung von Nitrat/Nitrit als NO-Produkte, von Isoprostan als Marker für oxidativen Stress und für die Quantifizierung der endothelialen Permeabilität über die *wet-to-dry weight ratio* entnommen. Für die immunhistochemische Bestimmung der iNOS wurden am Versuchsende Darmstücke nach einer speziellen Präparation der Tiere entnommen.

Die TEA führte zu einer signifikant geringeren Konzentration von FITC-Dextran im portalvenösen Blut und zeigt damit eine Verminderung der epithelialen Permeabilität gegenüber den endotoxämischen Tieren ohne TEA. Die Anzahl der Makrophagen im Darmgewebe, die iNOS exprimieren, war durch die TEA signifikant erniedrigt. Die Gewebskonzentration der NO-Produkte Nitrat und Nitrit in Lunge und Herz war bei der TEA-Gruppe niedriger als bei Gruppe



1, in den anderen Organen (Dünndarm, Leber, Niere) und im Portalvenenplasma war lediglich eine Tendenz zu geringeren Werten zu beobachten. Die Bestimmung der endothelialen Permeabilität ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Konzentration von 8-Isoprostan im Dünndarm wurde durch die TEA signifikant erniedrigt.

Hierdurch konnte gezeigt werden, dass sich die TEA günstig auf die in der Endotoxinämie erhöhte Permeabilität des Darmepithels auswirkt. Damit einhergehend kam es zu verminderter Einwanderung von Makrophagen ins Darmgewebe und verminderter iNOS-Exprimierung, ebenso verringerte sich der oxidative Stress im Darmgewebe. Ursächlich für den Effekt der Sympathikolyse dürfte damit zumindest teilweise die Beeinflussung des NO-Signalweges sein. Da die Konzentration von NO-Produkten in den Organen, die nicht im Bereich der TEA lagen, niedriger war, lässt dies auf einen systemischen Effekt der TEA schließen.

## **6. Abkürzungsverzeichnis**

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ANOVA	<i>analysis of variances</i>
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BE	<i>Base Excess</i> (Basen-Überschuss)
BT	Bakterielle Translokation
CAM	Zell-Adhäsionsmoleküle
CCK	Cholezystokinin
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CD 14	<i>Cluster of differentiation</i> 14
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
E. coli	Escherischia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen
et al.	und andere
ETX	Endotoxinämie
FITC	Fluorescein-Iso-Thio-Cyanat
g	Gravitation (Zentrifugengeschwindigkeit)
G	<i>Gauge</i>
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
Hb	Hämoglobin
HCl	Salzsäure
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP <sub>3</sub>	Inositoltrisphosphat
JAM	<i>junctional adhesion molecules</i>
K	Kalium

kD	kilo Dalton
L	Lumbalwirbelkörper
LBP	LPS bindendes Protein
L-NAME	N <sup>o</sup> -Nitro-L-Arginin-Methylester
L-NIL	L-N6-(1-iminoethyl)-lysin
LPS	Lipopolysaccharid
M	molare Lösung, entspricht mol/l
MAD	mittlerer arterieller Druck
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MAP	<i>mitogen-activated protein</i>
MEKK-1	MEK-Kinase 1
MLCK	<i>myosin-light-chain-kinase</i>
MODS	multiples Organdysfunktionssyndrom
MOV	multiples Organversagen
NaCl	Natriumchlorid
Na	Natrium
NaHPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase (n-, i-, e-)
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid
<sup>-</sup> OONO	Peroxyinitrit
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PE	Polyethylen
PKC	Protein-Kinase-C
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
sCD 14	<i>soluble Cluster of differentiation 14</i>
SIRS	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SNS	sympathisches Nervensystem
TEA	thorakale Epiduralanästhesie
TER	<i>transepithelial resistance</i>

T, Th	Thorakalwirbelkörper
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
w/d ratio	<i>wet-to-dry weight ratio</i>
w/v	<i>weight/volume</i> , z.B. 4 % (w/v) entspricht 40 g/l
ZO	Zonula occludens
ZVD	zentraler Venendruck

## **7. Literaturverzeichnis**

- (1) Welsh FK, Ramsden CW, MacLennan K et al. Increased intestinal permeability and altered mucosal immunity in cholestatic jaundice. *Ann Surg* 1998 February;227(2):205-12.
- (2) Huet E, Vallee B, Delbe J et al. EMMPRIN Modulates Epithelial Barrier Function through a MMP-Mediated Occludin Cleavage Implications in Dry Eye Disease. *Am J Pathol* 2011 September;179(3):1278-86.
- (3) Brown GR, Lindberg G, Meddings J et al. Tumor necrosis factor inhibitor ameliorates murine intestinal graft-versus-host disease. *Gastroenterology* 1999 March;116(3):593-601.
- (4) Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest* 2004 March;84(3):282-91.
- (5) Ziegler TR, Smith RJ, O'Dwyer ST et al. Increased intestinal permeability associated with infection in burn patients. *Arch Surg* 1988 November;123(11):1313-9.
- (6) Yang R, Harada T, Mollen KP et al. Anti-HMGB1 neutralizing antibody ameliorates gut barrier dysfunction and improves survival after hemorrhagic shock. *Mol Med* 2006 April;12(4-6):105-14.
- (7) Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K et al. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 2005 December 19;171(6):939-45.
- (8) Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2004 July;36(7):1206-37.
- (9) Salim SY, Soderholm JD. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2011 January;17(1):362-81.
- (10) Madara JL, Stafford J. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 1989 February;83(2):724-7.
- (11) Wang W, Smail N, Wang P, Chaudry IH. Increased gut permeability after hemorrhage is associated with upregulation of local and systemic IL-6. *J Surg Res* 1998 September;79(1):39-46.
- (12) Han X, Fink MP, Delude RL. Proinflammatory cytokines cause NO\*-dependent and -independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells. *Shock* 2003 March;19(3):229-37.
- (13) Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992 December 18;258(5090):1898-902.

- (14) Boissel JP, Schwarz PM, Forstermann U. Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation. *Nitric Oxide* 1998;2(5):337-49.
- (15) Shaul PW. Regulation of endothelial nitric oxide synthase: location, location, location. *Annu Rev Physiol* 2002;64:749-74.
- (16) Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 2001 August 1;357(Pt 3):593-615.
- (17) Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988 June 16;333(6174):664-6.
- (18) Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004 June 25;75(6):639-53.
- (19) Aono K, Isobe K, Kiuchi K et al. In vitro and in vivo expression of inducible nitric oxide synthase during experimental endotoxemia: involvement of other cytokines. *J Cell Biochem* 1997 June 1;65(3):349-58.
- (20) Guzik TJ, Korb R, Mck-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003 December;54(4):469-87.
- (21) Kuemmerle JF. Synergistic regulation of NOS II expression by IL-1 beta and TNF-alpha in cultured rat colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1998 January;274(1 Pt 1):G178-G185.
- (22) Salvemini D, Ischiropoulos H, Cuzzocrea S. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. *Methods Mol Biol* 2003;225:291-303.
- (23) Kosugi S, Morisaki H, Satoh T et al. Epidural analgesia prevents endotoxin-induced gut mucosal injury in rabbits. *Anesth Analg* 2005 July;101(1):265-72, table.
- (24) Liu SF, Ye X, Malik AB. In vivo inhibition of nuclear factor-kappa B activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *J Immunol* 1997 October 15;159(8):3976-83.
- (25) Fink MP. Intestinal epithelial hyperpermeability: update on the pathogenesis of gut mucosal barrier dysfunction in critical illness. *Curr Opin Crit Care* 2003 April;9(2):143-51.
- (26) Colasanti M, Suzuki H. The dual personality of NO. *Trends Pharmacol Sci* 2000 July;21(7):249-52.
- (27) Nadler EP, Ford HR. Regulation of bacterial translocation by nitric oxide. *Pediatr Surg Int* 2000;16(3):165-8.

- (28) Boughton-Smith NK, Hutcheson IR, Deakin AM et al. Protective effect of S-nitroso-N-acetyl-penicillamine in endotoxin-induced acute intestinal damage in the rat. *Eur J Pharmacol* 1990 December 4;191(3):485-8.
- (29) Kubes P. Nitric oxide modulates epithelial permeability in the feline small intestine. *Am J Physiol* 1992 June;262(6 Pt 1):G1138-G1142.
- (30) Xie Q, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol* 1994 November;56(5):576-82.
- (31) Sorrells DL, Friend C, Koltuksuz U et al. Inhibition of nitric oxide with aminoguanidine reduces bacterial translocation after endotoxin challenge in vivo. *Arch Surg* 1996 November;131(11):1155-63.
- (32) Salzman AL, Menconi MJ, Unno N et al. Nitric oxide dilates tight junctions and depletes ATP in cultured Caco-2BBE intestinal epithelial monolayers. *Am J Physiol* 1995 February;268(2 Pt 1):G361-G373.
- (33) Han X, Fink MP, Yang R, Delude RL. Increased iNOS activity is essential for intestinal epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Shock* 2004 March;21(3):261-70.
- (34) Brunkhorst FM. [Epidemiology, economy and practice -- results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet)]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2006 January;41(1):43-4.
- (35) Sair M, Etherington PJ, Curzen NP et al. Tissue oxygenation and perfusion in endotoxemia. *Am J Physiol* 1996 October;271(4 Pt 2):H1620-H1625.
- (36) Bouskela E, Rubanyi GM. Effects of NW-nitro-L-arginine and dexamethasone on early events following lipopolysaccharide injection: observations in the hamster cheek pouch microcirculation. *Shock* 1994 May;1(5):347-53.
- (37) Tobias PS, Soldau K, Ulevitch RJ. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. *J Exp Med* 1986 September 1;164(3):777-93.
- (38) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS et al. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990 September 21;249(4975):1431-3.
- (39) McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res* 1996 October;32(4):752-63.
- (40) Shimazu R, Akashi S, Ogata H et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999 June 7;189(11):1777-82.

- (41) Downey JS, Han J. Cellular activation mechanisms in septic shock. *Front Biosci* 1998 April 30;3:d468-d476.
- (42) Granger DN, Kubes P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol* 1994 May;55(5):662-75.
- (43) Salzman AL. Nitric oxide in the gut. *New Horiz* 1995 May;3(2):352-64.
- (44) Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 1990 March;125(3):403-4.
- (45) Pignatelli P, Tellan G, Marandola M et al. Effect of l-carnitine on oxidative stress and platelet activation after major surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 2011 July 20.
- (46) Goode HF, Cowley HC, Walker BE et al. Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction. *Crit Care Med* 1995 April;23(4):646-51.
- (47) Rokach J, Khanapure SP, Hwang SW et al. Nomenclature of isoprostanes: a proposal. *Prostaglandins* 1997 December;54(6):853-73.
- (48) Roberts LJ, Morrow JD. Isoprostanes. Novel markers of endogenous lipid peroxidation and potential mediators of oxidant injury. *Ann N Y Acad Sci* 1994 November 15;744:237-42.
- (49) Razavi HM, Wang L, Weicker S et al. Pulmonary oxidant stress in murine sepsis is due to inflammatory cell nitric oxide. *Crit Care Med* 2005 June;33(6):1333-9.
- (50) Unno N, Wang H, Menconi MJ et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates endotoxin-induced gut mucosal barrier dysfunction in rats. *Gastroenterology* 1997 October;113(4):1246-57.
- (51) Parratt JR. Nitric oxide. A key mediator in sepsis and endotoxaemia? *J Physiol Pharmacol* 1997 December;48(4):493-506.
- (52) Gonzalez-Ariki S, Husband AJ. The role of sympathetic innervation of the gut in regulating mucosal immune responses. *Brain Behav Immun* 1998 March;12(1):53-63.
- (53) Green BT, Lyte M, Chen C et al. Adrenergic modulation of *Escherichia coli* O157:H7 adherence to the colonic mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004 December;287(6):G1238-G1246.
- (54) Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000 December;52(4):595-638.



- (55) Lyte M, Arulanandam B, Nguyen K et al. Norepinephrine induced growth and expression of virulence associated factors in enterotoxigenic and enterohemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* 1997;412:331-9.
- (56) Sugita T, Watarida S, Katsuyama K et al. Endotoxemia after elective surgery for abdominal aortic aneurysm and the effect of early oral feeding. *J Cardiovasc Surg (Torino)* 1998 October;39(5):547-9.
- (57) Lyte M. The role of catecholamines in gram-negative sepsis. *Med Hypotheses* 1992 April;37(4):255-8.
- (58) Yang S, Koo DJ, Zhou M et al. Gut-derived norepinephrine plays a critical role in producing hepatocellular dysfunction during early sepsis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000 December;279(6):G1274-G1281.
- (59) Horn NA, Anastase DM, Hecker KE et al. Epinephrine enhances platelet-neutrophil adhesion in whole blood in vitro. *Anesth Analg* 2005 February;100(2):520-6.
- (60) Huang JL, Zhang YL, Wang CC et al. Enhanced Phosphorylation of MAPKs by NE Promotes TNF-alpha Production by Macrophage Through alpha Adrenergic Receptor. *Inflammation* 2011 May 18.
- (61) Ahn H, Bronge A, Johansson K et al. Effect of continuous postoperative epidural analgesia on intestinal motility. *Br J Surg* 1988 December;75(12):1176-8.
- (62) Johansson K, Ahn H, Lindhagen J, Tryselius U. Effect of epidural anaesthesia on intestinal blood flow. *Br J Surg* 1988 January;75(1):73-6.
- (63) Adolphs J, Schmidt DK, Korsukewitz I et al. Effects of thoracic epidural anaesthesia on intestinal microvascular perfusion in a rodent model of normotensive endotoxaemia. *Intensive Care Med* 2004 November;30(11):2094-101.
- (64) Daudel F, Freise H, Westphal M et al. Continuous thoracic epidural anesthesia improves gut mucosal microcirculation in rats with sepsis. *Shock* 2007 November;28(5):610-4.
- (65) Freise H, Lauer S, Anthonsen S et al. Thoracic epidural analgesia augments ileal mucosal capillary perfusion and improves survival in severe acute pancreatitis in rats. *Anesthesiology* 2006 August;105(2):354-9.
- (66) Schaper J, Ahmed R, Perschel FH et al. Thoracic epidural anesthesia attenuates endotoxin-induced impairment of gastrointestinal organ perfusion. *Anesthesiology* 2010 July;113(1):126-33.
- (67) Daudel F, Bone HG, Traber DL et al. Effects of thoracic epidural anesthesia on hemodynamics and global oxygen transport in ovine endotoxemia. *Shock* 2006 December;26(6):615-9.

- (68) Ai K, Kotake Y, Satoh T et al. Epidural anesthesia retards intestinal acidosis and reduces portal vein endotoxin concentrations during progressive hypoxia in rabbits. *Anesthesiology* 2001 February;94(2):263-9.
- (69) Adolphs J, Schmidt DK, Mousa SA et al. Thoracic epidural anesthesia attenuates hemorrhage-induced impairment of intestinal perfusion in rats. *Anesthesiology* 2003 September;99(3):685-92.
- (70) Hashimoto T, Hashimoto S, Hori Y et al. Epidural anaesthesia blocks changes in peripheral lymphocytes subpopulation during gastrectomy for stomach cancer. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995 April;39(3):294-8.
- (71) Hole A, Unsgaard G. The effect of epidural and general anaesthesia on lymphocyte functions during and after major orthopaedic surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 1983 April;27(2):135-41.
- (72) Hole A, Unsgaard G, Breivik H. Monocyte functions are depressed during and after surgery under general anaesthesia but not under epidural anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1982 August;26(4):301-7.
- (73) Hole A. Per- and postoperative monocyte and lymphocyte functions: effects of combined epidural and general anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1984 August;28(4):367-71.
- (74) Bahar M, Rosen M, Vickers MD. Chronic cannulation of the intradural or extradural space in the rat. *Br J Anaesth* 1984 April;56(4):405-10.
- (75) Otamiri T, Sjudahl R, Tagesson C. An experimental model for studying reversible intestinal ischemia. *Acta Chir Scand* 1987 January;153(1):51-6.
- (76) Mousa SA, Zhang Q, Sitte N et al. beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *J Neuroimmunol* 2001 April 2;115(1-2):71-8.
- (77) Oeff K, KONIG A. [Blood volume of rat organs and residual amount of blood after blood letting or irrigation; determination with radiophosphorus-labeled erythrocytes.]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 1955;226(1):98-102.
- (78) Rivers E, Nguyen B, Havstad S et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 2001 November 8;345(19):1368-77.
- (79) Hsu BG, Lee RP, Yang FL et al. Post-treatment with N-acetylcysteine ameliorates endotoxin shock-induced organ damage in conscious rats. *Life Sci* 2006 October 19;79(21):2010-6.
- (80) Hocherl K, Schmidt C, Kurt B, Bucher M. Activation of the PGI(2)/IP system contributes to the development of circulatory failure in a rat model of endotoxic shock. *Hypertension* 2008 August;52(2):330-5.

- (81) Adolphs J, Schmitt TK, Schmidt DK et al. Evaluation of sympathetic blockade after intrathecal and epidural lidocaine in rats by laser Doppler perfusion imaging. *Eur Surg Res* 2005 January;37(1):50-9.
- (82) Vagts DA, Iber T, Szabo B et al. Effects of epidural anaesthesia on intestinal oxygenation in pigs. *Br J Anaesth* 2003 February;90(2):212-20.
- (83) Caputo M, Alwair H, Rogers CA et al. Thoracic epidural anesthesia improves early outcomes in patients undergoing off-pump coronary artery bypass surgery: a prospective, randomized, controlled trial. *Anesthesiology* 2011 February;114(2):380-90.
- (84) Carbonell LF, Salom MG, Garcia-Estan J et al. Hemodynamic alterations in chronically conscious unrestrained diabetic rats. *Am J Physiol* 1987 May;252(5 Pt 2):H900-H905.
- (85) Hernandez I, Delgado JL, Carbonell LF et al. Hemodynamic effect of 17 beta-estradiol in absence of NO in ovariectomized rats: role of angiotensin II. *Am J Physiol* 1998 April;274(4 Pt 2):R970-R978.
- (86) Schaper J, Ahmed R, Schafer T et al. Volume therapy with colloid solutions preserves intestinal microvascular perfusion in endotoxaemia. *Resuscitation* 2008 January;76(1):120-8.
- (87) Henry J.Baker JRLSHW. selected Normative Data in The Laboratory Rat. Academic Press, Inc.; 1980.
- (88) van Bommel J, Siegemund M, Henny CP et al. Critical hematocrit in intestinal tissue oxygenation during severe normovolemic hemodilution. *Anesthesiology* 2001 January;94(1):152-60.
- (89) Sielenkamper AW, Meyer J, Kloppenburg H et al. The effects of sepsis on gut mucosal blood flow in rats. *Eur J Anaesthesiol* 2001 October;18(10):673-8.
- (90) Sebai H, Gadacha W, Sani M et al. Protective effect of resveratrol against lipopolysaccharide-induced oxidative stress in rat brain. *Brain Inj* 2009 December;23(13-14):1089-94.
- (91) Aslam R, Speck ER, Kim M et al. Platelet Toll-like receptor expression modulates lipopolysaccharide-induced thrombocytopenia and tumor necrosis factor-alpha production in vivo. *Blood* 2006 January 15;107(2):637-41.
- (92) Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K et al. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 2005 October 1;106(7):2417-23.
- (93) Eichelbronner O, Sielenkamper A, Cepinskas G et al. Endotoxin promotes adhesion of human erythrocytes to human vascular endothelial cells under conditions of flow. *Crit Care Med* 2000 June;28(6):1865-70.

- (94) Baskurt OK, Temiz A, Meiselman HJ. Red blood cell aggregation in experimental sepsis. *J Lab Clin Med* 1997 August;130(2):183-90.
- (95) Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Vanhaeverbeek M, Vincent JL. Red blood cell rheology in sepsis. *Intensive Care Med* 2003 July;29(7):1052-61.
- (96) Bachetti T, Pasini E, Suzuki H, Ferrari R. Species-specific modulation of the nitric oxide pathway after acute experimentally induced endotoxemia. *Crit Care Med* 2003 May;31(5):1509-14.
- (97) Taniguchi T, Shibata K, Yamamoto K et al. Effects of lidocaine administration on hemodynamics and cytokine responses to endotoxemia in rabbits. *Crit Care Med* 2000 March;28(3):755-9.
- (98) Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care* 2005;9 Suppl 4:S13-S19.
- (99) Scheingraber S, Rehm M, Sehmisch C, Finsterer U. Rapid saline infusion produces hyperchloremic acidosis in patients undergoing gynecologic surgery. *Anesthesiology* 1999 May;90(5):1265-70.
- (100) Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996 May;20(4):411-7.
- (101) Ulloa L, Deitch EA. Neuroimmune perspectives in sepsis. *Crit Care* 2009;13(2):133.
- (102) Moore CM, Cross MH, Desborough JP et al. Hormonal effects of thoracic extradural analgesia for cardiac surgery. *Br J Anaesth* 1995 October;75(4):387-93.
- (103) Volk T, Dopfner UR, Schmutzler M et al. Stress induced IL-10 does not seem to be essential for early monocyte deactivation following cardiac surgery. *Cytokine* 2003 December 21;24(6):237-43.
- (104) Chen Y, Ke Q, Xiao YF et al. Cocaine and catecholamines enhance inflammatory cell retention in the coronary circulation of mice by upregulation of adhesion molecules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 May;288(5):H2323-H2331.
- (105) Wahle M, Greulich T, Baerwald CG et al. Influence of catecholamines on cytokine production and expression of adhesion molecules of human neutrophils in vitro. *Immunobiology* 2005;210(1):43-52.
- (106) Rainer TH, Lam N, Cocks RA. Adrenaline upregulates monocyte L-selectin in vitro. *Resuscitation* 1999 December;43(1):47-55.
- (107) Lyte M, Erickson AK, Arulanandam BP et al. Norepinephrine-induced expression of the K99 pilus adhesin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1997 March 27;232(3):682-6.

- (108) Lobo SM, Soriano FG, Barbeiro DF et al. Effects of dobutamine on gut mucosal nitric oxide production during endotoxic shock in rabbits. *Med Sci Monit* 2009 February;15(2):BR37-BR42.
- (109) Chi DS, Qui M, Krishnaswamy G et al. Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. *Nitric Oxide* 2003 March;8(2):127-32.
- (110) Schmidt W, Schmidt H, Bauer H et al. Influence of lidocaine on endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo. *Anesthesiology* 1997 September;87(3):617-24.
- (111) Peck SL, Johnston RB, Jr., Horwitz LD. Reduced neutrophil superoxide anion release after prolonged infusions of lidocaine. *J Pharmacol Exp Ther* 1985 November;235(2):418-22.
- (112) Nishina K, Mikawa K, Takao Y et al. Intravenous lidocaine attenuates acute lung injury induced by hydrochloric acid aspiration in rabbits. *Anesthesiology* 1998 May;88(5):1300-9.
- (113) Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000 May 25;405(6785):458-62.
- (114) Luyer MD, Greve JW, Hadfoune M et al. Nutritional stimulation of cholecystokinin receptors inhibits inflammation via the vagus nerve. *J Exp Med* 2005 October 17;202(8):1023-9.
- (115) Guarini S, Altavilla D, Cainazzo MM et al. Efferent vagal fibre stimulation blunts nuclear factor-kappaB activation and protects against hypovolemic hemorrhagic shock. *Circulation* 2003 March 4;107(8):1189-94.
- (116) Wang H, Yu M, Ochani M et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003 January 23;421(6921):384-8.
- (117) Stuehr DJ, Marletta MA. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 November;82(22):7738-42.
- (118) Jerala R. Structural biology of the LPS recognition. *Int J Med Microbiol* 2007 September;297(5):353-63.
- (119) Schroder NW, Opitz B, Lamping N et al. Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in the initiation of innate immune responses by *Treponema* glycolipids. *J Immunol* 2000 September 1;165(5):2683-93.

- (120) Perera PY, Vogel SN, Detore GR et al. CD14-dependent and CD14-independent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide or taxol. *J Immunol* 1997 May 1;158(9):4422-9.
- (121) Geller DA, de Vera ME, Russell DA et al. A central role for IL-1 beta in the in vitro and in vivo regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase. IL-1 beta induces hepatic nitric oxide synthesis. *J Immunol* 1995 November 15;155(10):4890-8.
- (122) Tunctan B, Yaghini FA, Estes A, Malik KU. Prostaglandins inhibit cytochrome P450 4A activity and contribute to endotoxin-induced hypotension in rats via nitric oxide production. *Arch Pharm Res* 2008 July;31(7):856-65.
- (123) Tepperman BL, Brown JF, Whittle BJ. Nitric oxide synthase induction and intestinal epithelial cell viability in rats. *Am J Physiol* 1993 August;265(2 Pt 1):G214-G218.
- (124) Tepperman BL, Brown JF, Korolkiewicz R, Whittle BJ. Nitric oxide synthase activity, viability and cyclic GMP levels in rat colonic epithelial cells: effect of endotoxin challenge. *J Pharmacol Exp Ther* 1994 December;271(3):1477-82.
- (125) Cui W, Li LX, Sun CM et al. Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Braz J Med Biol Res* 2010 April;43(4):330-7.
- (126) Al-Sadi R, Ye D, Said HM, Ma TY. Cellular and molecular mechanism of interleukin-1beta modulation of CACO-2 intestinal epithelial tight junction barrier. *J Cell Mol Med* 2010 April 7.
- (127) Al-Sadi R, Ye D, Said HM, Ma TY. IL-1{beta}-Induced Increase in Intestinal Epithelial Tight Junction Permeability Is Mediated by MEKK-1 Activation of Canonical NF-{kappa}B Pathway. *Am J Pathol* 2010 November;177(5):2310-22.
- (128) Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT et al. TNF-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires NF-kappa B activation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004 March;286(3):G367-G376.
- (129) Ma TY, Boivin MA, Ye D et al. Mechanism of TNF-{alpha} modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005 March;288(3):G422-G430.
- (130) Sjo A, Magnusson KE, Peterson KH. Protein kinase C activation has distinct effects on the localization, phosphorylation and detergent solubility of the claudin protein family in tight and leaky epithelial cells. *J Membr Biol* 2010 July;236(2):181-9.
- (131) Larre I, Lazaro A, Contreras RG et al. Ouabain modulates epithelial cell tight junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 June 22;107(25):11387-92.

- (132) Schlegel N, Meir M, Spindler V et al. Differential role of Rho GTPases in intestinal epithelial barrier regulation in vitro. *J Cell Physiol* 2010 October 13.
- (133) Severson EA, Kwon M, Hilgarth RS et al. Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) influences epithelial barrier function by regulating occludin, claudin-1 and E-cadherin expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2010 July 2;397(3):592-7.
- (134) Weitzberg E, Hezel M, Lundberg JO. Nitrate-nitrite-nitric oxide pathway: implications for anesthesiology and intensive care. *Anesthesiology* 2010 December;113(6):1460-75.
- (135) Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB, Jr. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol* 1996;268:142-51.
- (136) El-Agamy DS. Nilotinib ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011 April 4.
- (137) Shiva S, Huang Z, Grubina R et al. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration. *Circ Res* 2007 March 16;100(5):654-61.
- (138) Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2008 February;7(2):156-67.
- (139) Squadrito GL, Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 1998 September;25(4-5):392-403.
- (140) Szabo C, Modis K. Pathophysiological roles of peroxynitrite in circulatory shock. *Shock* 2010 September;34 Suppl 1:4-14.
- (141) Huang H, Zhang H, Qu Y et al. [Change in number of circulating endothelial progenitor cells and its significance in septic rats.]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2011 February;23(2):72-6.
- (142) Yeh CH, Cho W, So EC et al. Propofol inhibits lipopolysaccharide-induced lung epithelial cell injury by reducing hypoxia-inducible factor-1 {alpha} expression. *Br J Anaesth* 2011 April;106(4):590-9.
- (143) Chauhan SD, Seggara G, Vo PA et al. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *FASEB J* 2003 April;17(6):773-5.
- (144) Hauser B, Kick J, Asfar P et al. Ethyl pyruvate improves systemic and hepatosplanchnic hemodynamics and prevents lipid peroxidation in a porcine model of resuscitated hyperdynamic endotoxemia. *Crit Care Med* 2005 September;33(9):2034-42.

- (145) Matejovic M, Krouzecky A, Martinkova V et al. Selective inducible nitric oxide synthase inhibition during long-term hyperdynamic porcine bacteremia. *Shock* 2004 May;21(5):458-65.
- (146) Zhang R, Brennan ML, Shen Z et al. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *J Biol Chem* 2002 November 29;277(48):46116-22.



## **8. Anhang**

### **8.1 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **8.2 Publikationen**

### Originalpublikationen:

Schäper J, Wagner A, Enigk F, Brell B, Mousaa S, Habazettl H, Schäfer M: „Regional sympathetic blockade attenuates activation of intestinal macrophages and reduces gut barrier failure”, *Anesthesiology*, 2013 Jan;118(1):134-142

Schäper J, Ahmed R, Schäfer T, Elster A, Enigk F, Habazettl H, Mousaa S, Schäfer M, Welte M: “Volume therapy with colloid solutions preserves intestinal microvascular perfusion in endotoxaemia“, *Resuscitation* (2008), 76, 120 - 128

### Abstract und Poster:

10. DGAI Hauptstadtkongress für Anästhesiologie und Intensivtherapie 2008:

A. Elster, F. Enigk, S. Mousa, M. Schäfer, H. Habazettl, J. Schäper: „Thorakale Epiduralanästhesie vermindert die Darmbarrierestörung und intestinale Stickstoffmonoxidkonzentration in der Endotoxinämie“ – 2. Posterpreis für experimentelle Studien

### **8.3 Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Antje Elisabeth Maria Wagner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Effekte der regionalen Sympathikolyse auf die Barrierefunktion des Darmes in der Endotoxinämie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

#### **8.4 Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Helmut Habazettl und bei meinem Betreuer Dr. med. Jörn Schäper für die Vergabe des spannenden Themas, ihre exzellente Betreuung und Unterstützung sowie ihre immerwährende Diskussionsbereitschaft.

Mein Dank gebührt außerdem Prof. Dr. med. Axel Pries, dem Leiter des Instituts für Physiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin in Dahlem, sowie den Mitarbeitern und Mitdoktoranden für das Ermöglichen der Versuche und Messungen.

Dr. med. Bernhard Brell, damals Arbeitsgemeinschaft Temmesfeld-Wollbrück an der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum, danke ich für die Möglichkeit, die FITC-Messungen bei ihm durchführen zu können. Außerdem möchte ich Dr. Shaaban Mousa, damals Arbeitsgruppe Stein/Schäfer, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, für die immunhistochemische Untersuchung der iNOS-Expression danken.

Ohne meine Eltern und meinen Mann wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen – Danke!