

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

DISSERTATION

Effekte verschiedener Therapieansätze auf den Endotoxin-geschädigten Darm

zur Erlangung des akademischen Grades:

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Fabian Lukas Enigk

aus Berlin

Datum der Promotion:
11.12.2015

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt (deutsch)	1
Abstract (englisch)	2
Einführung	4
Methodik	6
Ergebnisse	11
Diskussion	14
Reference List	18
Eidesstattliche Versicherung einschließlich Anteilserklärung	22
Ausgewählten Publikationen	24
Lebenslauf	25
Publikationsliste	26
Danksagung	27

Effekte verschiedenener Therapieansätze auf den Endotoxin-geschädigten Darm.

Fabian Lukas Enigk

Abstrakt

Einführung: Mit ca. 60.000 Todesfällen pro Jahr ist die Sepsis die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Für die Entstehung und Aufrechterhaltung gilt die Schädigung der epithelialen Darmbarriere mit konsekutiver bakterieller Translokation als wichtiger Faktor. Das sympathische Nervensystem beeinflusst die Endotoxin-bedingte Aktivierung der immunkompetenten Zellen.

In Studie I untersuchten wir die Auswirkungen einer regionalen Sympathikolyse mittels thorakaler Epiduralanästhesie (TEA) auf die Endotoxin-induzierte intestinale Leukozyten-Endothelinteraktion und den endothelialen Schaden.

Studie II prüfte, ob TEA die Endotoxin-bedingte Erhöhung der intestinalen epithelialen Permeabilität reduziert.

Studie III quantifizierte den Effekt der drei Volumenersatzmittel Hydroxyethylstärke, Gelatine und isotone Kochsalzlösung auf intestinale Mikrozirkulationsstörungen während einer Endotoxinämie.

Methodik: In allen Studien wurden männliche Ratten narkotisiert und zum hämodynamischen Monitoring instrumentiert. Dem jeweiligen Studienprotokoll folgend wurde eine Endotoxinämie eingeleitet.

Die Tiere von Studie I und II wurden zusätzlich mit einem epiduralen Katheter versehen, über den entweder Lidocain oder isotone Kochsalzlösung appliziert wurde.

In Studie I bestimmten wir die Katecholamin- und Zytokinkonzentration im Plasma, die Adhäsionsmolekülexpression, die Leukozytenadhäsion und das intestinale Gewebeödem.

Studie II untersuchte die intestinale epitheliale Permeabilität, die Makrophagen-Expression der induzierbaren NO Synthetase und die 8-Isoprostan Gewebekonzentration.

Studie III überprüfte die Auswirkungen der verschiedenen Volumenersatzmittel auf die intestinale funktionelle Kapillardichte, die Geschwindigkeit der Erythrozyten und die mesenteriale Leukozyten-Endothelinteraktion.

Ergebnisse: Studie I: TEA senkte die Adrenalin-Plasmakonzentration um 32%. Dies war assoziiert mit einer um 48% verminderten Interleukin-1beta Plasmakonzentration, einer verringerten Expression endothelialer Adhäsionsmolekülen (E-Selektin 34%, ICAM-1 42%) und weniger intestinale Gewebeödem (75%).

Studie II: TEA verminderte den Endotoxin-induzierten Anstieg der intestinalen epithelialen Permeabilität um 30%, der Expression der NO-Synthetase um 70% und die Lipidperoxidation um 59%.

Studie III: Nach Volumetherapie mit isotoner Kochsalzlösung war die funktionelle Kapillardichte um 18,5% erniedrigt. In der Hydroxyethylstärke- und Gelatinegruppe war dies nicht nachweisbar. Hinsichtlich anderer Untersuchungsparameter ergaben sich keine Unterschiede.

Diskussion: Studie I und II: Die Effekte der TEA auf die Adhäsion und Extravasation von Immunzellen können durch die aufgezeigte Reduktion der Plasma-Adrenalin-Konzentration bedingt sein. Alternativ muss eine direkte Beeinflussung der Immunzellen über Nervenverbindungen (nerve-immune interplay) oder ein systemischer Effekt des Lidocains in Betracht gezogen werden.

Studie III: Bei vergleichbarer Makrohämodynamik und gleichem Volumenstatus der Gruppen scheint ein Effekt innerhalb der Mikrozirkulation wie z.B. die Erythrozyten-Rigidität, die endotheliale Schwellung oder das Ausmaß des umgebenden Gewebeödems für die Unterschiede in der Mikrozirkulation verantwortlich zu sein. Ein Effekt der kolloidalen Lösungen auf die Immunreaktion auf Endotoxin war in diesen Untersuchungen als Ursache nicht zu finden.

Effects of different therapeutic approaches on the endotoxin-injured intestine.

Abstract

Introduction: With approximately 60,000 deaths per year sepsis is the third leading cause of death in Germany. Bacterial translocation due to the damage of intestinal epithelial barrier represents an important factor for the development and maintenance of septic course. The sympathetic nervous system influences the endotoxin-induced activation of immunocompetent

cells.

Study I examined the effects of regional sympathetic blockade by thoracic epidural anesthesia (TEA) on the endotoxin-induced intestinal leukocyte-endothelial interaction and the consecutive endothelial injury.

Study II investigated the impact of TEA on the endotoxin-induced increase in intestinal epithelial permeability.

Study III quantified the effect of volume replacement during endotoxemia with either hydroxyethyl starch, gelatin, or isotonic saline on intestinal microcirculatory impairment.

Methods: Male rats were anesthetized, cannulated and hemodynamically monitored. Endotoxemia was initiated following the particular study protocol. Animals of study I and II were additionally equipped with an epidural catheter for continuous application of lidocaine or isotonic saline.

In study I catecholamine and cytokine concentration in plasma, adhesion molecule expression, leukocyte adhesion and intestinal tissue edema were determined.

Study II investigated intestinal epithelial permeability, macrophage expression of inducible NO synthase and 8-isoprostane tissue concentration.

Study III examined the effects of different volume replacement regimes on intestinal functional capillary density, velocity of erythrocytes and mesenteric leukocyte-endothelial interaction.

Results: Study I: TEA reduced epinephrine plasma concentration by 32%. This was associated with a decrease in interleukin-1 β plasma concentration (48%), a decrease in expression of endothelial adhesion molecules E-selectin (34%) and ICAM-1 (42%) and a decrease of intestinal tissue edema (75%).

Study II: TEA reduced the endotoxin-induced increase in intestinal epithelial permeability by 30%. Expression of NO synthase and lipid peroxidation were lessened by 70% and 59% respectively.

Study III: After fluid resuscitation with isotonic saline the functional capillary density was decreased by 18.5%. There were no detectable changes of functional capillary density in the hydroxyethyl starch or gelatin group. Regarding other test parameters significant differences could not be demonstrated.

Discussion: Study I and II: The effect of TEA on the adhesion and extravasation of immune cells may be due to the reduction of plasma epinephrine concentration. Alternatively, a

direct influence on the immune cells via nerve connections (nerve-immune interplay) or a systemic effect of lidocaine should be considered.

Study III: Under comparable macrohemodynamic parameters and volume status the discrepancy in microcirculation seems to be due to effects like changes in red blood cell rigidity, endothelial swelling or the extent of surrounding tissue edema. An impact of colloidal solutions on the immune response to endotoxin could not be detected.

Einführung

Bedeutung der Schädigung des Darmes in der Endotoxinämie

Minderperfusion des Gewebes und konsekutive Immunzellinfiltration können eine Schädigung der Darmschleimhaut und somit der epithelialen Barrierefunktion verursachen. Dadurch kommt es zum Übertritt von Bakterien aus dem Darmlumen in die Lymphe bzw. das portalvenöse Blut und schließlich in die systemische Zirkulation (bakterielle Translokation)¹. Durch eine Minderperfusion geschädigte Leberzellen können die hepatischen Synthese- und Clearingfunktionen nicht mehr aufrecht erhalten², es kommt zu einer entzündungsverstärkenden Zytokinfreisetzung³. Durch die Aktivierung von Immunzellen und die Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren aus Darm und Leber kommt es zu einer systemischen inflammatorischen Antwort.

Den Organen im Splanchnikusgebiet (Magen, Darm, Leber, Milz, Pankreas) kommt damit eine besondere Bedeutung in der Entstehung der Ganzkörperinflammation und des Multiorganversagens zu. Zahlreiche pathophysiologische Zustände des Gastrointestinaltrakts und der mesenterialen Zirkulation, wie Ileus, Schock oder Entzündung gehen mit einem erhöhten Sympathikotonus einher^{4, 5}. Eine durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems gestörte Verteilung des Blutflusses sowohl zu den Splanchnikusorganen als auch innerhalb der Darmwand selbst führt zu einer Minderperfusion der Darmschleimhaut⁶. Auf Grund des hohen basalen Sauerstoffverbrauchs der gastrointestinalen Mukosa, führt die sympatho-adrenerg bedingte Perfusionsminderung frühzeitig zur mukosalen Sauerstoffunterversorgung und Gewebsschädigung^{1, 7}. Eine Erhöhung des Sympathikotonus führt jedoch auch zu einem Anstieg der Konzentration von Adrenalin und Noradrenalin im Blut. Adrenalin kann zu einer vermehrten Adhäsion von Immunzellen am Gefäßendothel mit konsekutiver Schädigung des Endothels und Extravasation der Immunzellen führen.

Die Splanchnikusorgane können somit gleichermaßen Ausgangs- und Angriffspunkt inflammatorischer Prozesse sein und spielen eine wichtige Rolle für die Initiation, Perpetuierung und Amplifikation der Ganzkörperinflammation^{3,8}.

Eine Immunmodulation und eine intestinale Perfusionsverbesserung erscheinen somit vielversprechende Ansatzpunkte zur Reduktion von Organschäden und konsekutiv zu einer Verringerung von Morbidität und Mortalität während einer Entzündungsreaktion zu sein.

In den vorliegenden experimentellen Studien wurden verschiedene therapeutische Ansätze untersucht, die intestinale Schädigung in der Endotoxinämie abzumildern:

I) Die thorakale Epiduralanästhesie vermindert den Endotoxin induzierten endothelialen Schaden.

Während des multifaktoriellen Geschehens einer systemischen Entzündungsreaktion steht die Aktivierung von Immun- und Endothelzellen im Vordergrund. Dies kann durch Lipopolysaccharid, einem strukturellen Bestandteil von gramnegativen Bakterien, ausgelöst werden⁹. Als verstärkender Faktor kommt die Endotoxin-induzierte Konzentrationserhöhung von Adrenalin und Noradrenalin im Blut hinzu. Dies führt zu einer Zytokinfreisetzung¹⁰ und stimuliert die Migration von Immunzellen zum Entzündungsort¹¹. Dadurch wird der Grad der Plasmaextravasation aus dem Gefäßsystem bestimmt.

Diese Arbeit untersucht die Frage, ob durch die sympathische Blockade des Nebennierenmarks und die konsekutiv verringerte Plasmakonzentration von Adrenalin der endotheliale Schaden verringert wird.

II) Eine regionale sympathische Blockade vermindert die Aktivierung intestinaler Makrophagen und reduziert den Schaden an der epithelialen Barriere des Darmes.

Das Epithel des Gastrointestinaltraktes erfüllt die wichtige Aufgabe, die Aufnahme von Stoffen zu selektieren und die Homöostase des Interstitiums vor der Umgebung des Darmlumens zu schützen. Eine systemische Inflammationsreaktion wird mit einer erhöhten Durchlässigkeit der epithelialen Barriere in Verbindung gebracht und ist eng mit einem negativen Krankheitsverlauf assoziiert¹². Zelluläre Hypoxie und oxidativer Stress erhöhen ebenfalls die intestinale epitheliale Permeabilität im Tierversuch¹³. Proinflammatorische Zytokine sorgen für eine diskontinuierliche

Exprimierung von *tight junction*-Proteinen¹⁴, verantwortlich für die Regulation des Transports von Mikroben und Toxinen vom Darmlumen in die systemische Zirkulation, und der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS). Dies hat die Erhöhung der NO-Konzentration zur Folge und fördert die bakterielle Translokation¹⁵. Die Steigerung der iNOS-Aktivität findet insbesondere in Makrophagen statt¹⁶.

Diese Arbeit untersucht die Frage, ob eine regionale sympathische Blockade in der Endotoxinämie durch die Beeinflussung monozytärer Zellen und des von ihnen produzierten Stickstoffmonoxids (NO) den oxidativen Stress im Gewebe vermindern kann.

III) Volumentherapie mit kolloidalen Lösungen erhält die intestinale Mikrozirkulation während der Endotoxinämie.

Eine der Säulen der Sepsis-Therapie ist eine adäquate Volumentherapie zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks und der Organdurchblutung¹⁷. Durch die Schädigung des Gefäßendothels kommt es zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Gefäße (*capillary leak syndrome*) und konsekutiv zu einem Volumenmangelschock und der Entstehung eines Gewebeödems. Grundsätzlich stehen für die Volumentherapie kristalloide Lösungen (z.B. NaCl 0,9%, Ringer-Laktat) und kolloidale Lösungen (z.B. Hydroxyethylstärke, Gelatine, Albumin) zur Verfügung. Kristalloide Lösungen enthalten im Gegensatz zu kolloidalen Lösungen keine onkotisch wirksamen Teilchen. Dies führt zu einer schnellen gleichmäßigen Verteilung der kristalloiden Lösung zwischen intravaskulärem und interstitiellem Kompartiment. Um einen vergleichbaren Volumeneffekt im Gefäß zu erreichen, muss daher ca. drei bis vier Mal mehr kristalloide Flüssigkeit gegeben werden. Dies verstärkt jedoch das Gewebeödem und ist mit Komplikationen im weiteren Krankheitsverlauf behaftet.

Diese Arbeit untersucht die Frage, welches der o.g. Volumenersatzmittel in seinem Einsatz in der Endotoxämie Vorteile hat.

Methodik

Tiere: Für alle Versuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten verwendet.

Experimentelle Protokolle: Die Narkose der Versuchstiere wurde mittels einer subkutanen Injektion von Urethan und einer intramuskulären Gabe von Ketamin durchgeführt und aufrecht

erhalten. Der mittlere arterielle Blutdruck, die Herzfrequenz sowie der zentralvenöse Druck wurden mithilfe eines Druckwandlers bestimmt und während der Experimente dokumentiert.

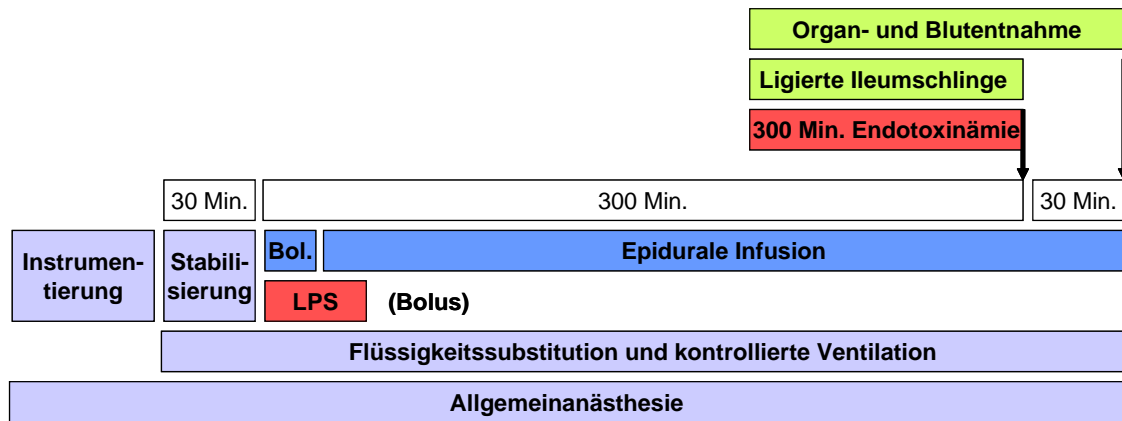
Die Anlage des Epiduralkatheters erfolgte nach einer modifizierten Methode von Bahar¹⁸. Die Körpertemperatur wurde mit einer Wärmematte konstant bei 36-37 °C gehalten. Je nach Studienprotokoll wurden die Tiere randomisiert in verschiedene Gruppen eingeteilt.

I) Die thorakale Epiduralanästhesie vermindert den Endotoxin induzierten endothelialen Schaden. (Pub. 1 Fig. 1)

Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt und erhielten nach der chirurgischen Präparation eine intravenöse Bolusinjektion von 5 ml NaCl 0,9 %. Die erste Gruppe erhielt eine kontinuierliche intravenöse Infusion von NaCl 0,9 % ($6.5 \text{ ml} \times \text{h}^{-1}$) sowie eine epidurale Bolusinjektion von 30 μl NaCl 0,9 % gefolgt von einer epiduralen kontinuierlichen Infusion von 30 $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1}$ (LPS - TEA -). Die zweite Gruppe erhielt eine kontinuierliche intravenöse Escherichia coli Lipopolysaccharid Infusion (Serotyp 0127: B8, Sigma Aldrich; $1,5 \text{ mg} \times \text{h}^{-1}$) und NaCl epidural, analog zur epiduralen NaCl Infusion (LPS + TEA -). Die dritte Gruppe wurde analog mit Endotoxin intravenös und Lidocain 1 % epidural behandelt (LPS + TEA +). Nach ca. 270 min wurde eine Ileumschlinge für die intravital-mikroskopische Bestimmung der mesenterialen Leukozyten-Endothel Interaktion ausgelagert und untersucht.

II) Eine regionale sympathische Blockade vermindert die Aktivierung intestinaler Makrophagen und reduziert den Schaden an der epithelialen Barriere des Darmes. (Pub 2)

Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt einen Bolus Escherichia coli Lipopolysaccharid von 50 mg $\times \text{kg} \text{ KG}^{-1}$ (Serotyp 026: B6, Sigma-Aldrich) gefolgt von einer epiduralen Bolusinjektion von 30 μl NaCl 0,9 % sowie einer epiduralen kontinuierlichen Infusion 30 $\mu\text{l} \times \text{h}^{-1}$ (LPS + / TEA -). Die zweite Gruppe erhielt nach der Endotoxin-Injektion Lidokain 2 % epidural (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) analog zur epiduralen NaCl Infusion (LPS + / TEA +). Die dritte Gruppe wurde mit NaCl anstatt mit Endotoxin oder Lidokain versorgt (LPS - / TEA -). Nach 300 min wurde eine Ileumschlinge für die Bestimmung der epithelialen Permeabilität ligiert.



Pub. 2 Studienprotokoll (in der Originalpublikation nicht dargestellt)

III) Volumentherapie mit Kolloidalen erhält die intestinale mikrovaskuläre Perfusion während einer Endotoxinämie. (Pub. 3 Fig. 1)

Die Tiere wurden in drei Gruppen eingeteilt. Alle Gruppen erhielten nach der Präparation des distalen Ileums und einer 30-minütigen Stabilisierungsphase eine kontinuierliche Infusion von Escherichia coli Lipopolysaccharid von $1,5 \text{ mg kg KG}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Serotyp 026: B6, Sigma-Aldrich). Nach einer Stunde Endotoxämie wurden die Tiere mit entweder $16 \text{ ml kg KG}^{-1} 6 \% \text{ HES } 130,0,4$ (Voluven[®], Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) oder $16 \text{ ml kg KG}^{-1} 4 \% \text{ Gelatine}$ (Gelafundin[®], B. Braun, Melsungen, Deutschland) oder $64 \text{ ml kg KG}^{-1} 0,9 \% \text{ isotoner Kochsalzlösung}$ (Boehringer Ingelheim Delta Pharma, Pfullingen, Deutschland) für eine weitere Stunde widerbelebt. Die Effekte der jeweiligen Volumentherapie wurden drei Stunden nach Beendigung der Widerbelebung mittels Intravitalmikroskopie untersucht.

Nach jedem Experiment wurden Organe (Dünndarmanteile, Leber, Herz, Lunge und Niere), Vollblut- und Plasmaproben für weitere Untersuchungen entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Einzelne Meßparameter:

Intravitalmikroskopie: Pro Tier wurden ca. 6-10 zufällig gewählte mukosale Villi des Ileums intravitalmikroskopisch untersucht. Für eine spätere off-line Auswertung wurden die Mikroskopiebilder aufgezeichnet. Mit einer speziellen Computersoftware wurden die Kapillardichte und Erythrozytengeschwindigkeit bestimmt.

Für die Bestimmung der Leukozyten-Endothelinteraktion wurden pro Tier 3-6 zufällig

gewählte Venolen des Dünndarmmesenteriums untersucht. Die Leukozyten-Endothelinteraktion und die Gefäßdurchmesser wurden ebenfalls off-line analysiert.

Plasmakatecholamine (Noradrenalin und Adrenalin): Plasmakonzentrationen von Noradrenalin und Adrenalin wurden mit einer Umkehrphasen hochleistungsfähigen flüssig Chromatographie (reversed phase high-performance liquid chromatography) und einem elektrochemischen Nachweisverfahren (Biorad, Munich, Germany) bestimmt.

Epitheliale Permeabilität: Als Maß der epithelialen Permeabilität wurde die FITC-Dextran-Konzentration im Pfortader- und arteriellen Blut mittels Fluoreszenzspektrophotometrie bestimmt. Je höher die Fluoreszenz war, desto größer war auch der epitheliale Schaden.

Endotheliale Permeabilität: Um den endothelialen Schaden zu quantifizieren, wurde der Quotient aus Nass- und Trockengewicht verschiedener Organe bestimmt. Der Quotient aus Nass- und Trockengewicht ist ein Maß für das entstandene Gewebeödem und somit für den endothelialen Schaden.

Histologische Untersuchungen / Immunhistochemische Quantifizierung der induzierbaren NO-Synthase / Makrophagen / endothelialen Adhäsionsmoleküle: Die nach dem Versuch entnommenen Darmabschnitte wurden in Paraformaldehyd fixiert, in Tissue-Tek eingebettet und eingefroren. Die Schnitte wurden entweder mit Hematoxylin / Eosin gefärbt (Villushöhe und -dicke, Ausdünnung der Epithelschicht, Vakuolisierung der Epithelzellen und submukosale Immunzellinfiltration) oder immunhistochemisch mit einem kommerziell erhältlichen Vectastain Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex Kit weiterbehandelt. Zur Quantifizierung wurden iNOS-immunreaktive Zellen in 4 Abschnitten und 10 Gesichtsfeldern pro Tier gezählt.

Um die Makrophagen zu identifizieren, wurden die Bilder der iNOS-Quantifizierung verwendet. Immunreaktive Zellen wurden anhand ihrer morphologischen Kriterien identifiziert.

Für die Bestimmung der endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, P-Selektin und ICAM1 wurde das Gewebe nach der Aufbereitung mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Durchschnittlich wurden fünf endotheliale Gefäßabschnitte pro Tier und zehn Gesichtsfelder ausgewertet. Sämtliche Auswertungen erfolgten durch einen Histopathologen, der das experimentelle Protokoll nicht kannte.

Nitrat / Nitrit und Lactat / Pyruvat Messungen: Die Konzentrationsbestimmung von Nitrat und Nitrit erfolgte mit einem kommerziellen Kit (Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) nach Anleitung des Herstellers. Analog dazu erfolgte die Bestimmung der Lactat und Pyruvat Konzentrationen (Randox Laboratories GmbH, Krefeld, Deutschland).

ELISAs: 8-Isoprostan, TNF α und IL1 β : Alle Untersuchungen erfolgten nach der Anleitung des Herstellers. Die Bestimmung der Konzentration von 8-Isoprostan im Dünndarm wurde mit einem kommerziellen Kit (8-Isoprostane EIA Kit, Catalog No. 516351, Cayman Chemical Company) ermittelt. Die Bestimmung von TNF α und IL1 β (TNF α / IL1 β BioSource Immunoassay Kit von BioSource International, Inc., Camarillo, CA, USA) wurden jeweils im Blutplasma vorgenommen.

Myeloperoxidase: Die Gewebeaktivität der Myeloperoxidase wurde nach einer modifizierten Methode von Kübler et al. bestimmt¹⁹. Die Aktivität wurde durch die Absorptionsveränderung nach der Zugabe von Tetramethylbenzidine gemessen.

FACS™ (fluorescence activated cell sorting) Analyse: Wir untersuchten die leukozytären Adhäsionsmoleküle L-Selektin, CD11b und CD 18 auf Granulozyten, die durch spezifische Antikörper markiert wurden.

Statistische Analysen: Die statistischen Tests wurden unter Verwendung des Computerprogramms Sigma Stat 3.1 oder Sigma Plot 11.0 durchgeführt. Alle Daten wurden auf mit der Kolmogorov-Smirnov Analyse ihre Normalverteilung geprüft.

Parametrische Daten wurden als Mittel \pm Standard Deviation und nicht parametrische Daten als Median, Quartilen und Ranges dargestellt. Hämodynamische Daten wurden mit einer one way analysis of variance (ANOVA) getestet, wobei eine *area under the curve* Berechnung zugrunde gelegt wurde. Normalverteilte Datensätze wurden mit einer Korrektur für multiple Vergleiche mit dem Student-Newman-Keuls-Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen geprüft. Für die weiteren Daten wurde je nach Normalverteilung eine einfaktoriellen Varianzanalyse bzw. die Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks verwendet. Die Korrektur für multiple Vergleiche erfolgte mit dem Student-Newman-Keuls- bzw. Dunn's Test. Unterschiede

zwischen Messwerten wurden als signifikant angesehen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als 0,05 war.

Ergebnisse

I) Die thorakale Epiduralanästhesie vermindert den Endotoxin induzierten endothelialen Schaden:

Hämodynamik & Säure-Basen Status: Die kontinuierliche Applikation von LPS führte zu einem signifikanten Abfall des mittleren arteriellen Druckes über den gesamten Experimentverlauf. Ein mittlerer arterieller Druck von kleiner als 80 mmHg wurde jedoch nicht unterschritten. Alle drei Gruppen wiesen einen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz auf, wobei die endotoxämischen Tiere gegenüber der gesunden Kontrolle eine signifikante Tachykardie über den Zeitverlauf zeigten. Nach 5 h Endotoxinämie hatten die Tiere eine respiratorisch kompensierte metabolische Azidose mit erniedrigtem pH, Base Excess und pCO₂. Der pO₂ war aufgrund der kompensatorischen Hyperventilation der endotoxämischen Tiere im Vergleich erhöht (*Pub. 1 Fig. 2 und Tab. 1*).

Endotheliale Adhäsionsmoleküle: Die Endotoxinämie führte zu einer Hochregulation der endothelialen Adhäsionsmoleküle E-Selektin, P-Selektin und ICAM1. Die TEA konnte dieses Ergebnis bezüglich E-Selektin und ICAM1 vermindern (*Pub. 1 Fig. 3*).

Leukozytäre Adhäsionsmoleküle: Nach 5 h LPS Exposition war die Expression von leukozytärem CD11b/CD18 nicht verändert. Ein signifikantes L-Selektin-Shedding fand in allen endotoxämischen Gruppen statt (*Pub.1 Fig. 4*).

Leukozyten Endothel-Interaktion: In der gesunden Kontrollgruppe wurde physiologisches Leukozyten-Rollen, -Adhärenz und Transmigration beobachtet. Endotoxinämie führte zu einer erhöhten Leukozytenadhärenz. Die Applikation der TEA reduzierte die Anzahl der rollenden und adhärierenden Leukozyten signifikant (*Pub. 1 Fig. 5 Panel A und B*).

Intestinale Myeloperoxidase Konzentration: Die intestinale Myeloperoxidase Aktivität war bei den endotoxämischen Tieren erhöht. Eine regionale Sympthikolyse mit der TEA reduzierte die Myeloperoxidaseaktivität auf das Niveau der gesunden Tiere (*Pub. 1 Fig. 5 Panel C*).

Intestinale Nass- / Trockengewicht Ratio: Die intestinale Nass- / Trockengewicht Ratio war bei den Tieren erhöht, die LPS erhielten. Eine Therapie mit der TEA konnte den Anstieg des Verhältnisses auf ein gesundes Niveau erniedrigen (*Pub. 1 Fig. 6*).

Plasma-Katecholamin Konzentration: Eine Veränderung der Plasma-Noradrenalin Konzentration war nach 5 h nicht feststellbar. Im Gegensatz dazu war die Adrenalin Konzentration im Plasma der endotoxämischen Tiere erhöht. Die regionale Sympathikolyse senkte die Adrenalin Konzentration auf einen Wert vergleichbar mit der gesunden Kontrollgruppe (*Pub. 1 Table 2*).

TNF α und IL1 β Plasmakonzentrationen: Nach 5 h Versuchsdauer war kein Unterschied in der TNF α Plasmakonzentration feststellbar. LPS stimulierte die Produktion von IL1 β . Dies konnte durch die TEA reduziert werden (*Pub. 1 Table 2*).

II) Eine regionale sympathische Blockade vermindert die Aktivierung intestinaler Makrophagen und reduziert den Schaden an der epithelialen Barriere des Darmes:

Hämodynamik & Säure-Basen Status: Nach der Bolusapplikation von LPS war der arterielle Druck für eine Zeitraum von ca. 30 min erniedrigt. Tiere mit einer TEA wiesen den größten Druckabfall auf. Der Blutdruck war für den Rest der Experimentdauer in allen Gruppen vergleichbar. Die Endotoxämie führte zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz.

Alle Tiere waren während des gesamten Experiments normoventiliert, der pH fiel aber bei allen endotoxämischen Tieren aufgrund einer metabolischen Azidose auf ein saures Niveau verbunden mit einem Abfall der Base-Excess Werte. Auch die Anzahl der Blutzellen war bei den endotoxämischen Tieren erniedrigt (*Pub. 2 Fig.1 und Tab. 2*).

Epitheliale Permeabilität: Die Plasmakonzentration des Fluoreszenzfarbstoffs nach Durchdringen des Darmbarriere war nur in den endotoxämischen Versuchstieren signifikant erhöht. Tiere, die eine regionale Sympathikolyse mittels TEA erhielten, wiesen eine erniedrigte Farbkonzentration im Portalvenenblut auf (*Pub. 2 Fig. 2*).

Intestinale Expression der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS): Die Expression der intestinalen iNOS war in allen endotoxämischen Tieren erhöht. TEA Tiere wiesen im Vergleich

zu der kranken Kontrollgruppe ohne Sympathikolyse eine signifikante Erniedrigung der iNOS Expression (*Pub. 2 Fig. 3*).

Histologische Bestimmung der Makrophageninfiltration des Dünndarms: Die Auszählung der iNOS exprimierenden Zellen im Dünndarm zeigte histomorphologisch, dass es sich um Makrophagen handelt. Daher stimmt die Anzahl der iNOS exprimierenden Zellen mit der Anzahl der Makrophagen überein. Die Ergebnisse der Makrophagen Infiltrationsquantifizierung sind analog zu Ergebnissen der iNOS exprimierenden Zellen zu sehen (*Pub. 2 Fig. 3*).

Konzentration von 8-Isoprostan im Dünndarm: Endotoxämische Tiere ohne TEA hatten eine erhöhte intestinale 8-Isoprostan Konzentration. Durch die TEA wurde die 8-Isoprostan Konzentration auf das Niveau der gesunden Kontrollgruppe gesenkt (*Pub. 2 Fig. 4*).

Blut- und Gewebekonzentrationen von NO-Metaboliten (Nitrat / Nitrit): Die Konzentration der NO-Metaboliten war im Blut und im Gewebe aller endotoxämischen Tiere ohne TEA erhöht. Eine signifikante Erniedrigung der NO-Metaboliten im Vergleich zu der kranken Kontrollgruppe wurde im Herz und in der Lunge festgestellt (*Pub. 2 Table 3*).

III) Volumentherapie mit Kolloidalen erhält die intestinale mikrovaskuläre Perfusion während einer Endotoxinämie.

Hämodynamik & Säure-Basen Status: Die makrohämodynamischen Parameter (mittlerer arterieller Druck, Herzfrequenz und zentralvenöser Druck) waren in allen Gruppen vergleichbar. Während der mittlere arterielle und zentralvenöse Druck sich während des experimentellen Verlaufs nicht veränderte, stieg die Herzfrequenz nach 2 h Endotoxämie dauerhaft an.

Alle Tiere waren während des gesamten Experiments normoventiliert. Bei allen Tieren stellte sich endotoxinämiebedingt eine metabolische Azidose ein, die am stärksten in der NaCl-Gruppe ausgeprägt war. Thrombozyten und Hämatokrit waren bei allen Tieren gleichermaßen erniedrigt, die Leukozytenzahl stieg nur in der Gelatine-Gruppe an (*Pub. 1 Tab. 1 und 2*).

Mikrovaskuläre Perfusion: Nur in der mit NaCl therapierten Gruppe wurde eine Abnahme der funktionellen Kapillardichte im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet (*Pub. 3 Fig. 2*).

Intestinale Oxygenierung, intestinale Morphologie und Leukozyten Endothel-Interaktion:

Für alle diese Parameter konnten 3 h nach Wiederbelebung keine signifikanten Gruppenunterschiede gefunden werden (*Pub. 3 Fig. 3-5*).

Diskussion

Die vorliegenden Studien untersuchten die verschiedenen Möglichkeiten die intestinale Zirkulation zu verbessern. Einerseits wurde der Einfluss der regionalen Sympathikolyse mittels thorakaler Epiduralanästhesie (TEA) und andererseits verschiedener Formen der Volumentherapie auf darm-assoziierte Endotoxämien untersucht. In verschiedenen Rattenmodellen konnte gezeigt werden, dass

- I. während einer normotensiven Endotoxämie die intestinal-endotheliale Permeabilität durch eine TEA vermindert werden konnte. Dieses Ergebnis war mit einer verminderten Leukozyten-Endothel Interaktion und einer verminderten catecholamin-assoziierten endothelialen Adhäsionsmolekül-Expression verbunden.
- II. während einer normotensiven Endotoxinämie die intestinal-epitheliale Permeabilität durch eine TEA vermindert werden konnte. Dieser Effekt war mit einer Reduktion der intestinalen Makrophageninfiltration, sowie der intestinalen NO Produktion und Lipidperoxidation verbunden.
- III. die mikrovaskuläre Perfusion der Ileummukosa während einer Endotoxämie nach einer frühen Volumentherapie mit isotoner Kochsalzlösung beeinträchtigt wird, während die Anwendung von HES oder Gelatine in isovolumetrischer Dosierung anscheinend die mikrovaskuläre Perfusion aufrecht erhält.

I) Die thorakale Epiduralanästhesie vermindert den Endotoxin induzierten endothelialen Schaden.

Die Studie bestätigte die vorbeschriebene LPS-induzierte Freisetzung des inflammatorischen Zytokins IL1 β als Induktor eines endothelialen Schadens²⁰. Ähnlich wie LPS vermag auch Adrenalin das Zytokin IL1 β aus Makrophagen freizusetzen und eine Organschädigung zu verschlimmern¹⁰. Zudem konnte in endothelialen Zellkulturen ein klarer Zusammenhang

zwischen der Inkubation mit Adrenalin und der Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen aufgezeigt werden²¹, ebenso wie IL1 β die Expression der endothelialen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und E-Selektin bewirkt^{22, 23}. Die verminderte Expression des leukozytären Adhäsionsmoleküls L-Selektin in endotoxämischen Tieren (Pub. 1 Fig. 4) interpretierten wir als vermehrte Abstoßung des Moleküls von der Immunzelloberfläche (shedding) nach LPS Kontakt²⁴. Der fehlende LPS Effekt auf CD11b/CD18-Integrine (Pub. 1 Fig.4) war mit der Expression der Moleküle zu einem früheren Zeitpunkt (30 Minuten nach LPS-Kontakt) zu erklären²⁵.

TEA verminderte die LPS-induzierte IL-1 β Plasmakonzentration. TEA war zudem mit einer geringeren Expression von E-Selektin und ICAM-1, nicht jedoch von P-Selektin assoziiert (Pub 1 Fig. 3). Da die immunhistochemische Untersuchung nicht zwischen intrazellulär gespeichertem oder externalisiertem P-Selektin unterscheiden kann, stellten wir die Hypothese auf, dass P-Selektin, welches in endothelialen Weibel-Palade Körpern gespeichert wird, durch TEA weniger externalisiert und abgestoßen (shedding) wird. Eine verminderte IL-1 β Plasmakonzentration und Expression von ICAM-1 war auch in Ischämie-Reperfusion-Versuchen an Ratten unter TEA gezeigt worden²⁶. TEA hatte keinen Effekt auf die leukozytäre Expression von Adhäsionsmolekülen (Pub. 1 Fig. 4).

Die Leukozyten-Endothel Interaktion in mesenterialen Venolen zeigte eine vermehrte Anzahl der rollenden Zellen alleine durch den chirurgischen Stress der Präparation, der in TEA Tieren jedoch abgeschwächt war (Pub.1 Fig 5 Panal A). Ebenso zeigte die TEA einen anti-inflammatorischen Effekt auf die LPS induzierte Leukozytenadhäsion und Extravasation (Aktivität der leukozytären Myeloperoxidase, (Pub 1 Fig. 5 Panel B und C). Diese Effekte der TEA lassen sich alleine durch die Reduktion der endothelialen Adhäsionsmoleküle erklären: so kam es in anderen Studien ebenfalls nach ICAM-1 Blockade zu einer Verminderung der Leukozyten-Endothel Interaktion²⁷ und der Myeloperoxidase-Aktivität²⁸.

Die endotheliale Schädigung durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus adhärierenden Leukozyten (oxidative burst) gilt als primärer Schädigungsmechanismus²⁹, obgleich eine Leukozytenadhäsion ohne endotheliale Schädigung möglich ist und vielmehr die gleichzeitige Aktivierung der Endothelzellen von besonderer Bedeutung ist³⁰. Dies erklärt, dass TEA über eine Verminderung der Leukozytenadhäsion und –extravasation das intestinale Gewebeödem als Surrogatmarker der erhöhten endothelialen Durchlässigkeit verringert (Pub. 1 Fig. 6). Drei potentielle Mechanismen sind hierfür denkbar: Zum einen kann TEA die direkte

Interaktion zwischen Nerven- und Immunzellen (nerve-immune interplay), z.B. in innerviertem lymphatisches Gewebe beeinflussen³¹. Immunzellen würden auf diese Weise geringeren Mengen an adrenergen Transmittersubstanzen und einem verhältnismäßig höheren Anteil an parasympathischen Transmittern ausgesetzt sein. Die stark antiinflammatorische Wirkung nach Stimulation der parasympathischen Efferenz Nervus vagus wird auf das nerve-immune interplay zurückgeführt^{32, 33}. Zum anderen muss auch ein systemischer Effekt des epidural applizierten Lidocains diskutiert werden, der für Zytokinfreisetzung³⁴, die Expression von leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen^{34, 35} und die Leukozytenadhäsion^{36, 37} aufgezeigt wurde, wenn auch in deutlich höheren Lokalanästhetika-Konzentrationen (sofern quantifiziert) als in diesen Experimenten. Nicht zuletzt kann TEA Immunzellen durch eine Senkung der Adrenalin-Konzentration im Plasma beeinflussen. So konnte gezeigt werden, dass Katecholamine die Expression leukozytärer Adhäsionsmoleküle induzieren³⁸. Eine Senkung der Adrenalin-Plasmakonzentration durch TEA, wie sie in diesen Experimenten gezeigt werden konnte, würde daher die verminderte leukozytäre Adhäsion und Extravasation bei TEA-Tieren erklären.

II) Eine regionale sympathische Blockade vermindert die Aktivierung intestinaler Makrophagen und reduziert den Schaden an der epithelialen Barriere des Darmes.

Um die epitheliale Schädigung zu erreichen, musste zunächst ein LPS-Hochdosis-Modell etabliert werden. Die Hochdosis wurde per Bolus verabreicht und führte nach einer kurzen hypotensiven Phase zu einer normotensiven Endotoxinämie mit Anstieg der Herzfrequenz. Zudem kam es zu einem Abfall von Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten, mutmaßlich als Ausdruck der Zelladhäsion am Endothel^{29, 39, 40}. Die Hochdosis LPS führte zu einer Schädigung des Darmepithels mit erhöhter epithelialer Permeabilität des terminalen Ileums. Als vorbeschriebener Mechanismus wurde die erhöhte Produktion von NO⁴¹⁻⁴³ in Makrophagen des terminalen Ileums dargestellt. Eine erhöhte Lipidperoxidation mit Bildung von 8-Isoprostan wurde als Ausdruck des erhöhten oxidativen⁴⁴ bzw. nitrosativen⁴⁵ Stresses gewertet.

TEA verminderte die Gewebeeinfiltration mit NO-produzierenden Makrophagen und senkte die epitheliale Permeabilität sowie die Lipidperoxidation. Die Beobachtung, dass TEA die Permeation von Fluoreszenz-Farbstoff in den systemischen Kreislauf in der Endotoxinämie vermindert⁴⁶ konnte somit auch für den portalvenösen Kreislauf gezeigt und mit der zellulären Immunreaktion assoziiert werden. Da ein enger Zusammenhang zwischen epithelialer

Permeabilität und bakterieller Translokation besteht^{46, 47} kann zudem eine Beeinflussung des Übertritts von Bakterien in den portalvenösen und systemischen Kreislauf durch TEA postuliert werden. Als mögliche Mechanismen kommen die bei Publikation 1 bereits diskutierten Mechanismen neural-immune interplay, systemischer Lidocain-Effekt und Senkung der Adrenalin-Plasmakonzentration in Frage. So konnte neben den oben beschriebenen Effekten auf Adhäsionsmoleküle und Zelladhäsion in monozytären Zellkulturen gezeigt werden, dass Katecholamine die Produktion von NO in diesen Zellen steigern⁴⁸. Eine Senkung der Adrenalin-Plasmakonzentration durch TEA würde daher die verminderte NO-Produktion der Immunzellen mit konsekutiv geringerer epithelialer Schädigung erklären. Ein zusätzlicher Einfluss der anderen beiden Mechanismen ist jedoch denkbar und durch unsere Untersuchungen nicht auszuschließen.

III) Volumentherapie mit kolloidalen Lösungen erhält die intestinale Mikrozirkulation während der Endotoxinämie.

Da die makrohämodynamischen Variablen in allen Gruppen ohne messbare Unterschiede blieben, können die Abweichungen in der mikrovaskulären Perfusion auf lokal wirksame mikrovaskuläre Mechanismen zurückgeführt werden. Als Teil der systemischen Immunantwort zeigten alle Tiere nach zwei Stunden Endotoxininfusion einen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz. Die Gabe von kristalloidem Volumenersatz senkt den kolloid-osmotischen Druck, was zu einem schnellen Ausgleich des Flüssigkeitsvolumens zwischen dem interstitiellen und intravaskulären Kompartiment führt. Daraus ergibt sich eine 3-4 fach höhere Dosierung des zu substituierenden Volumens im Vergleich zu kolloidalem Volumenersatz⁴⁹⁻⁵¹. Auch in unserer Studie führte die 4-fach höhere Volumensubstitution mit Kristalloiden zu einem vergleichbaren hämodynamischen Zustand wie unter der Anwendung von Kolloiden.

Die Volumentherapie induzierte in allen Gruppen eine milde metabolische Azidose nach Wiederbelebung, allerdings war der Base Excess in der Gelatine Gruppe weniger negativ als in der HES oder NaCl Gruppe. Eine mögliche Erklärung liefern die unterschiedlichen pH Werte (4,0-5,5 HES, 5,0-7,0 NaCl 0,9 % und 7,1-7,7 Gelatine) und Chlorid Konzentrationen (154 mmol/l HES und NaCl 0,9 %, 120 mmol/l Gelatine) der Lösungen. Gestützt wird diese Annahme durch eine Studie von Scheingraber und Kollegen⁵², der eine hyperchlorämische Azidose unter schneller Kristalloidgabe beschrieben hat.

Die Therapie mit NaCl 0,9 %, nicht jedoch mit den kolloidalen Lösungen, führte zu einer

Verschlechterung der mukosalen Mikrozirkulation (funktionelle Kapillardichte) im Vergleich zum Ausgangswert. In weiteren Untersuchungen konnte kein Unterschied in der Gewebe-Oxygenierung, der Leukozyten-Adhäsion, und histomorphologischen Schädigung zwischen den 3 Volumentherapie-Gruppen aufgezeigt werden.

Da die Makrohämodynamik und der Volumenstatus aller Tiere vergleichbar waren, sind die Unterschiede in der Mikrozirkulation damit nicht zu erklären. Vielmehr muss ein Effekt innerhalb der Mikrozirkulation, wie z.B. die Erythrozyten-Rigidität, die endotheliale Schwellung oder das Ausmaß des umgebenden Gewebeödems bedacht werden. Ein Effekt der kolloidalen Lösungen auf die Immunreaktion auf Endotoxin war in diesen Untersuchungen als Ursache nicht zu finden.

Nach der Anwendungsbeschränkung von Hydroxyethylstärke infolge der Studienlage zur Nebenwirkung auf die Nierenfunktion bei Patientin mit septischem Schock, bleibt die Verwendung der kolloidalen Lösungen Gelatine und Albumin zur Volumentherapie in der Sepsis. Zukünftige Arbeiten werden deren rationale Verwendung zur Verbesserung der intestinalen Mikrozirkulation und Barrierefunktion in der Sepsis eruieren müssen.

Reference List

1. Baker JW, Deitch EA, Li M, Berg RD, Specian RD. Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. *J Trauma* 1988;28(7):896-906.
2. Wang P, Ba ZF, Biondo A, Chaudry I. Liver endothelial cell dysfunction occurs early following hemorrhagic shock and persists despite crystalloid resuscitation. *J Surg Res* 1996;63(1):241-247.
3. Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 1990;125(3):403-404.
4. Gonzalez-Ariki S, Husband AJ. The role of sympathetic innervation of the gut in regulating mucosal immune responses. *Brain Behav Immun* 1998;12(1):53-63.
5. 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;287(6):G1238-G1246.
6. Price HL, Deutsch S, Marshall BE, Stephen GW, Behar MG, Neufeld GR. Hemodynamic and metabolic effects of hemorrhage in man, with particular reference to the splanchnic circulation. *Circ Res* 1966;18(5):469-474.
7. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970;101(4):478-483.
8. Pastores SM, Katz DP, Kvetan V. Splanchnic ischemia and gut mucosal injury in sepsis and the multiple organ dysfunction syndrome. *Am J Gastroenterol* 1996;91(9):1697-1710.

9. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002;420(6917):885-891.
10. Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA et al. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 2007;449(7163):721-725.
11. Yadav R, Larbi KY, Young RE, Nourshargh S. Migration of leukocytes through the vessel wall and beyond. *Thromb Haemost* 2003;90(4):598-606.
12. Clayburgh DR, Shen L, Turner JR. A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest* 2004;84(3):282-291.
13. 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;12(4-6):105-114.
14. Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36(7):1206-1237.
15. 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;131(11):1155-1163.
16. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988;333(6174):664-666.
17. 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;345(19):1368-1377.
18. Bahar M, Rosen M, Vickers MD. Chronic cannulation of the intradural or extradural space in the rat. *Br J Anaesth* 1984;56(4):405-410.
19. Kuebler WM, Abels C, Schuerer L, Goetz AE. Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. *Int J Microcirc Clin Exp* 1996;16(2):89-97.
20. Fishel RS, Are C, Barbul A. Vessel injury and capillary leak. *Crit Care Med* 2003;31(8 Suppl):S502-S511.
21. Jin WL, Azuma K, Mita T et al. Repetitive hypoglycaemia increases serum adrenaline and induces monocyte adhesion to the endothelium in rat thoracic aorta. *Diabetologia* 2011;54(7):1921-1929.
22. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994;84(7):2068-2101.
23. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* 1986;137(1):245-254.
24. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science* 1989;245(4923):1238-1241.
25. Lynn WA, Raetz CR, Qureshi N, Golenbock DT. Lipopolysaccharide-induced stimulation of CD11b/CD18 expression on neutrophils. Evidence of specific receptor-based response and inhibition by lipid A-based antagonists. *J Immunol* 1991;147(9):3072-3079.
26. Bedirli N, Akyurek N, Kurtipek O, Kavutcu M, Kartal S, Bayraktar AC. Thoracic epidural bupivacaine attenuates inflammatory response, intestinal lipid peroxidation, oxidative injury, and

- mucosal apoptosis induced by mesenteric ischemia/reperfusion. *Anesth Analg* 2011;113(5):1226-1232.
27. Beuk RJ, Oude Egbrink MG, Kurvers HA, Bonke HJ, Tangelder GJ, Heineman E. Ischemia/reperfusion injury in rat mesenteric venules: red blood cell velocity and leukocyte rolling. *J Pediatr Surg* 1996;31(4):512-515.
 28. Ilhan H, Alatas O, Tokar B, cOlak O, Pasaoglu O, Koku N. Effects of the anti-ICAM-1 monoclonal antibody, allopurinol, and methylene blue on intestinal reperfusion injury. *J Pediatr Surg* 2003;38(11):1591-1595.
 29. McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res* 1996;32(4):752-763.
 30. He P. Leucocyte/endothelium interactions and microvessel permeability: coupled or uncoupled? *Cardiovasc Res* 2010;87(2):281-290.
 31. Straub RH, Schaller T, Miller LE et al. Neuropeptide Y cotransmission with norepinephrine in the sympathetic nerve-macrophage interplay. *J Neurochem* 2000;75(6):2464-2471.
 32. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000;405(6785):458-462.
 33. 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;107(8):1189-1194.
 34. Herroeder S, Pecher S, Schonherr ME et al. Systemic lidocaine shortens length of hospital stay after colorectal surgery: a double-blinded, randomized, placebo-controlled trial. *Ann Surg* 2007;246(2):192-200.
 35. Lan W, Harmon D, Wang JH, Ghori K, Shorten G, Redmond P. The effect of lidocaine on in vitro neutrophil and endothelial adhesion molecule expression induced by plasma obtained during tourniquet-induced ischaemia and reperfusion. *Eur J Anaesthesiol* 2004;21(11):892-897.
 36. MacGregor RR, Thorner RE, Wright DM. Lidocaine inhibits granulocyte adherence and prevents granulocyte delivery to inflammatory sites. *Blood* 1980;56(2):203-209.
 37. Schmidt W, Schmidt H, Bauer H, Gebhard MM, Martin E. Influence of lidocaine on endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo. *Anesthesiology* 1997;87(3):617-624.
 38. Rainer TH, Lam N, Cocks RA. Adrenaline upregulates monocyte L-selectin in vitro. *Resuscitation* 1999;43(1):47-55.
 39. Andonegui G, Kerfoot SM, McNagny K, Ebbert KV, Patel KD, Kubes P. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 2005;106(7):2417-2423.
 40. Eichelbronner O, Sielenkamper A, Cepinskas G, Sibbald WJ, Chin-Yee IH. Endotoxin promotes adhesion of human erythrocytes to human vascular endothelial cells under conditions of flow. *Crit Care Med* 2000;28(6):1865-1870.
 41. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sci* 2004;75(6):639-653.

42. 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;19(3):229-237.
43. 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;268(2 Pt 1):G361-G373.
44. 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;277(48):46116-46122.
45. Matejovic M, Krouzecky A, Martinkova V et al. Selective inducible nitric oxide synthase inhibition during long-term hyperdynamic porcine bacteremia. *Shock* 2004;21(5):458-465.
46. Kosugi S, Morisaki H, Satoh T et al. Epidural analgesia prevents endotoxin-induced gut mucosal injury in rabbits. *Anesth Analg* 2005;101(1):265-72, table.
47. Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996;20(4):411-417.
48. Chi DS, Qui M, Krishnaswamy G, Li C, Stone W. Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. *Nitric Oxide* 2003;8(2):127-132.
49. Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. Hydroxyethyl starch (130 kD), but not crystalloid volume support, improves microcirculation during normotensive endotoxemia. *Anesthesiology* 2002;97(2):460-470.
50. Marx G, Pedder S, Smith L et al. Resuscitation from septic shock with capillary leakage: hydroxyethyl starch (130 kd), but not Ringer's solution maintains plasma volume and systemic oxygenation. *Shock* 2004;21(4):336-341.
51. Morisaki H, Bloos F, Keys J, Martin C, Neal A, Sibbald WJ. Compared with crystalloid, colloid therapy slows progression of extrapulmonary tissue injury in septic sheep. *J Appl Physiol* (1985) 1994;77(3):1507-1518.
52. Scheingraber S, Rehm M, Sehmisch C, Finsterer U. Rapid saline infusion produces hyperchloremic acidosis in patients undergoing gynecologic surgery. *Anesthesiology* 1999;90(5):1265-1270.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Fabian Lukas Enigk, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Effekte verschiedenener Therapieansätze auf den Endotoxin-geschädigten Darm*“ 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) 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 den ausgewählten Publikationen 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: 15.11.2014

Unterschrift

Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Fabian Lukas Enigk hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Fabian Enigk, Antje Wagner, Rudi Samapati, Heike Rittner, Alexander Brack, Shaaban A Mousa, Michael Schäfer, Helmut Habazettl, Jörn Schäper;
Thoracic epidural anesthesia decreases endotoxin-induced endothelial injury;
BMC Anesthesiology; 2014

60 Prozent

Fabian Enigk hat am Studiendesign mitgearbeitet, die Methoden entwickelt und optimiert, bei der Aufbereitung der Proben mitgewirkt, die Analyse der Daten vorgenommen und das Manuskript verfasst.

Publikation 2:

Jörn Schäper, Antje Wagner, Fabian Enigk, Bernhard Brell, Shaaban A. Mousa, Helmut Habazettl, Michael Schäfer;
Regional Sympathetic Blockade Attenuates Activation of Intestinal Macrophages and Reduces Gut Barrier Failure;
Anesthesiology; 2013

40 Prozent

Fabian Enigk hat bei der Aufbereitung der Proben sowie bei der Durchführung der Experimente, der Analyse und Diskussion der Daten und der Erstellung des Manuskriptes mitgewirkt.

Publikation 3:

Jörn Schäper, Raees Ahmed, Tobias Schäfer, Antje Elster, Fabian Enigk, Helmut Habazettl, Shaaban Mousa, Michael Schäfer, Martin Welte;

Volume therapy with colloid solutions preserves intestinal microvascular perfusion in endotoxaemia;

Resuscitation; 2007

20 Prozent

Fabian Enigk hat bei der Aufbereitung der Gewebeproben, der Datenanalyse und dem Manuskriptentwurf mitgewirkt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

Ausgewählte Publikationen:

I. Thoracic epidural anesthesia decreases endotoxin-induced endothelial injury:

<http://dx.doi.org/10.1186/1471-2253-14-23>

II. Regional sympathetic blockade attenuates activation of intestinal macrophages and reduces gut barrier failure:

<http://dx.doi.org/10.1097/ALN.0b013e3182784c93>

III. Fluid resuscitation with colloid solutions preserves intestinal microvascular perfusion in endotoxemia:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.resuscitation.2007.06.026>

Lebenslauf:

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

Effekte verschiedener Therapieansätze auf den Endotoxin- geschädigten Darm.

Fabian Lukas Enigk

Ausgewählte Publikationen:

I.

Enigk F, Wagner A, Samapati R, Rittner H, Brack A, Mousa SA, Schäfer M, Habazettl H, Schäper J.

Thoracic epidural anesthesia decreases endotoxin-induced endothelial injury.

BMC Anesthesiol. 2014 Apr 5;14:23. doi: 10.1186/1471-2253-14-23. eCollection 2014.

IF (2013) 1,19

II.

Schäper J, Wagner A, **Enigk F**, Brell B, Mousa SA, Habazettl H, Schäfer M.

Regional sympathetic blockade attenuates activation of intestinal macrophages and reduces gut barrier failure.

Anesthesiology. 2013 Jan;118(1):134-42. **IF (2012) 5,163**

III.

Schäper J, Ahmed R, Schäfer T, Elster A, **Enigk F**, Habazettl H, Mousa S, Schäfer M, Welte M.

Fluid resuscitation with colloid solutions preserves intestinal microvascular perfusion in endotoxemia.

Resuscitation 2008 76(1):120-8 Epub 2007 Aug 13 **IF (2007): 2,550**

Danksagung

Eine wissenschaftliche Arbeit ist nie das Werk einer einzelnen Person.

Deshalb möchte ich mich bei allen jenen Menschen bedanken, die mich bei der Erstellung meiner Dissertation unterstützt haben.

Herr PD Doktor Schäper hat mich zu jeder Zeit mit seinem breiten Fundament an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen in die richtige Richtung gelenkt.

Herr Professor Habazettl stand mir stets für konstruktive Gespräche zur Verfügung.

Meinen wissenschaftlichen Kollegen am Institut für Physiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, im Speziellen Frau Doktor Wagner, Herrn Doktor Samapati und Herrn Doktor Neye, danke ich für die immer zielführenden Diskussionen und die tatkräftige Unterstützung.

Ohne den Beistand der Sonnenfeldstiftung, im Besonderen ist an dieser Stelle Herr Professor von Villiez zu nennen, wäre meine Arbeit gar nicht erst möglich gewesen.

Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Familie Carolin, Milena und meine inzwischen leider verstorbene Mutter Helga, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben.

Ihnen gilt mein ganz besonderer Dank!