

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

**Einfluss von EUK-8 auf die funktionelle Kapillardichte und  
die Leukozyten-Endothel-Interaktion bei experimenteller  
Endotoxinämie**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin**

Von  
Constanze Gilch, geb. Heise  
Tierärztin  
aus Hoyerswerda

**Berlin 2008**

**Journal-Nr.: 3257**

**Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

<b>Dekan:</b>	Univ.-Prof. Dr. Leo Brunberg
<b>Erster Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Heike Tönhardt
<b>Zweiter Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Claudia Spies
<b>Dritter Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): endotoxaemia, organometallic compounds (MeSH), leukocytes , animal models, rats , antioxidants, mesentery, microcirculation (MeSH), microscopy, lipid peroxidation

**Tag der Promotion:** 02.03.2009

## **Meinen Eltern**

# Inhalt

<b>INHALT</b> .....	<b>4</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>7</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
<b>2 THEORETISCHE VORBETRACHTUNGEN</b> .....	<b>10</b>
<b>2.1 DEFINITIONEN</b> .....	<b>10</b>
<b>2.2 PATHOGENESE DER SEPSIS</b> .....	<b>12</b>
2.2.1 ENDOTOXIN UND ENDOTOXINREZEPTOREN .....	12
2.2.2 MEDIATOREN .....	14
2.2.2.1 TUMORNEKROSEFAKTOR .....	15
2.2.2.2 PROINFLAMMATORISCHE ZYTOKINE .....	15
2.2.2.3 ANTIINFLAMMATORISCHE ZYTOKINE.....	16
2.2.3 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES .....	17
2.2.4 FUNKTIONELLE KAPILLARDICHTE .....	20
2.2.5 LEUKOZYTEN UND LEUKOZYTEN-ENDOTHEL-INTERAKTION.....	21
<b>2.3 BEDEUTUNG DES INTESTINUMS FÜR DIE PATHOGENESE DER SEPSIS</b> .....	<b>27</b>
<b>2.4 THERAPIEKONZEPTE BEI SEPSIS</b> .....	<b>29</b>
<b>2.5 EUK-8</b> .....	<b>31</b>
2.5.1 ALLGEMEINES .....	31
2.5.2 PHARMAKODYNAMIK .....	31
2.5.3 EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN .....	32
2.5.4 KLINISCHE ANWENDUNGEN .....	33
<b>3 FRAGESTELLUNG</b> .....	<b>34</b>
<b>4 METHODIK</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1 VERSUCHSTIERE</b> .....	<b>35</b>
4.1.1 TIERMATERIAL .....	35
4.1.2 GRUPPENEINTEILUNG .....	36
<b>4.2 VERSUCHSMODELL</b> .....	<b>37</b>
4.2.1 VERSUCHSABLAUF .....	37
4.2.2 ANÄSTHESIE UND MONITORING .....	38
4.2.3 OPERATIVE TECHNIK.....	39

<b>4.3 LABOR .....</b>	<b>40</b>
4.3.1 LEUKOZYTEN .....	40
4.3.2 MALONDIALDEHYD .....	40
4.3.3 OXIDIERTE LOW DENSITY LIPOPROTEINE (oxLDL) .....	40
4.3.4 ADVANCED OXIDATION PROTEIN PRODUCTS (AOPP).....	41
4.3.5 KONTROLLE ZUR PEROXIDBESTIMMUNG .....	41
4.3.6 ANTIOXIDATIVE KAPAZITÄT .....	42
<b>4.4 INTRAVITALMIKROSKOPIE .....</b>	<b>43</b>
4.4.1 TECHNIK.....	43
4.4.2 FUNKTIONELLE KAPILLARDICHTE .....	45
4.4.2 LEUKOZYTENADHÄRENZ .....	46
<b>4.5 STATISTIK.....</b>	<b>47</b>

## **5 ERGEBNISSE .....** **48**

<b>5.1 INTRAVITALMIKROSKOPIE .....</b>	<b>48</b>
5.1.1 FUNKTIONELLE KAPILLARDICHTE.....	48
5.1.2 LEUKOZYTENADHÄRENZ.....	50
5.1.2.1 TEMPORÄR ADHÄRENTE LEUKOZYTEN .....	50
5.1.2.2 FEST ADHÄRENTE LEUKOZYTEN.....	51
<b>5.2 LABORPARAMETER.....</b>	<b>52</b>
5.2.1 LEUKOZYTENZAHL.....	52
5.2.2 MALONDIALDEHYD .....	53
5.2.3 OXIDIERTE LOW-DENSITY-LIPOPROTEINE (oxLDL).....	54
5.2.3 ADVANCED OXIDATION PROTEIN PRODUCTS (AOPP).....	55
5.2.5 KONTROLLEN ZUR PEROXID-BESTIMMUNG.....	56
5.2.6 ANTIOXIDATIVE KAPAZITÄT .....	57
<b>5.3 HÄMODYNAMIK .....</b>	<b>58</b>
5.3.1 MITTLERER ARTERIELLER BLUTDRUCK.....	58
5.3.2 HERZFREQUENZ .....	59
5.3.3 ATEMFREQUENZ.....	60

## **6 DISKUSSION .....** **61**

<b>6.1 DISKUSSIONSGRUNDLAGEN .....</b>	<b>61</b>
<b>6.2 DISKUSSION DER METHODIK METHODIK .....</b>	<b>61</b>
6.2.1 SEPSISMODELLE .....	61
6.2.2 ANÄSTHESIE UND MONITORING .....	62
6.2.3 OPERATIVE TECHNIK .....	62
6.2.4 INTRAVITALMIKROSKOPIE .....	63
<b>6.3 DISKUSSION DER ERGEBNISSE DER INTRAVITALMIKROSKOPIE.....</b>	<b>64</b>
6.3.1 FUNKTIONELLE KAPILLARDICHTE .....	64
6.3.2 LEUKOZYTEN-ENDOTHEL-INTERAKTION.....	65
6.3.2.1 TEMPORÄR ADHÄRENTE LEUKOZYTEN.....	65
6.3.2.2 FEST ADHÄRENTE LEUKOZYTEN.....	67

<b>6.4 DISKUSSION DER ERGEBNISSE DER LABORUNTERSUCHUNGEN .....</b>	<b>68</b>
6.4.1 LEUKOZYTENZAHL .....	68
6.4.2 MALONDIALDEHYD .....	69
6.4.3 OXIDIERTE LOW-DENSITY-LIPOPOTEINE (oxLDL) .....	70
6.4.4 ADVANCED OXIDATION PROTEIN PRODUCTS (AOPP) .....	71
6.4.5 KONTROLLE ZUR PEROXID-BESTIMMUNG .....	72
6.4.6 ANTIOXIDATIVE KAPAZITÄT .....	73
<b>6.5 DISKUSSION DER HÄMODYNAMIK.....</b>	<b>74</b>
6.5.1 MITTLERER ARTERIELLER BLUTDRUCK.....	74
6.5.2 HERZFREQUENZ.....	75
6.5.3 ATEMFREQUENZ.....	76
<b><u>7 ZUSAMMENFASSUNG .....</u></b>	<b><u>77</u></b>
<b><u>8 SUMMARY.....</u></b>	<b><u>79</u></b>
<b><u>9 LITERATUR.....</u></b>	<b><u>81</u></b>

## Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AF	Atemfrequenz
AOPP	advanced oxidation protein products
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
BPI	Bactericidal Permeability-increasing Protein
CRP	C-reaktives Protein
CSF	Colony-Stimulating Factor
DIC	Disseminierte intravasale Koagulopathie
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E. coli	Escherichia coli
GALT	Gut Associated Lymphatic Tissue
h	Stunde
HDL	High Density Lipoprotein
3HF	Herzfrequenz
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IVM	Intravitalmikroskopie
KG	Körpergewicht
LAF	Lymphocyte Activating Factor (Lymphozyten aktivierender Faktor)
LDL	Low Density Lipoprotein
LEI	Leukozyten-Endothel-Interaktion
LFA-1	Lymphocyte Function Associated Antigen
LPB	Lipopolysaccharide Binding Protein
LPS	Lipopolysaccharide
Mac-1	Integrin $\alpha M/\beta 2$
MAdCAM-1	Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1
MAP	Mean arterial Blood Pressure (mittlerer arterieller Blutdruck)
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule

MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrom
MOF	Multiple Organ Failure (multiples Organversagen)
MSR	Macrophage Scavenger Receptor
NaCl	Natriumchlorid
oxLDL	oxidated low density Lipoprotein
p <sub>a</sub> CO <sub>2</sub>	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PMNL	Polymorphkernige Neutrophile Lymphozyten
PRRs	Pathogen Recognition Receptors
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
s	Sekunde
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOD	Superoxiddismutase
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
spp	Spezies
TBA	Thiobarbitursäure
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$



# 1 Einleitung

Gemäß Statistiken liegt die Prävalenz der schweren Sepsis bei 11% und stellt mit einer Mortalitätsrate von 48,4-55,2% die dritthäufigste Todesursache dar. Jährlich sterben in Deutschland 60000 Menschen aufgrund einer Sepsis und auf Intensivstationen steht die durch diese Erkrankung bedingte Mortalität an erster Stelle [1, 2].

Die in den letzten Jahren registrierte Zunahme der Erkrankungshäufigkeit hängt zum einen mit der steigenden Zahl multimorbider älterer Patienten und zum anderen mit der Zunahme invasiver diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen zusammen. Der Einsatz intensivmedizinischer Maßnahmen kann 70% der an einer Sepsis erkrankten Menschen das Leben retten, wobei die Mortalität im septischen Schock jedoch bis auf 70% ansteigt. Trotz intensiver Forschungen ist es in den letzten Jahren noch nicht gelungen, die Heilungsrate zu steigern [3, 4].

## 2 Theoretische Vorbetrachtungen

### 2.1 Definitionen

Obwohl schon in der Antike eine Verbindung zwischen Wundinfektion und septischem Geschehen festgestellt wurde, konnten die genauen Ursachen und Vorgänge der Sepsis erst mit Entdeckung der Mikroorganismen durch Forscher wie Koch und Pasteur erklärt werden.

Als häufigste Verursacher treten hierbei Bakterien in Erscheinung, wenngleich auch Viren und Pilze einen septischen Prozess verursachen können bzw. im Rahmen polymikrobieller Vorgänge mit beteiligt sind. Die häufigsten auslösenden Erreger stellen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, Koagulase-negative Streptococci, Enterococci, Klebsiellen und *Pseudomonas* spp. dar, wobei gramnegative und grampositive Keime gleich häufig Auslöser sind [5].

Unter einer Infektion versteht man eine Entzündungsreaktion des Körpers auf das Eindringen von Mikroorganismen in normalerweise steriles Gewebe. Durch Ausbreitung von Krankheitserregern, wie Bakterien, kann es zu einem systemischen Prozess kommen. Findet die Erregerverbreitung über das Blut statt, spricht man im Falle einer bakteriellen Invasion von einer Bakteriämie, welche durch das Anlegen einer Blutkultur nachgewiesen wird. Im weiteren Verlauf kann sich eine Sepsis entwickeln.

Eine der Definitionen der Sepsis wurde 2001 im Rahmen einer Consensus Conference der amerikanischen Society of Critical Care Medicine und des American College of Chest Physicians festgesetzt [6, 7]. Demzufolge handelt es sich um eine Sepsis, wenn eine systemische Inflammationsreaktion (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS) infektiöser Genese vorliegt. Ein SIRS liegt vor, wenn wenigstens zwei der im Folgenden genannten Punkte zutreffen:

- a) Körpertemperatur  $> 38^{\circ}\text{C}$  oder  $< 36^{\circ}\text{C}$ ,
- b) Herzfrequenz  $> 90/\text{min}$ ,
- c) Atemfrequenz  $> 20/\text{min}$  oder  $p_{\text{a}}\text{CO}_2 < 32 \text{ mmHg}$ ,
- d) Leukozyten  $> 12.000/\text{mm}^3$  oder  $< 4.000/\text{mm}^3$  oder  $> 10 \%$  unreife Neutrophile.

Aufgrund einer unzureichenden praktischen Umsetzbarkeit dieses Modells wurden zur Erhöhung der Praktikabilität Weiterentwicklungen und die Berücksichtigung neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse notwendig, welche im PIRO-Konzept Umsetzung fanden [8-11]. Hierbei soll eine Zuordnung der Patienten in verschiedene Risikoklassen aufgrund von Prädisposition („P“), Infektion („I“), inflammatorischer Reaktion („R“) und Organdysfunktion („O“) ermöglicht werden, wobei unter anderem Vorerkrankungen, kultureller Erregernachweis als Bestätigung einer Infektion, die SIRS-Kriterien sowie die Beurteilung der Organdysfunktion nach Bewertungsmaßstäben wie beispielsweise dem „Sequential Organ Failure Assessment“ (SOFA) in die Zuordnung mit einbezogen werden [6, 7].

Bei Fortschreiten der Erkrankung tritt des Öfteren eine schwere Sepsis auf, welche sich in Organdysfunktion und Hypoperfusion äußert. Die Hypoperfusion tritt in der Regel durch Laktaterhöhung, Azidose sowie Oligurie in Erscheinung. Des Weiteren kann eine Hypotonie mit einem systolischen Blutdruck von  $<90$  mmHg oder eine Blutdruckabsenkung um mehr als 40 mmHg vom Ausgangswert auftreten, wobei andere Ursachen für eine Hypotonie fehlen.

Sofern trotz angemessener Volumensubstitution Zeichen einer schweren Sepsis wie Organdysfunktion oder Hypotonie vorliegen, spricht man von septischem Schock. Letztendlich kann eine Sepsis in ein Multiorganversagen (MOF) münden.

Als Multiorganversagen wird das gleichzeitig oder rasch aufeinander folgende Versagen von zwei oder mehr vitalen Organfunktionen (z.B. akutes Lungen- und Nierenversagen) bezeichnet [12]. Hierbei kann eine Differenzierung vorgenommen werden zwischen primärem Multiorganversagen – etwa bedingt durch massives Trauma – und sekundärem MOF, welches im Anschluss an eine stabile Phase beispielsweise aufgrund einer Infektion auftreten kann [13, 14].

## ***2.2 Pathogenese der Sepsis***

Durch das Eindringen von Krankheitserregern beziehungsweise deren Toxinen in den Organismus kann ein septischer Prozess ausgelöst werden, sofern keine dem Schweregrad der Infektion angemessene Immunreaktion erfolgt. Ursache für die nicht ausreichende Antwort des Immunsystems können Immunschwäche, Infektion mit einer großen Anzahl aggressiver Erreger oder das Vorliegen eines Entzündungsprozesses in bestimmten Geweben wie Gehirn oder Lunge sowie das Fehlen einer Therapie sein. Um eine Sepsis zu simulieren wurde in der dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungsreihe Endotoxin Ratten appliziert. Das Endotoxin stellt das pathogene Agens gramnegativer Bakterien, wie *Escherichia coli*, dar. Demzufolge soll die Pathogenese der Sepsis hier auch am Modell einer endotoxininduzierten Reaktion beschrieben werden.

### **2.2.1 Endotoxin und Endotoxinrezeptoren**

Das von Richard Pfeiffer entdeckte Endotoxin stellt einen Baustein der Membran gramnegativer Bakterien dar, der sich aus Lipid A, dem Kernoligosaccharid und dem O-Antigen zusammensetzt. Handelt es sich um die synthetisch aufbereitete Form des Endotoxins, spricht man von Lipopolysaccharid (LPS). Ein Teil des Endotoxins befindet sich im Inneren der Membran (Lipid A) und spielt als hochkonservierter Bestandteil eine bedeutende Rolle bei der Bindung an Immunzellen, während der andere – das sogenannte O-Antigen - aus ihr herausragt und aufgrund seiner unterschiedlichen Struktur bei den verschiedenen Bakterienspezies zu deren Spezifizierung (Serotypisierung per finger printing) herangezogen wird.

Aufgrund der festen Integration in die Bakterienzellmembran wird Endotoxin nur im Falle der Zerstörung des Bakteriums oder bei sehr schnellem bakteriellen Wachstum frei [15, 16]. Die Bindung an Rezeptoren und Serumproteine erfolgt rasch, was zu einer Reduktion seiner Toxizität beiträgt. Hierbei spielen in erster Linie High Density Lipoprotein (HDL), Low Density Lipoprotein (LDL) und Bactericidal Permeability-increasing Protein (BPI) eine Rolle [17-19]. Letzteres ist vor allem in den azurophilen Granula der neutrophilen Granulozyten, wie auch auf ihrer Oberfläche anzutreffen. BPI führt zu einer Regulation der Entzündungsreaktion über die serotypenspezifische Bindung an die Lipid A-Komponente mit ihrer damit verbundenen Inaktivierung [20-22].

Dies ist in sofern von Bedeutung, als Lipid A hauptverantwortlich für die pathogene Wirkung des Endotoxins ist. Daher reicht die Applikation von Lipid A aus, um experimentell eine Sepsis zu induzieren [23-25].

Ein weiteres Protein, an welches sich LPS binden kann, stellt das Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP) dar [26]. Durch Anlagerung von Endotoxin erfolgt eine Verstärkung der Endotoxinwirkung um das bis zu 1000fach. Dies kann vor allem anhand der TNF- $\alpha$ -Induktion verifiziert werden [27]. Der somit gebildete LPB/LPS-Komplex stellt einen Mechanismus des Körpers dar, um LPS sowohl den LPS-Rezeptoren und dem HDL zu präsentieren als auch eine Neutralisationsreaktion mittels HDL zu ermöglichen [27].

Interessanterweise werden BPI und LBP im menschlichen Genom auf Chromosom 20 nicht weit von einander entfernt codiert [28] und ähneln sich im für die Bindung an LPS verantwortlichen Teil stark in der Aminosäuresequenz [26]. Im Falle einer Sepsis kommt es durch Aktivierung der entsprechenden Genabschnitte somit zu einer Erhöhung der Konzentration beider Substanzen im Serum.

In die Zellmembran verankerte LPS-Rezeptoren stellen die membranassoziierten CD14 Rezeptoren (mCD14) und der Toll-like-Rezeptor dar, wobei nur der Toll-like Rezeptor [29] mit Hilfe der Signaltransduktion und die daran gekoppelte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie nukleärem Faktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) [30, 31] zur Bildung von proinflammatorischen Mediatoren (u. a. TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6) beiträgt [32-34]. Durch die Bindung von LPS an Toll-like-Rezeptoren und die damit verbundene Anregung der Signaltransduktionskette erfolgt über die Genexpression eine Ausschüttung von proinflammatorischen Substanzen, wie Zytokinen, TNF- $\alpha$ , Chemokinen und Interferonen [33, 35]. Diesem Vorgang schließen sich Antigenpräsentation und antikörpervermittelte Immunantwort durch das adaptive Immunsystem an [36, 37].

Die Enzyme Phospholipase C und D veranlassen die Lösung des mCD14-Rezeptors aus der Zellmembran („shedding“), was die Bildung von löslichem CD14 zur Folge hat (sCD14), wobei dieser Vorgang bereits durch das Vorhandensein geringer Mengen von LPS und TNF- $\alpha$  verstärkt wird [38]. Dem so entstandenen sCD14 kommen zwei Funktionen zu. Zum einen führt es in Verbindung mit einem LPS/LPB-Komplex zu einer Aktivierung von Zellen, welche selbst nicht über CD14-Rezeptoren verfügen, wie beispielsweise Endothelzellen [39-41]. Zum anderen wird LPS durch die Bindung an sCD14 neutralisiert und somit per Immunmodulation die übermäßige

Aktivierung mCD14-exprimierender Zellen wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten unterbunden [25, 41, 42].

Darüber hinaus existieren noch andere LPS-Rezeptoren, wie CD11b/CD18-Glykoproteine (z. B.  $\beta$ 2-Integrin, Mac-1 Antigen) und „Scavenger-Rezeptoren“ [32, 43], wobei die Bildung von LPS-Rezeptor-Komplexen zwar zu einer LPS-Neutralisation, jedoch zu keiner Makrophagenaktivierung führen [40, 44].

Eine Zusammenfassung von Macrophage Scavenger Receptor (MSR), Toll-like-Rezeptoren (TLRs), CD14 und Komplement-Rezeptoren erfolgt unter dem Begriff Pathogen Recognition Receptors (PRRs) [45]. Allen gemeinsam ist letztendlich, dass sie der Erkennung von Pathogen Associated Molecular Patterns (PAMPs), bestimmten molekularen Mustern oder Molekülen von Mikroorganismen, wie Lipopolysacchariden, Lipoteichonsäure, Peptidoglykanen oder bakterieller DNA, dienen.

### **2.2.2 Mediatoren**

Als bedeutendste Mediatoren sind die Zytokine (TNF- $\alpha$ , Interleukine, Interferone - IFN, Colony-Stimulating Factors – CSF), Eicosanoide (Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane) und reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species - ROS) zu nennen [13, 46].

Darüber hinaus werden auch vasoaktiven Botenstoffen und Lipidmediatoren freigesetzt und die Gerinnungskaskade aktiviert. Auf der Oberfläche von Endothelzellen und Makrophagen wird die Präsentation von Adhäsionsmolekülen induziert.

Im Rahmen der kaskadenartigen Zytokinfreisetzung bei Sepsis erfolgt maßgeblich eine Ausschüttung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 [47]. In tierexperimentellen Untersuchungen zum Beispiel an der Ratte kann zuerst das in natürlichen Killerzellen, Makrophagen und Endothelzellen synthetisierte TNF- $\alpha$  im Plasma mit einem Konzentrationspeak ca. 90 Minuten nach LPS-Bolusinjektion nachgewiesen werden [48, 49].

### **2.2.2.1 Tumornekrosefaktor**

Der Tumornekrosefaktor sorgt als Mittlersubstanz für eine Aktivierung sekundärer Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene, PAF, Stickstoffmonoxid, ROS) [46, 50, 51] sowie für eine Erhöhung der prokoagulatorischen Endothelaktivität. Außerdem fördert er die Granulozytenadhärenz an und die Diapedese durch Endothelien. Die hierbei beteiligten Granulozyten werden als „Polymorphonuclear Neutrophils“ - PMN bezeichnet. Durch Bindung an bestimmte Adaptermoleküle ist sogar die Auslösung einer Apoptose möglich [16, 52].

### **2.2.2.2 Proinflammatorische Zytokine**

Als proinflammatorisches Zytokin, das vor allem nach Zelluntergang erhöhte Serumkonzentrationen aufweist, tritt IL-1 mit seinen zwei funktionell identischen Erscheinungsformen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf. Der in nahezu allen Zellen der myeloiden Reihe synthetisierte Botenstoff [53] regt die Lymphozytenproliferation und Produktion von IL-6 und IL-8 an, ist aber auch verantwortlich für die Entstehung von Fieber. Speziell IL-1 $\beta$  fördert die Mediatorsynthese (PAF; Prostaglandine etc.) [54, 55] und die Präsentation von Adhäsionsmolekülen auf der Zellmembran. Des Weiteren ist IL-1 mit verantwortlich für Änderungen der Mikrozirkulation wie Leukozytenaktivierung und temporäre oder feste Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel (Rolling, Sticking) [56].

Das Zytokin IL-6 kann bei Sepsis, aber auch in Verbindung mit Stressreaktionen, Operationen, Verbrennungen und Traumen nachgewiesen werden. Hierbei korreliert die Serumkonzentration positiv mit dem Ausmaß der Gewebeschädigung und somit auch mit der Prognose für den Patienten [57-59].

Einerseits vermittelt IL-6 zwar Fieber [60] und fördert auf gleiche Weise wie bereits TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  die Leukozytenadhärenz. Andererseits hemmt es aber die Bildung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und fördert die ACTH-Sekretion (Adrenocorticotropes Hormon). Dadurch führt es zu einem Anstieg des Glucocorticoidspiegels und sorgt somit für eine Zurückdrängung der Inflammationsreaktion [61, 62].

### **2.2.2.3 Antiinflammatorische Zytokine**

Eines der wichtigsten regulatorischen antiinflammatorischen Zytokine ist IL-10, welches die Bildung und Freisetzung der anderen Mediatorstoffe vermindert. Zusätzlich trägt es zur Normalisierung der Aktion der weißen Blutzellen durch Hemmung der T-Helfer-1-Zellen und Anregung des Makrophagenwachstums bei. Ebenso veranlasst IL-10 die Stabilisierung der hämodynamischen Verhältnisse durch Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase. Diese ist aufgrund der Bildung von NO für eine Gefäßdilatation mit Blutdruckabfall verantwortlich [55, 57, 63].

Während das Verhältnis aus TNF und IL-10 eine Beurteilung des Entzündungsstatus während der Sepsis zulässt, gibt die IL-6/IL-10-Ratio die Relation von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen wider und ermöglicht somit eine Beurteilung des allgemeinen inflammatorischen Status auch außerhalb des septischen Geschehens [57, 64, 65].

Darüber hinaus sei an dieser Stelle auch der antipyretisch wirkende Interleukin1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) genannt [66]. Dieser befindet sich unter anderem auf Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen und diversen anderen Zellen, wobei seine Entstehung durch das Vorliegen von IgG, Zytokinen und bakteriellem oder viralem Antigen gefördert wird. Eine Bindung des IL-1ra an IL-1-Rezeptoren hat keine zelluläre Antwort zur Folge. Somit dient er der Regulation von Entzündungsprozessen wie Arthritis und Colitis. Im Zuge der Sepsis konnte ein positiver Effekt von IL-1ra noch nicht nachgewiesen werden [67].



### 2.2.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Unter Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) - häufig auch als Sauerstoffradikale bezeichnet - ist eine beispielsweise im Rahmen oxidativen Stresses entstehende Form des Sauerstoffes zu verstehen, die durch das Vorhandensein eines oder mehrerer unpaarer Elektronen gekennzeichnet ist.

Die Gruppe der ROS kann unterteilt werden in:

- a) freie Radikale, wie beispielsweise das Superoxid-Radikal  $O_2^-$ , das Hydroxyl-Radikal HO und Peroxylradikale von Lipiden
- b) stabile molekulare Oxidantien (z. B. Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$ , Lipidhydroperoxid LOOH, Ozon  $O_3$  und die hypochlorige Säure  $OCl^-$ )
- c) angeregte Sauerstoffmoleküle wie Singulett-Sauerstoff  $^1O_2$  [68].

Im physiologischen Rahmen entstehen genannte Moleküle unter anderem bei der Zellatmung, der Reduktion von molekularem Sauerstoff, bei der Oxidation von Wasserstoffperoxid sowie der Bekämpfung von Mikroorganismen [69].

Der Körper verfügt über die Fähigkeit diese freien Radikale zu eliminieren. Dies wird als antioxidative Kapazität bezeichnet und spiegelt die Gesamtheit aller antioxidativ verfügbaren Substanzen im Blut – also Enzyme (unter anderem Superoxiddismutase - SOD, Katalase), antioxidativ wirkende Vitamine (z. B. Vitamin E, Vitamin C) und antioxidativ agierende Medikamente (wie EUK-8, Acetylcystein) - wider.

Als Quelle der Radikale im Falle einer Sepsis konnten die Leukozyten, in erster Linie neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, identifiziert werden.

Einerseits wird bei der Aktivierung dieser Zellen das Enzym NADPH-Oxidase zur Umwandlung von Sauerstoff zum Superoxidradikal angeregt, welches dann entweder in Phagozytenvakuolen der Elimination von Mikroorganismen dient, oder aber durch die Superoxiddismutase (SOD) zu  $H_2O_2$  reagiert [13, 70]. Diese beiden selbst nur wenig antibakteriell wirksamen Teilchen stellen die Reaktionspartner für die Bildung des hochreaktiven Hydroxylradikals, aber auch die Ausgangsstoffe für die Entstehung von Hypochlorid (in den azurophilen Granula) und Peroxynitriden (Endothel und Leukozyten) dar [68, 69].

Andererseits können durch weitere Systeme, wie das Xanthinoxidase-Xanthindehydrogenase-System (XO-XDH-Enzymsystem), ROS bei der Reperfusion und damit der Reoxygenierung ischämischer Gewebe entstehen. Die in der Zeit der Mangelperfusion angefallenen Stoffwechselprodukte Hypoxanthin und Xanthin führen hierbei zu einer Anregung des genannten Systems, bei dessen Katalysierung der Reaktion von Hypoxanthin mit molekularem Sauerstoff zu Harnsäure Superoxidradikale anfallen [71].

Bei der Produktion grösserer Mengen ROS, wie sie aufgrund der verminderten Darmperfusion im Falle der Sepsis entstehen, treten neben den anfänglich protektiven Wirkungen (Abtötung von Mikroorganismen, Anregung zur Gewebeerneuerung), negative Effekte, wie z. B. Hydrolyse von Kohlenhydraten, Veränderung von Lipiden und Proteinen mit assoziiertem Wirkungsverlust und Oxidation von Nucleinsäuren sowie Störung der (DNA)-Reparationsmechanismen auf.

Darüber hinaus zeigt sich eine Membrandestabilisierung infolge der kettenreaktionsartigen Lipidperoxidation der Zellmembranen, woraus eine Leckage der Kapillaren resultieren kann (capillary-leak-Syndrom) [71-73]. Hierbei wird als sekundäres Lipidperoxidationsprodukt Malondialdehyd, eine Substanz, die zu fehlerhafter DNA-Transkription und einer Störung der zellulären Proteinfunktion führt, frei [74]. Das vermehrte Erscheinen von Malondialdehyd (MDA) im Blut in Verbindung mit Multiorganversagen und Sepsis konnte bereits mehrfach gezeigt werden [75-78]. Durch die Abnahme der antioxidativen Kapazität erfolgt vor allem die Peroxidation der mehrfach ungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure (AA, C20:4) und Gamma-Linolensäure (GLA, C18:3) [79].

Das durch oxidative Modifikation von low density lipoprotein (LDL) entstehende oxLDL fördert seinerseits durch Aktivierung der membranständigen NADPH-Oxidase die Bildung von Sauerstoffradikalen und steigert hierdurch die endotheliale Dysfunktion und Leukozytenadhäsion [80-82]. Durch Bindung von oxLDL an Makrophagen entstehen Schaumzellen, welche in das Gefässendothel abwandern [80, 83]. Darüber hinaus erfolgt insbesondere durch den dem oxLDL eigenen zytotoxischen Effekt eine proinflammatorische Stimulation mit Zunahme der Menge der Mediatorsubstanzen wie Interleukine und Tumornekrosefaktor, was eine Leukozytenaktivierung zur Folge hat [84]. Andererseits vermindern oxLDL über Immunmodulation die Entzündungsreaktion z. B. im Bereich des Gehirns [85].

Zusätzlich führt die Bindung von oxidierten low-density-Lipoproteinen an den lectinähnlichen oxLDL-1-Rezeptor zu einer Anregung der Superoxidproduktion. Dies hat eine Verminderung der Stickstoffmonoxid-Menge im Blut (NO-Abfall) zur Folge. Das Vorhandensein von rezeptorgebundenen oxLDL wirkt sich durch Vasospasmen auf den Gefäßtonus aus. Dieser NO-Abfall und die Vasospasmen beeinflussen den Blutdruck und wirken einem Blutdruckabfall entgegen [86-88].

ROS führen darüber hinaus durch Oxidation von Proteinen zur Bildung so genannter advanced oxidation protein products (AOPP) [89]. Da die Quantität der reaktiven Sauerstoffspezies mit der Menge der AOPP korreliert, ist über eine Bestimmung letztgenannter ein Rückschluss auf das Ausmaß des oxidativen Stresses möglich [90]. Darüber hinaus sind AOPP selbst für eine Endothelschädigung mit verantwortlich. So können sie weiterführende Entzündungsreaktionen durch Förderung der TNF- $\alpha$ -Produktion in den Monozyten bzw. Anregung der ROS-Produktion in den Endothelzellen und somit Leukozytenadhärenz induzieren [91-93]. Der Abbau der AOPP findet überwiegend in Leber und Milz statt [94].

Da ROS aber letztlich starke Induktoren des nukleären Faktors  $\kappa$ B darstellen, der für die Fortsetzung der Mediatorausschüttung und Leukozytenaktivierung verantwortlich zeichnet, kommt es an dieser Stelle im Falle eines Nichtausreichens der körpereigenen antioxidativen Kapazität zum Eintritt in einen circulus vitiosus [95] bestehend aus Leukozyten- und Endothelzellaktivierung - Ausschüttung von Entzündungsmediatoren bzw. ROS – Inaktivierung von Protein-Thyrosin-Phosphatasen - Zellschädigung - Aktivierung von Reparaturmechanismen und im Falle des Versagens dieser zum Zelltod [84]. Dadurch wird diese Kaskade aufrechterhalten.

Im Bereich der Forschung spielt zunehmend die Bestimmung der Advanced oxidation protein products (AOPP), der oxidierten Low-Density-Lipoproteine (oxLDL) sowie die Peroxidbestimmung und die Ermittlung der antioxidativen Kapazität zur Verifizierung des Vorhandenseins bzw. des Schweregrades einer Sepsis eine Rolle.

## 2.2.4 Funktionelle Kapillardichte

Ein wichtiger Anhaltspunkt für die Perfusion im Kapillargebiet und somit die mikrozirkulatorische Situation ist die funktionelle Kapillardichte (FCD). Die funktionelle Kapillardichte gilt als das intravitalmikroskopisch ermittelte Maß für die Länge von erythrozytenperfundierten Kapillaren pro mikroskopisch erfasstes Gesichtsfeld und wird in  $\text{mm}^{-1}$  angegeben. Ihre Abnahme steht in direkter Korrelation zu einem verringerten Blutfluss im untersuchten Gebiet und kann bis hin zu einem kompletten Ausfall der kapillären Durchblutung – dem so genannten No-reflow-Phänomen – reichen [118-120]. Einige Studien belegen zudem eine Durchblutungsumverteilung zugunsten der Mukosa bei dementsprechender Hypoperfusion der Muskularis, wobei die Gesamtperfusion des Darmes unverändert bleibt [133, 177, 198].

Zur Verminderung der Darmperfusion während der Sepsis existieren Studien mit stark differierenden Ergebnissen. Je nach Untersuchungsverfahren konnte eine Verminderung der funktionellen Kapillardichte entweder nachgewiesen oder aber nicht festgestellt werden, wobei durch intravitalmikroskopische Untersuchungen eine Reduktion des villösen Blutflusses um bis zu 40% gezeigt werden konnte [118, 119, 121]. Die Abnahme der funktionellen Kapillardichte kann beim septischen Patienten durch intestinale Hypotension in Verbindung mit einer Verlangsamung des Blutflusses in diesem Kapillarstromgebiet sowie Mikrothrombosierung und dem damit einhergehenden Verschluss villöser Gefäße erklärt werden [122].

Diese Minderdurchblutung des Darmes geht mit einer gesteigerten intestinalen Permeabilität einher [132, 168]. Fink et al. konnten demonstrieren, dass eine der sepsisbedingten Minderdurchblutung entsprechende mechanisch induzierte mesenteriale Mangelperfusion keine veränderte Darmpermeabilität nach sich zieht [199]. Verantwortlich für die Endotoxinverursachte Schädigung der Darmbarriere scheint hierbei ein Zusammentreffen verschiedener pathogener Faktoren zu sein [177, 198].

### **2.2.5 Leukozyten und Leukozyten-Endothel-Interaktion**

Die Leukozyten-Endothel-Interaktion ist im Wesentlichen durch folgende, per LPS, Zytokine und Radikale forcierte, Vorgänge gekennzeichnet [96, 97]:

- a) Leukozytenmargination aus der Strommitte
- b) temporäre Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel (Rolling)
- c) feste Adhärenz der Leukozyten am Endothel (Sticking)
- d) Diapedese der Leukozyten durch das Endothel

Wie bereits eingangs angesprochen, besagt eine der modernsten Definitionen der Sepsis, dass diese durch eine systemische Inflammationsreaktion (SIRS) infektiöser Genese gekennzeichnet ist und in Verbindung mit mindestens zwei weiteren Kriterien auftritt, welche sich auf Körpertemperatur, Herz- und Atemfrequenz und die Leukozytenzahl in Verbindung mit dem Anteil neutrophiler Granulozyten beziehen. Im Hinblick auf die weißen Blutzellen bedeutet dies, dass sowohl eine Leukozytose als auch eine Leukopenie auf ein septisches Geschehen hinweisen können [6]. Die Gründe für diesen Umstand sind folgende.

Der Leukozytenpool unterliegt einer stetigen Veränderung. Sofern am Gefäßendothel eine deutliche Präsentation von Adhäsionsmolekülen stattfindet, kann infolge der Leukozytenadhäsion im peripheren Blut eine Leukopenie in Erscheinung treten, die durch eine beeinträchtigte Stammzellreifung noch verstärkt werden kann [98].

Die Leukozytenmobilisierung durch mediatorbedingte Freisetzung unreifer Granulozyten aus dem Knochenmark (vor allem durch Interleukine) oder die Aktivierung wandständiger Leukozyten insbesondere in Verbindung mit der Steigerung des Herzzeitvolumens kann hierbei eine Leukozytose zur Folge haben. Des Weiteren verzögert das Vorhandensein zum Beispiel von LPS die Apoptose der weißen Blutzellen.

Der durch proinflammatorische Mediatoren vermittelte Vorgang der Leukozyten-Endothel-Interaktion dient beispielsweise im Falle lokaler Infektionen der Bekämpfung invasiver Mikroorganismen.

Sowohl die Leukozyten selbst – allen voran die Polymorphkernigen Neutrophilen Lymphozyten (PMNL) – als auch das Endothel präsentieren auf der Oberfläche Adhäsionsmoleküle [98].

Die Adhäsion wird mit Hilfe von IL-8, Komplementfaktor 5a, PAF und anderen Substanzen, die in den aktivierten Lymphozyten und Endothelzellen produziert werden, chemotaktisch vermittelt [99, 100]. Einzig die Mastzellen sind nicht am Prozess des Leukozytenrollings beteiligt [101].

Im septischen Geschehen gesellt sich hierzu noch die Gefäßthrombosierung infolge des verminderten Blutflusses, der auftretenden Gerinnungsstörungen im Sinne einer disseminierten intravasalen Koagulopathie (DIC) und der verstärkten Leukozytenadhärenz. Zum einen führt dies zur Verlegung der terminalen Strombahn [98], andererseits schädigen die Leukozyten durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Proteasen das Gefäßendothel, stören die Mikrozirkulation und können demzufolge für ein Organversagen mit verantwortlich sein [102].

Die Adhäsion der Leukozyten am Gefäßendothel beim Rolling, welches durch das Rollen der weißen Blutzellen mit einer Geschwindigkeit von 50  $\mu\text{m/s}$  in einer postkapillären Venole (Durchmesser ca. 30  $\mu\text{m}$ ) gekennzeichnet ist, erfolgt über drei „Haftvermittler“: die L-, E- und P-Selektine. Diese Selektine verfügen jeweils über einen ähnlich strukturierten  $\text{NH}_2$ -terminalen extrazellulären Anteil [103].

Das auf Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten befindliche L-Selektin mit seiner Liganden- und Rezeptorfunktion wird aufgrund seiner Lokalisation auch Leukozyten-Selektin (weitere Bezeichnungen: CD62L, gp90 mel, LAM-1, LECAM-1, Leu8/TQ-1 Antigen, Mel-14 Antigen) genannt und ist - auch unabhängig von Entzündungsreaktionen - stets auf der Oberfläche der genannten Zellen zu finden, weshalb das „homing“ der Leukozyten an „high endothelial venules“ als physiologischer Prozess in lymphatischen Organen betrachtet wird [96, 99, 104].

Die Bindung von L-Selektin an Endothelien wird durch NO vermindert, welches durch die zytokin-induzierte NO-Synthetase bereitgestellt wird, so dass im Falle einer Sepsis das Ausmaß der Leukozytenadhärenz, des Rollings und die Leukozytenmigration vermindert wird [105].

Wie auch das L-Selektin erhielt das Plättchen-Selektin (Syn: CD62P, GMP-140, P-Selektin, PADGEM) seine Bezeichnung nach den im Rahmen einer LPS-,  $\text{TNF-}\alpha$ -, oder Wasserstoffperoxydfreisetzung aktivierten Thrombozyten [106], auf denen es zunächst nachgewiesen werden konnte, bevor sich herausstellte, dass es auch in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen und in den Granula von Thrombozyten vorkommt [107]. Wie Ley und Tedder 1995 nachweisen konnten, spielt P-Selektin vor allem zu Beginn des

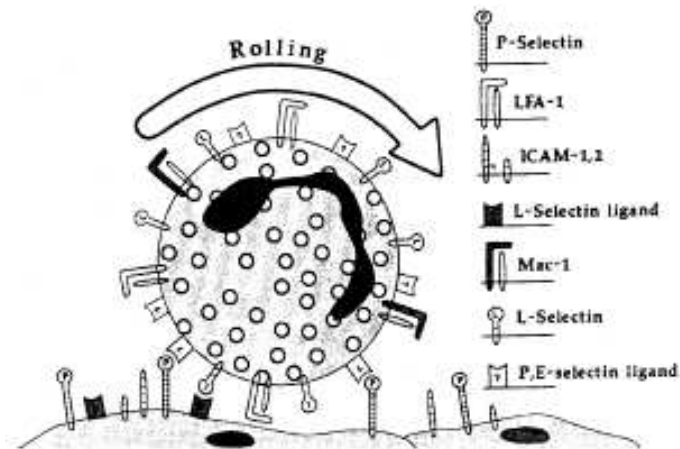
Rollings eine entscheidende Rolle [96] und induziert die Adhäsion von Th1- und Th2-Lymphozyten an das Gefäßendothel [108, 109].

Im Rahmen einer Aktivierung durch LPS und Zytokine präsentieren aber nicht nur die Thrombozyten sondern auch Endothelzellen Selektine (E-Selektin, auch Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule 1 - ELAM-1, CD62E genannt). Nach Bindung bestimmter Zellen der weißen Zelllinie, wie Granulozyten, Monozyten und einigen T-Zellarten an das E-Selektin, kommt es zur Leukozytenmigration. Doch auch über die post activationem 24 Stunden lang anhaltende E-Selektin-Präsentation hinaus hält der einmal eingeleitete Migrationsprozess an [110, 111]. Der genaue Mechanismus hierfür konnte noch nicht geklärt werden.

Alle zirkulierenden myelogenen Zellen exprimieren auf der Zelloberfläche Tetrasaccharid sialyl-Lewis x (sialyl-CD15)-haltige Glykoproteine bzw. Glykolipide [99], die durch die drei Selektine, in erster Linie jedoch durch Endothelzell-Selektin (E-Selektin und P-Selektin) sowohl erkannt als auch gebunden werden [112], wohingegen P- und L-Selektine denselben Prozess mittels Glykolipid Sulfatid einleiten [96].

Durch Bindung an genannte „Haftvermittler“ wird der Prozess des Rollings eingeleitet, wobei die rollende Bewegung der weißen Blutzelle zum einen durch eine Drehbewegung der Zelle um die eigene Achse aufgrund der vorhandenen Scherkräfte und repetitive Bindungen an Liganden des Endothels zu Stande kommt. Die ruckartige Bewegung beim Rolling entsteht bei proinflammatorischer Aktivierung der Endothelzellen (und/oder Granulozyten) durch gezieltes Abbremsen, so dass eine Bewegung teils von Endothelzelle zu Endothelzelle stattfindet [113, 114].

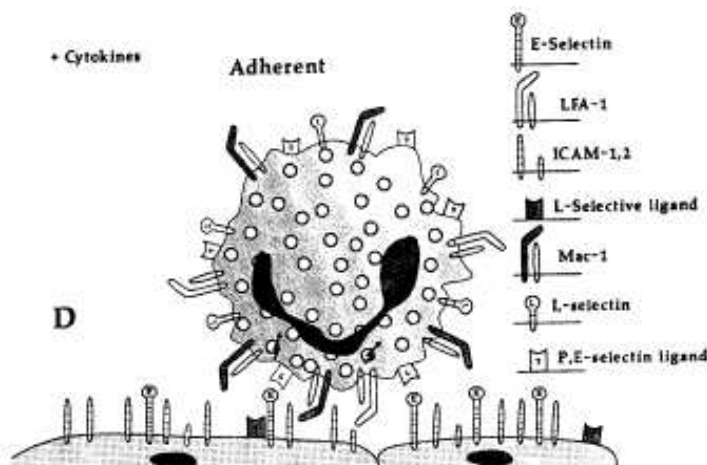
Abbildung: Schema zum Leukozyten-Rolling [115]



Legende: P-Selectin = Plättchen-Selectin, LFA-1 = Lymphocyte Function Associated Antigen 1, ICAM-1,2 = Intercellular Adhesion Molecule-1,2, L-Selectin ligand = Leukozyten-Selektin Ligand, Mac-1 = Integrin  $\alpha M/\beta 2$ , L-Selectin = Leukozyten-Selektin, P,E-Selectin ligand = Plättchen-, Endothelzell-Selektin Ligand

Aus dieser temporären Bindung an das Gefäßendothel resultiert im Falle einer entzündlichen Veränderung desselben durch Überwindung der Scherkräfte mittels Bindung an  $\alpha/\beta$  Heterodimere – die Integrine - das sogenannte Sticking. Dabei kennzeichnet einen Sticker ein mindestens 30 sekundiges stationäres Verweilen am Endothel einer postkapillären Venole [103].

Abbildung: Schema zum Leukozyten-Sticking [115]



Legende: P-Selectin = Plättchen-Selectin, LFA-1 = Lymphocyte Function Associated Antigen 1, ICAM-1,2 = Intercellular Adhesion Molecule-1,2, L-Selectin ligand = Leukozyten-Selektin Ligand, Mac-1 = Integrin  $\alpha M/\beta 2$ , L-Selectin = Leukozyten-Selektin, P,E-Selectin ligand = Plättchen-, Endothelzell-Selektin Ligand



Im Laufe des Rollings im Entzündungsgebiet kommt es unter Beteiligung von Entzündungsmediatoren zum einen zur Expression von  $\beta$ -Integrinen, zum anderen hingegen zur Proteolyse von L-Selektinen auf den aktivierten PMNL [102].

Die Integrine bestehen aus zwei Transmembranproteinen, welche dennoch überwiegend auf der Zelloberfläche präsentiert werden - der  $\alpha$ -Untereinheit (120-180 kD) und der  $\beta$ -Untereinheit (90-110kD). Typisch für Vertreter der  $\beta$ -Integrine ist der Aufbau aus einer variablen  $\alpha$ -Kette (CD11a-c) und einer gemeinsamen  $\beta$ -Kette (CD18). Beispiele für  $\beta$ -Integrine sind  $\beta$ 1-(CD29),  $\beta$ 2-(CD18) und die  $\beta$ 3-(CD61) [116].

Den auf weißen Blutzellen vorkommenden  $\beta$ 2-Integrinen, wie beispielsweise „Lymphocyte Function Associated Antigen“- LFA-1 (Syn: CD11a/CD18), Granulozyten- und Monozytenintegrine Mac-1 Rezeptor (Syn: CD11b/CD18) und p150.95- Antigen (Syn: CD11c/CD18), kommt im Bereich des „Stickings“ eine bedeutende Rolle zu, da ein Mangel an dieser Substanz im Rahmen eines Gendefektes (Leukocyte Adhesion Deficiency Syndrom) durch fehlende Eiterbildung und rezidivierende Infekte in Erscheinung tritt [43][112].

Obwohl eine ständige Expression der  $\beta$ 2-Integrine erfolgt, führt erst eine inflammatorische und insbesondere eine chemokinetische Aktivierung zur Ausprägung ihrer adhäsiven Leistung [103].

Die Synthese der hierbei beteiligten Chemokine erfolgt im vaskulären Endothel, wobei diese Substanzen ihre volle Wirkung erst aufgrund der verlängerten Kontaktzeit während des Rollings entfalten können. Folge des Chemokinkontaktes ist eine innermolekulare Konformationsänderung der  $\beta$ 2-Integrine, wobei es über eine Erhöhung der Bindungsaffinität der  $\beta$ 2-Integrine zur Endotheladhäsion in Form des Stickings kommt [99].

Im Bereich des vaskulären Endothels setzt zeitgleich eine vermehrte Produktion von Integrin-Liganden ein. Diese Integrin-Liganden werden als Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1, CD54) und ICAM-2 bezeichnet und den Immunglobulinen zugeordnet [102]. Während ICAM-1 auf den meisten Zellen nur bei Vorhandensein von Entzündungsmediatoren in Erscheinung tritt und vornehmlich an leukozytäre  $\beta$ 2-Integrine LFA-1 und an das Mac-1 Antigen bindet, kann ICAM-2 auch unabhängig von Entzündungsreaktionen auf Endothelzellen nachgewiesen werden. ICAM-2 bindet nur LFA-1 und erlangt vor allem bei der Wiederaufnahme der Lymphozyten in das Gefäßsystem – der Lymphozyten-Rezirkulation - an Bedeutung [103].

Über ICAM-2 hinaus beteiligt sich auch Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1 (MAdCAM-1) an diesem Rezirkulationsprozess, wobei es einerseits als Integrin und andererseits als L-Selektin-Ligand auftritt [99]. Infolge der Leukozytenadhärenz kann die Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1-(PECAM-1, CD31) vermittelte transendotheliale Diapedese stattfinden, wobei an der Bildung von CD31 sowohl die Leukozyten selbst als auch die Endothelzellen beteiligt sind [102, 117].

### ***2.3 Bedeutung des Intestinums für die Pathogenese der Sepsis***

Wie bereits eingangs erläutert, verschlechtert sich bei jedem 4. bis 10. SIRS-Erkrankten der Zustand im Sinne eines Multiorganversagens, welches zum Beispiel im Gefolge eines schweren Traumas eine Letalität von etwa 50-70% zeigt. Initial kommt es beim MOV wegen der stattfindenden Kreislaufzentralisation zu Gunsten der Vitalorgane Gehirn und Herz gleichzeitig zur Minderperfusion des Intestinums bei synchron gesteigertem Sauerstoffbedarf, wobei dieser Sympathikus-gesteuerte Vorgang durch die Vermittlung von am Darm lokalisierten  $\alpha$ -1-Rezeptoren reguliert wird [123, 124].

Die hierdurch auftretende Ischämie hat eine Funktionsstörung der Darmbarriere zur Folge und ermöglicht somit den Übertritt von Mikroorganismen, weshalb der Darm auch als „Motor des Multiorganversagens“ bzw. „undrained abscess of multiple organ failure“ bezeichnet wird [124-126].

Entscheidend für den Pathomechanismus im Falle einer Minderdurchblutung der Darmzotten ist in erster Linie das Gegenstromprinzip der Darmschleimhaut, wobei eine Aufzweigung der zentralen Villusarterie erst an der Zottenspitze erfolgt. Dies führt zu einem Abfall des Sauerstoffpartialdruckes im arteriolen Blut und infolge dessen zu einer Zottenspitzenischämie mit reaktivem Ödem der Lamina propria und letztlich der Epithelnekrose [127, 128].

Die Gewebeschädigung wird darüber hinaus sogar bei Reperfusion durch das hierbei durch die Xanthinoxidase aus Xanthin entstehende Hypoxanthin, Sauerstoffradikale, Granulozytenaktivierung und die gesteigerte Proteasentätigkeit weitergeführt [128, 129].

Diese Prozesse haben lokale mukosale Läsionen (leaky-gut) mit einer gesteigerten Darmpermeabilität und Herabsetzung der Barriereleistung gegenüber Mikroorganismen zur Folge [124, 130-132]. Dies ermöglicht einen Übertritt von Mikroorganismen und eine Aktivierung des GALT („Gut Associated Lymphatic Tissue“). Im GALT finden sich mehr als die Hälfte aller lymphoiden Zellen, die bei massiver Aktivierung im Sepsisgeschehen, beispielsweise durch LPS, eine Verschlimmerung desselben per positiver Rückkopplung humoraler und zellulärer Systeme sowie eine Schädigung der Kontrollmechanismen im Sinne einer Mediatorexplosion herbeiführen [124, 132].

Diverse Verfahren, wie beispielsweise Endoskopie, Angiographie, Dopplersonographie, Bestimmung von biochemischen Serummarkern oder tonometrische Messung des intramukösen instestinalen pH-Wertes ( $\text{pH}_i$ ), bieten Möglichkeiten der Einschätzung der intestinalen Ischämie. Hierbei wird eine Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich als eines der ersten Zeichen für eine Minderperfusion des Darmes gewertet [124].

Die Ermittlung des pH-Wertes erfolgt durch Berechnung mit der Henderson-Hasselbach-Gleichung aus dem Kohlendioxidpartialdruck unter der Annahme, dass die Hydrogencarbonat-Konzentration im arteriellen Blut dem des Gewebes vergleichbar ist. Durch Einbringung eines der Mukosa direkt anliegenden Tonometers nahe der Spitze einer Ernährungssonde können kontinuierliche Messungen durchgeführt werden [121, 133].

Mit einer Spezifität von 100% für die Mortalität und einer Sensitivität von 44% wurde zunächst eine Kombination aus der Messung von arteriellem Laktat und  $\text{pH}_i$  als prädiktivem Wert für das Auftreten eines SIRS empfohlen [134]. Da aber hier wegen der mangelnden Differenzierung zwischen respiratorischen und nicht-respiratorischen Störungen eine Verfälschung der Ergebnisse vorliegen kann, wird mittlerweile eine Bestimmung der mukosal-arteriellen  $\text{CO}_2$ -Differenz -  $\text{pCO}_2$ -Gap angestrebt [135]. Weitere Diagnostika zur Messung der Perfusion stellen Lebervenenkatheterisierung und Plasma-Disappearance-Rate des Farbstoffes Indozyaningrün  $\text{PDR}_{\text{ICG}}$  (Bestimmung der Leberperfusion/ -funktion) dar [136].

## ***2.4 Therapiekonzepte bei Sepsis***

Die Sepsistherapie hat stets zwei Ziele: die Stabilisierung des Gesamtorganismus und die Protektion des Intestinums. Als an die Besonderheiten an das deutsche Gesundheitssystem angepasste Richtlinien haben die Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und die Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensivmedizin und Notfallmedizin (DIVI) mit Orientierung an der Barcelona Declaration und den Surviving Sepsis Campaign Guidelines (SSC) for Management of Severe Sepsis an Septic Shock einen Behandlungsleitfaden erarbeitet, der dem behandelnden Arzt zur Verfügung steht [137]. Dieser stellt Diagnose, Prävention, kausale, supportive und adjunktive Therapie in den Vordergrund. Durch Einführung einer Gradeinteilung mit „Evidenz“graden von I-V und Empfehlungsgraden von A-E kann eine Gewichtung stattfinden [1, 137, 138]. Entscheidend ist vor allem die täglich wiederholte Evaluierung des Patienten, um eine bestmöglich an die medizinischen Bedürfnisse angepasste Behandlung durchführen zu können.

In Ermangelung einer speziell gegen die Sepsis wirkenden Substanz, stützt sich die Therapie zunächst auf eine Eruiierung und Behandlung der Ursache inklusive Fokussanierung mit operativer Versorgung des Entzündungsherdes und Antibiotikatherapie (kausal), eine unterstützende Therapie mittels frühzeitiger Kreislaufstabilisierung, Herstellung respektive Erhaltung der Homöostase beispielsweise durch die intensivierete Insulintherapie und gegebenenfalls Beatmung/ parenteraler Ernährung (supportiv) und die adjunktive Therapie mittels aktiviertem Protein C und niedrig dosiertem Hydrocortison [139, 140].

Eine Medikation mit rekombinantem humanen aktivierten Protein C beispielsweise, welches als Modulator der Blutgerinnung einer Mikrothrombosierung entgegen wirkt und zudem über Fibrinolyse eine Rekanalisierung bereits thrombosierter Gefäße bewirkt sowie über die IL-1- und TNF- $\alpha$ -Blockade Einfluss auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion nimmt [141], wird gemäss den Leitlinien als Empfehlungsgrad B und Evidenzgrad Ib eingestuft. Dies kommt durch eine gute Wirksamkeit im Falle von erwachsenen Patienten mit schwerer Sepsis zu Stande. Im Gegensatz dazu steht das Auftreten einer erhöhten 1-Jahres-Letalität bei Patienten mit einem niedrigen Schweregrad einer schweren Sepsis [142].

Über rekombinantes humanes aktiviertes Protein C (rhAPC) hinaus findet von den in diversen – leider nur partiell Erfolg versprechenden - klinischen Studien erforschten und in der klinischen Prüfung befindlichen Substanzen, wie Immunmodulatoren, Prostaglandinhemmer und Gerinnungsinhibitoren noch kein Wirkstoff in der Praxis Verwendung [46, 143].

Da körpereigene Schutzmechanismen im septischen Geschehen keine ausreichende Zytoprotektion mehr gewährleisten können, sollen antioxidativ wirkende Substanzen, Inhibitoren der Radikalbildung und/oder Radikalfänger in Zeiten vermehrter Radikalbildung beispielsweise infolge LPS-Exposition unterstützend eingesetzt werden [71].

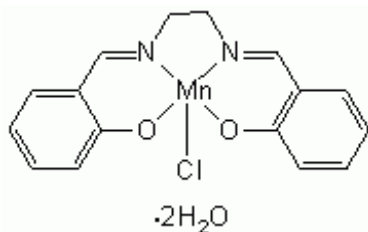
Die hier vorliegende Arbeit stellt einen weiteren Beitrag zur Erprobung möglicherweise adjunktiv einsetzbarer Substanzen im Rahmen eines septischen Geschehens dar, wobei das untersuchte EUK-8 mehrere der oben angeführten Wirkungswege nutzen kann.

## 2.5 EUK-8

### 2.5.1 Allgemeines

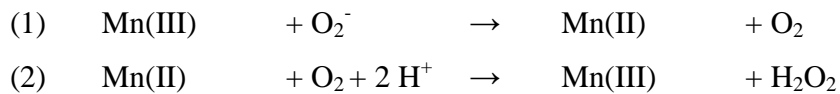
N,N«-bis(salicylidene)ethylenediamine chloride (Synonym: EUK-8), ein synthetisch hergestellter Selen-Mangan-Komplex, reaktiviert die Superoxiddismutase und zeigt durch Katalase-Mimikry zusätzlich eigene Aktivität im Bereich der Elimination von ROS [144, 145]. Unter Katalase-Mimikry versteht man, dass EUK-8 die biochemischen Reaktionen, welche von der Katalase katalysiert werden, ebenfalls beschleunigen kann. In diversen experimentellen Studien beispielsweise über oxidativen Stress, Entzündungsprozesse, kardiovaskuläre Erkrankungen, Reperfusion nach Ischämie (bisher am Herzmuskel untersucht) [146], neurologischen Erkrankungen, am Alzheimer- [147] und Multiple Sklerose-Modell [136] sowie am Modell der Sideroblasten-Anämie [148] konnte EUK-8 ein positiver Effekt dank seiner antioxidativen Wirkung nachgewiesen werden.

Abbildung: Molekülstruktur des EUK-8 [149]

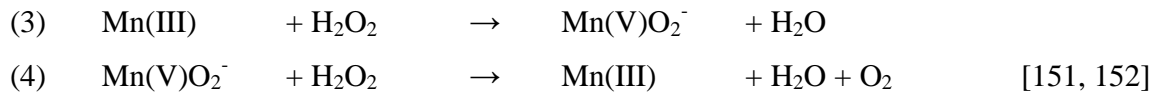


### 2.5.2 Pharmakodynamik

SOD/Katalase-Mimetika wie EUK-8 sind in der Lage, Zellen vor oxidativem Stress zu bewahren [150]. Diesem Effekt liegt folgende biochemische Reaktion zu Grunde, bei der ein Sauerstoffradikal zu Wasserstoffperoxid umgewandelt wird. Vereinfachend wurde in der Reaktionsformel nur die am Umwandlungsprozess beteiligte Mangankomponente dargestellt. Exemplarisch wurde die Umwandlung eines Sauerstoffradikals dargestellt.



Dieser Reaktionsmechanismus ähnelt stark dem der SOD. Im Organismus katalysiert nun die Katalase folgende Reaktion:



Über die Verminderung von oxidativem Stress hinaus hat EUK-8 auch die Potenz, nitrifizierenden Stress und die Menge der hypochlorigen Säure ( $\text{OCL}^-$ ) zu mindern [153].

### 2.5.3 Experimentelle Untersuchungen

Ein positiver Einfluss von SOD-Mimetika in der Endotoxinämie konnte schon für EUK-134 nachgewiesen werden [157]. In weiteren tierexperimentellen Studien wurde der Einfluss von EUK-8 untersucht. So wurde es durch die Arbeitsgruppe um Gonzalez bei Schweinen nach Induktion eines akuten Lungenversagens eingesetzt. Zu den wichtigsten Ergebnissen dieser Studie zählt, dass zwar eine Detoxifizierung der ROS stattfand, die Ausschüttung proinflammatorischer Substanzen allerdings nicht beeinträchtigt wurde [158]. Pucheu et al. untersuchten den positiven Effekt von EUK-8 bei einer Ischämie mit darauf folgender Reperfusion. Auch hier konnte der Einsatz des Medikamentes die durch reaktive Sauerstoffspezies bedingten Reperfusionsschäden vermindern [159].

Es wurden auch Versuche an Mäusen mit einer experimentell erzeugten allergischen Encephalomyelitis – dem gängigen Multiple-Sklerose-Modell – durchgeführt, wobei sich alle Tiere nach mehrmaliger EUK-8-Injektion binnen 40 Tagen erholten [160].

McDonald et al. induzierten eine Sepsis mittels intravenöser Gabe von 6 mg/kg Escherichia coli Lipopolysaccharid. In der Therapiegruppe verabreichten sie 0,3 oder 1mg/kg EUK-8 im Bolus gefolgt von einer Infusion mit 0,3 oder 1mg EUK-8/kg/h. In dieser Untersuchung konnte ein deutlicher positiver dosisabhängiger Effekt auf das septische Krankheitsgeschehen beobachtet werden. So wurde in der Gruppe mit 1mg/kg Bolus EUK-8 und 1m/kg/h EUK-8-Infusion das septische Krankheitsbild deutlich gemildert [161]. In weiteren Versuchen wurde nachgewiesen, dass EUK-8 die sepsisbedingte Schäden, wie beispielsweise die Vasokonstriktion, vermindert [162, 163].



#### **2.5.4 Klinische Anwendungen**

Bisher liegen noch keine klinischen Untersuchungen mit der Substanz EUK-8 vor, da diese derzeit nur experimentell eingesetzt wird. Entsprechend den bisher durchgeführten tierexperimentellen Studien kann ein positiver Effekt bei Sepsis-, Alzheimer-, Parkinson- und Multiple-Sklerose-Patienten vermutet werden. Prinzipiell erscheint auch die Nutzung im Rahmen des normalen physiologischen Altersprozesses möglich, da eine Zunahme des oxidativen und nitrifizierenden Stresses im Alter nachgewiesen werden konnte [154].

### 3 Fragestellung

Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen, auch reaktive Sauerstoffspezies genannt, stellt als natürliches Mittel der körpereigenen Abwehr einen wirkungsvollen Mechanismus dar, der die Schädigung von Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten bezweckt.

Im Rahmen einer Endotoxinämie tritt durch die starke Anregung dieses Systems allerdings eine Gewebeschädigung auf, die durch eine kettenreaktionsartige Mediatoraktivierung vorangetrieben wird. In der Reaktionskaskade spielen sowohl die reaktiven Sauerstoffspezies eine besondere Rolle, die bei Leukozytenaktivierung durch selbige freigesetzt werden, als auch diejenigen, die aus dem Xanthinoxidase-Xanthindehydrogenase-System stammen. Beide Aktionspartner regen sich gegenseitig immer wieder zur ROS-Ausschüttung an. Da die Radikale auch an körpereigenen Zellen Schaden bewirken, indem sie unter anderem zu einer Anregung des nukleären Faktors und somit einer TNF- $\alpha$ -Freisetzung aber auch zu einer Oxidation biologischer Membranen führen, werden weitere weiße Blutzellen auf die Gewebeschädigung hingewiesen, so dass die Aktivierungskaskade mit der Anregung der Leukozyten von neuem beginnt, was den Eintritt in einen *circulus vitiosus* bedeutet. Selbstverständlich stehen im Organismus körpereigene Antioxidantien zur Verfügung, um diesen Kreislauf effektiv zu unterbrechen. Im Falle einer Sepsis allerdings sind die körpereigenen Ressourcen erschöpft bzw. nicht ausreichend, um den pathologischen Prozess zu unterbinden. Eine deletäre Gewebeschädigung ist die Folge. Therapeutische Ansatzpunkte wären zum einen die Verhinderung der Entstehung von Radikalen durch Hemmung der bildenden Enzyme oder aber das Abfangen der bereits entstandenen ROS.

Der Selen-Mangan-Komplex EUK-8 führt zu einer Umwandlung von reaktiven Sauerstoffspezies und unterstützt damit die Wirkung der Superoxid-Dismutase (SOD). EUK-8 verfügt sowohl über die Fähigkeit zur Verminderung von oxidativem als auch nitrifizierendem Stress [151] und weist demzufolge eine höhere Wirkpotenz als SOD auf. Die Wirkung der Substanz wurde anhand einer Überprüfung der intestinalen Mikrozirkulation durch Messung der funktionellen Kapillardichte mittels Intravital-Fluoreszenzmikroskopie nachvollzogen. Ausserdem wurde der Grad der Leukozytenaktivierung durch Ermittlung der Anzahl am Gefässendothel binnen eines definierten Zeitraums haftender bzw. langsam entlang rollender Leukozyten bestimmt. Zusätzlich erfolgte die Messung von Indikatorsubstanzen, wie dem Malondialdehyd oder der oxidierten low-density-Lipoproteine (oxLDL).

## **4 Methodik**

### ***4.1 Versuchstiere***

#### **4.1.1 Tiermaterial**

Unter Einhaltung der Richtlinien für die Durchführung von Tierversuchen nach §2 sowie §8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes [155] wurde die Studie nach Genehmigung durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin an 40 männlichen Wistar-Ratten (Gewicht:  $210 \pm 50\text{g}$ ) im Alter von 6 - 7 Wochen durchgeführt (Genehmigungsnummer G 0137/03).

Die Ratten wurden von der Dimed Schönwalde GmbH bezogen. Ihre Unterbringung erfolgte in einem eigens dafür eingerichteten Raum mit Klimaanlage und Lichtschaltuhr, so dass ein zwölfstündiger Hell-Dunkel-Rhythmus sowie eine Temperatur von  $25^{\circ}\text{C}$  und eine Luftfeuchtigkeit von 55-60% sichergestellt werden konnten. Den Tieren standen Wasser und Standardfutter (Altromin) zur unbegrenzten Verfügung. Vierundzwanzig Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren allerdings die Nahrung entzogen, wobei Wasser weiterhin ad libitum angeboten wurde. Die Versuche fanden im Zeitraum von November 2004 bis Mai 2006 statt.

## 4.1.2 Gruppeneinteilung

Es wurden 4 Tiergruppen à 10 Tiere gebildet. Bei allen Tieren erfolgten eine Instrumentalisation, Laparotomie, die Blutentnahmen sowie die Untersuchung mittels Intravitalmikroskopie.

Die Kontrollgruppe erhielt hierbei anstelle einer weiteren Behandlung eine Placebo-Infusion mit Ringer-Lösung. In der Endotoxin-Gruppe wurden den Ratten 10mg Endotoxin/kg Körpergewicht über zwei Stunden intravenös appliziert (Lipopolysaccharid (LPS) von Escherichia coli, Serotype 055:B5, Phenol Extract, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland, gelöst in NaCl 0,9%). Die Ratten der EUK-8-Gruppe erhielten 3mg/kg Körpergewicht EUK-8 (EMD Biosciences, Inc., San Diego, USA gelöst in NaCl 0,9%) als Bolus und 3mg/kg/h EUK-8 in Form einer Infusion. Bei der verbleibenden Gruppe wurde eine Endotoxin-Exposition mit der Gabe von EUK-8 kombiniert. Den Tieren in der Endotoxin-EUK-8-Gruppe wurden 3mg/kg EUK-8 als Bolus und eine EUK-8-Infusion mit 3mg/kg/h sowie 10mg Endotoxin/kg Körpergewicht über zwei Stunden intravenös verabreicht.

**Tabelle 1: Gruppeneinteilung und Untersuchungen (IVM = Intravitalmikroskopie, MDA = Malondialdehyd, Gruppen je 10 Tiere)**

Gruppe	Monitoring	Spezielle Untersuchungen
Kontrollgruppe	Hf, MAP, Leuko, BGA, Laktat	IVM, MDA, oxLDL, AOPP, Perox, Anox
Endotoxin-Gruppe	Hf, MAP, Leuko, BGA, Laktat	IVM, MDA, oxLDL, AOPP, Perox, Anox
EUK-8-Gruppe	Hf, MAP, Leuko, BGA, Laktat	IVM, MDA, oxLDL, AOPP, Perox, Anox
Endotoxin-EUK-8-Gruppe	Hf, MAP, Leuko, BGA, Laktat	IVM, MDA, oxLDL, AOPP, Perox, Anox

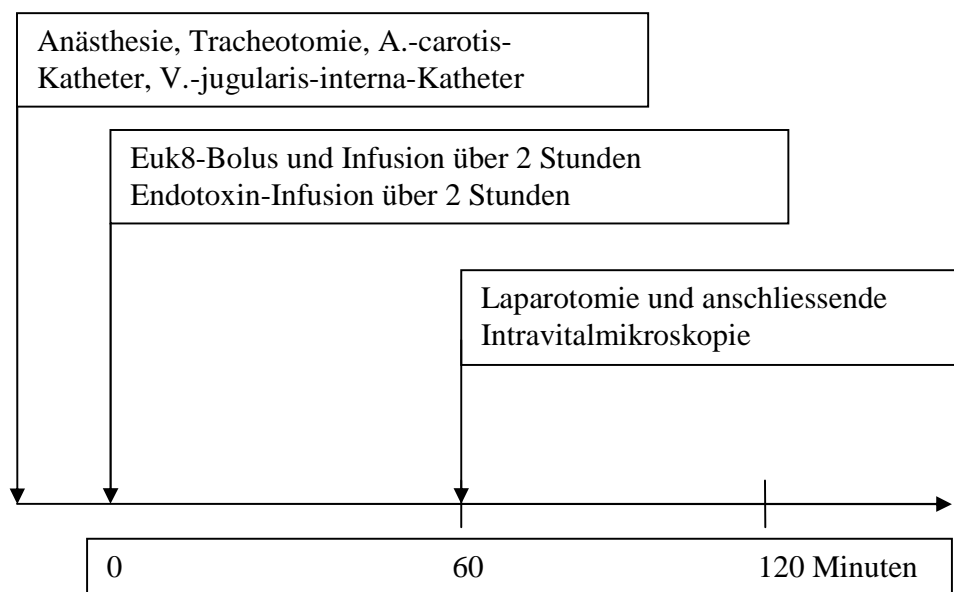
Legende: Hf = Herzfrequenz, MAP = mittlerer arterieller Blutdruck, Leuko = Leukozytenzahl, BGA = Blutgasanalyse, Laktat = Laktatkonzentration des Blutes, IVM = Intravitalmikroskopie, MDA = Malondialdehyd, oxLDL = oxidierte low-density Lipoproteine, AOPP = advanced oxidation protein products, Perox = Kontrollen zur Peroxidbestimmung, Anox = antioxidative Kapazität

## 4.2 Versuchsmodell

### 4.2.1 Versuchsablauf

Im Rahmen einer ca. 30 Minuten dauernden Präparation wurden den Tieren ein arterieller sowie ein venöser Katheter in die Arteria carotis beziehungsweise die Vena jugularis eingelegt. Des Weiteren konnte in dieser Zeit eine Tracheotomie vorgenommen werden. Nach Abschluss der Operation erfolgte die Induktion der Endotoxinämie und/ oder die Bolusapplikation sowie im Falle der Medikamentengruppen der Start der Medikamenteninfusion. Nach einer Dauer von 60 Minuten erfolgte die Laparotomie mit anschliessender 15-minütiger Ruhepause und intravitalmikroskopischer Untersuchung. Blutentnahmen fanden zu den Zeitpunkten 0, 1 und 2 Stunden post operationem statt. Einen detaillierten Überblick über die zeitliche Abfolge liefert die nachstehende Abbildung.

Abbildung: Versuchsablauf



#### **4.2.2 Anästhesie und Monitoring**

Eine Narkoseeinleitung wurde mittels intraperitonealer Applikation von 60 mg/kg KG Pentobarbital (Nembutal, Sanofi, Düsseldorf, Deutschland) durchgeführt. Im Verlauf des Versuches erfolgte die Narkoseaufrechterhaltung durch intravenöse Bolusgaben bis 30 mg/kg KG Pentobarbital bei Bedarf. Zur Kontrolle der Narkosetiefe wurden Zwischenzehen- und Ohrreflex kontinuierlich überprüft.

Für die Präparation, mit welcher 10 Minuten nach Narkoseeinleitung begonnen werden konnte, wurden die Tiere auf dem Rücken liegend auf einer Wärmeplatte fixiert, um eine Aufrechterhaltung der Körpertemperatur im Bereich von  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  auch im narkotisierten Zustand zu gewährleisten. Zunächst erfolgte eine Tracheotomie, um eine Verlegung der oberen Atemwege auszuschliessen, woran sich die Präparation der rechten Vena jugularis interna und der linken Arteria carotis communis anschloss. In diese Blutgefäße wurden Polyethylenkatheter (PE 50, Innendurchmesser 0,58 mm, Aussendurchmesser 0,96 mm, Portex $\checkmark$ , Hythe, Kent, Großbritannien) eingeführt, wobei der venöse Zugang der Verabreichung von Infusion bzw. Medikamenten und der arterielle zum Blutdruckmonitoring und der Blutentnahme diente. Während des gesamten Versuches erfolgte somit eine regelmässige Erfassung von systolischem und mittlerem arteriellen Blutdruck (MAP), Herzfrequenz (Hf; BMT Biomonitor 5231, Druckmesswandler W112, RFT, Stassfurt, Deutschland) und Körpertemperatur (rektale Thermistorsonde, W 233, RFT, Stassfurt, Deutschland). Eine Messung der Atemfrequenz konnte mit Hilfe eines Infrarotsenders gewährleistet werden, welcher in Thoraxhöhe direkt am Tier angebracht wurde.

Über den in der Vena jugularis interna liegenden Polyethylenkatheter wurde eine Volumensubstitution mit Vollelektrolytlösung (Thomaejonin, Thomae, Biberach, Deutschland) über den gesamten Versuchszeitraum von zwei Stunden durchgeführt, wobei die Gesamtvolumenzufuhr bei allen Tieren 7,5ml/kg/h betrug. Dies wurde durch Differenzvolumensubstitution zu der Gruppe erzielt, welche am meisten Volumen erhalten hatte (Endotoxin-EUK-8-Gruppe).

### **4.2.3 Operative Technik**

Zunächst erfolgte eine Rasur und Desinfektion des Halses, woran sich eine circa 3cm lange Inzision der Haut anschloss. Nach anschliessender Darstellung der proximalen Trachea wurde diese mit einer Mikroschere (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) zwischen zwei Trachealspangen quer eröffnet. In den so entstandenen Zwischenraum wurde als Tubus eine Venenverweilkanüle (Braunüle G14, Braun, Melsungen, Deutschland) eingebracht.

Nach der nun folgenden Präparation der Vena jugularis interna dexter wurde das Gefäss im distalen Anteil ligiert. Am proximalen Teil klemmte ein Microclip (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) die Vene ab, so dass per Venae-sectio-Technik der Katheter eingelegt werden konnte. Eine Fixation desselben wurde mit Haltefäden durchgeführt, woraufhin eine Entfernung des Microclips folgte. Ebenso wurde die Arteria carotis communis sinstra katheterisiert.

Nun gewährte man dem Tier eine Erholungsphase von 60 Minuten Dauer, während derer bereits Medikamente, Endotoxine und Infusion verabreicht wurden. Nach sich anschliessender Rasur und Desinfektion wurde eine mediane Laparotomie durchgeführt. Nach Umlagerung des Tieres und Darstellung des terminalen Ileums, etwa 5cm proximal der Ileocaecalklappe, wurden die intravitalmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde der zu untersuchende Darmabschnitt auf eine Haltevorrichtung verbracht und mit einem Deckgläschen (21x26 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) bedeckt, welches die Funktion einer transparenten und ebenen Abdeckung der Mikroskopierkammer hatte. Um ein Austrocknen der exponierten Darmabschnitte zu verhindern, wurden nicht zu untersuchende Darmanteile mit angefeuchteter Gaze bedeckt und stetig eine auf 37°C angewärmte Elektrolytlösung aufgetropft.

Am Versuchsende wurden die Tiere in Narkose mit Chloralhydrat getötet.

### **4.3 Labor**

Zum Messzeitpunkt 0, nach 1 und 2 Stunden wurden aus dem arteriellen Katheter jeweils 600 µl EDTA-Blut und 150 µl Heparinblut entnommen. Aus dem Heparinblut wurde das Blutbild angefertigt. Das EDTA-Blut wurde direkt nach der Blutentnahme bei 6000 Umdrehungen/min zentrifugiert (Janetzki TH 12), der Plasmaüberstand (circa 200 µl) abpipettiert und 1:1 mit 200 µl NaCl verdünnt. Die Probe wurden gleichmässig auf 6 Eppendorfgefässe à 60 µl verteilt und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

Aus dem so gewonnenen Blut wurden unten aufgeführte Laborparameter mit Hilfe von rattenspezifischen Test-Kits bestimmt.

#### **4.3.1 Leukozyten**

Für die Zählung der Leukozyten benötigte man aus dem arteriellen Katheter 150 µl Heparinblut (Zell-Counter: Technicon H1, Bayer, Leverkusen, Deutschland; Eichung auf Rattenblut). Die Messung wurde innerhalb von 12 Stunden nach Gewinnen der Probe und Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4°C durchgeführt.

#### **4.3.2 Malondialdehyd**

Der Spiegel an Malondialdehyd wurde mit Hilfe der Thiobarbitursäure (TBA) bestimmt (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland). Hierbei wurden 20µl der Probe mit 1ml Derivatisierungslösung eine Stunde bei 95°C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe bei 2-8°C für 15 Minuten wurden diese 5 Minuten lang zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden 500µl der so aufbereiteten Probe wurden 500µl Reaktionslösung hinzugegeben. Dabei reagiert Malondialdehyd mit zwei Molekülen der TBA zu einem roten Farbstoff, dessen Konzentration in µmol/ml anschliessend photometrisch bestimmt wird.

#### **4.3.3 oxidierte low density Lipoproteine (oxLDL)**

Mittels eines sandwich-ELISA der Firma Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland mit 2 monoklonalen Antikörpern, wird die Menge des vorhandenen oxidierten low density Lipoproteins bestimmt. Hierfür wird zunächst das oxLDL in den 50µl EDTA-Plasma des Versuchstieres von einem an die Mikrotiterplatte gebundenen polyklonalen Antikörper gebunden. Um überschüssige, ungebundene Substanzen zu entfernen, erfolgte nun ein Waschschriff. Nach



Zugabe eines Peroxidase-markierten Antikörpers fanden erneut Inkubation und Waschvorgang statt. Durch Hinzufügen des Peroxidasesubstrats Tetramethylbenzidin (TMB) und die folgende Zugabe der säurehaltigen Stopplösung erfolgt ein Farbumschlag von blau nach gelb. Bei der folgenden photometrischen Messung bei 450 nm gemessene Farbtintensität ist direkt proportional zur Konzentration des gemessenen oxidierten low density Lipoproteine. Die Resultate werden in ng/ml angegeben.

#### **4.3.4 advanced oxidation protein products (AOPP)**

Der Test der Firma Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland basiert auf der photometrischen Analyse modifizierter Proteine bei 340 nm. Im Rahmen der Testdurchführung werden Standard- und Kontroll-Lösungen sowie 50µl EDTA-Plasma des zu untersuchenden Patienten in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert. Die Absorption wird bei 340 nm gemessen. Die Chloramin-T (CT) Absorption bei 340 nm ist linear im Konzentrationsbereich von 0 bis 100 µmol/l. Die AOPP-Konzentration wird in µmol/l angegeben.

#### **4.3.5 Kontrolle zur Peroxidbestimmung**

Das Test-Kit zur Ermittlung der Kontrollen zur Peroxidbestimmung stammt von der Firma Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland. Die Bestimmung der Peroxide erfolgte photometrisch nach Reaktion von Peroxidase mit Peroxid und einer anschließenden Substratumsetzung mit Tetramethylbenzidin (TMB). Nach Pipettieren von 10µl EDTA-Plasma in die hierfür vorgesehenen Vertiefungen der Mikrotiterplatte wurde der Reaktionspuffer hinzugegeben. Anschließend erfolgte eine Messung der Eigenabsorption bei 450nm Wellenlänge. Nach einer nun folgenden Inkubation für 15 Minuten bei 37°C wurde die Stopplösung hinzugefügt. Im Anschluss daran wurde erneut eine photometrische Messung bei 450nm durchgeführt. Die Differenz der beiden Messungen verhält sich proportional zur Peroxidkonzentration. Die Ergebnisse werden in µmol/l angegeben.

#### **4.3.6 Antioxidative Kapazität**

Die antioxidative Kapazität wurde mittels eines kolorimetrischen Mikrotiterplattenassays bestimmt (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland). Benötigt wurden 10µl EDTA-Plasma. Dabei erfolgte durch Zugabe von einer definierten Menge exogenen Peroxids eine Reaktion mit den in der Probe vorliegenden Antioxidantien. Anschliessend wurde in einer peroxidasekatalysierten Reaktion die quantitative Bestimmung des nicht umgesetzten Peroxids. Nach einer Inkubation bei 37°C wurde eine Stopplösung zugefügt und anschliessend eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 450nm vorgenommen. Das Ergebnis wird in µmol/l angegeben.

## ***4.4 Intravitalmikroskopie***

### **4.4.1 Technik**

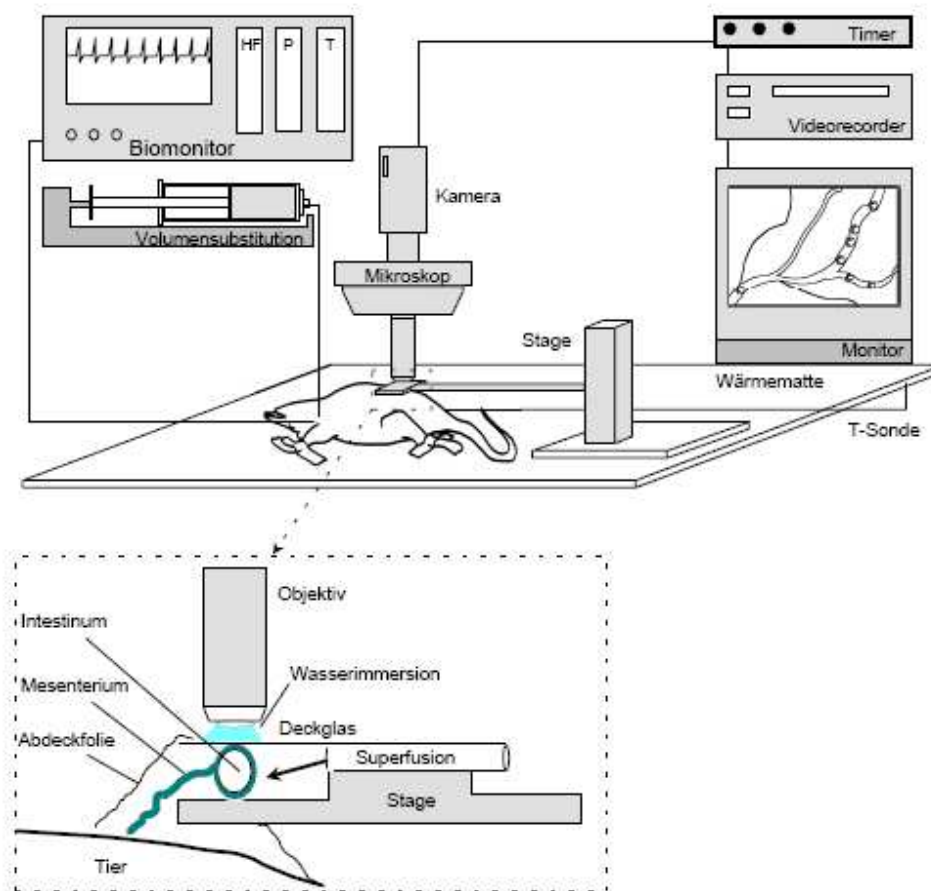
Für die intravitale Fluoreszenz-Video-Mikroskopie (Intravitalmikroskopie, IVM; Abbildung 15) war folgende technische Ausrüstung vorhanden, mit welcher Vergrößerungen um das 250- bzw. 500fache erzielt werden konnten:

- Epifluoreszenzmikroskop Axiotech Vario, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Lichtquelle HBO 50, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Okulare 10 x, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Objektiv - 10 x / 0,5; Fluor, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Übersichtsaufnahmen)
- Objektiv - 20 x / 0,5; Achroplan, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Detailaufnahmen)
- Filtersatz Nr. 20, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Anregung: BP 546/12; Frequenzteiler: 560; Emission: BP 575 - 640) für Beobachtungen mit Rhodamin 6G
- Filtersatz Nr. 10, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Anregung: BP 450 - 490; Frequenzteiler: 510; Emission: BP 515 - 565) für Beobachtungen mit FITC-Dextran
- Video Kamera: Panasonic WV 1850, Matsushita, Tokio, Japan
- Videorecorder: Panasonic AG 6200, Matsushita, Tokio, Japan
- Monitor: Philips LDH 2106/00, Philips, Eindhoven, Niederlande
- Video Timer: VTG-22, For-A, Tokio, Japan

Durch intravenöse Applikation von 0,017 %igen Rhodamin-6G (Sigma, Deisenhofen, Deutschland; Lösungsmittel: NaCl 0,9 %) wurden die Leukozyten markiert. Um eine optimale Darstellung der Leukozyten zu erreichen, wurde ein Bolus von 200 µl injiziert.

Bei der mikroskopischen Untersuchung wurden drei Gesichtsfelder von über mindestens 300 µm gestreckt verlaufenden Venolen 3. Grades in der Submukosa aufgesucht und für 30 - 60 s aufgezeichnet.

Abbildung: Versuchsaufbau Intravitalmikroskopie [115]



Im Anschluss verabreichte man dem Tier 200  $\mu$ l einer 5 %igen FITC-Dextran-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland; gelöst in NaCl 0,9 %), wodurch es zu einer Kontrastanhebung des Plasmas kam. So konnte eine Evaluierung des Kapillarstrombettes stattfinden. Auch hier fand die Aufzeichnung von maximal zehn Videosequenzen (30 s) mit Kapillaren der longitudinalen und zirkulären Muskulatur statt.

Insgesamt dauerte die Mikroskopie circa 25 - 35 min. Am Videomonitor bzw. durch Übertragung der Videowerte auf den PC und mit Hilfe eines Computerprogramms konnten die Aufzeichnungen ausgewertet werden.

Dabei wurden die Leukozytenadhärenz und die funktionelle Kapillardichte bestimmt.

#### 4.4.2 Funktionelle Kapillardichte

Zur Ermittlung der funktionelle Kapillardichte (FCD) in der Lamina muscularis wurde die Länge der sichtbar perfundierten Kapillaren ins Verhältnis zu einer definierten Fläche gesetzt, wobei sich eine Perfusion als Hell- [FITC-Dextran-markiertes Plasma]/Dunkel- [Erythrozyten] Kontrast darstellte.

In Anlehnung an die manuelle Methode nach Schmid-Schoenbein et al. [156] wurde mittels des Computerprogramms Capiscope der Firma KKTechnology (KK Technology, Devon, Großbritannien) eine Auszählung der Schnittpunkte perfundierter Kapillaren mit einer Gitterschablone vorgenommen.

Es wurde darauf folgend rechnerisch die Kapillarlänge je Gitterkästchen ( $L_K$ ) ermittelt.

$$\begin{aligned} \text{FCD } (L_K) &= k \times N/L \\ L &= 2 P_M d = \text{Länge des Gittersystems} \\ d &= \text{Kantenlänge eines Kästchens (in } \mu\text{m} = \text{Originallänge)} \\ P_M &= \text{Kästchenzahl} \\ N &= \text{Kreuzungen von perfundierten Kapillaren mit Gitterlinien} \\ k &= \text{Konstante, die durch } \pi/2 \text{ beschrieben wird} \\ \\ [\text{FCD}] &= \text{mm/mm}^2 = \text{mm}^{-1} \end{aligned}$$

Pro Tier kamen zehn Regionen der Muskularisschicht mit einer Ausdehnung von  $400 \times 500 \mu\text{m}$  zur Auswertung, wobei das Gitter eine Kantenlänge von  $50 \mu\text{m}$  aufwies.

#### 4.4.2 Leukozytenadhärenz

Es wurden jeweils sieben submuköse Venolen 3. Grades (V3) mit einem Durchmesser von  $37,2 \pm 5,5 \mu\text{m}$  zur Auswertung herangezogen. Gemessen wurde die Anzahl der temporär mit dem Gefäßendothel interagierenden und der adhärennten Leukozyten.

##### a) Flow temporär mit dem Endothel interagierender Leukozyten (Roller-Flow)

Weißer Blutzellen, die innerhalb von 30 Sekunden einen ausgewählten Gefäßabschnitt rollend mit einer Geschwindigkeit von circa  $50 \mu\text{m/s}$  passierten, wurden als Roller bezeichnet [110, 119].

Eine Zählung der Roller erfolgte an zwei unterschiedlichen Gefäßdiametern des jeweiligen Gefäßes mit anschließender Bestimmung des Mittelwertes, wobei folgende Gleichung gilt.

$$\text{Roller - Flow} = \text{Zellen/min}$$

##### b) Adhärennte Leukozyten (Sticker)

Als Sticker bezeichnete man Leukozyten, die während eines Zeitraums von mindestens 30 Sekunden an einer umschriebenen Endothelfläche hafteten. Man ging bei der Berechnung der Endotheloberfläche von einer zylinderartigen Struktur des Gefäßes aus.

$$\begin{aligned} \text{Zylinderfläche } F &= l \times U \\ U &= \text{Zylinderumfang} = \pi \times d \\ d &= \text{Gefäßdurchmesser} \\ l &= \text{Länge des Gefäßes} \\ \text{Sticker} &= \text{Zellen} / \text{mm}^2 \end{aligned}$$

Am Computer konnte mittels eines speziellen Programms eine maßstabgetreue Größen- und Längenbestimmung der Gefäße erfolgen, welche zur Bestimmung der Leukozyten-Endothel-Interaktion herangezogen wurden.

## 4.5 Statistik

Zur statistischen Analyse und Datenverarbeitung wurde das Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) verwendet. Zunächst wurden die Daten sowohl auf Normalverteilung als auch auf Varianzgleichheit geprüft. Aufgrund der Ergebnisse der Überprüfung und der zusätzlichen kleinen Fallzahlen wurden nicht-parametrische Tests zur Analyse der Daten durchgeführt.

Die Verteilung der Beobachtungswerte wurde in Form von Medianen und dem 25. bzw. 75. Perzentil angegeben.

Zum Vergleich zwischen den Gruppen zu bestimmten Zeitpunkten wurde zunächst der H-Test nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Zeigte dieser nachweisbare Unterschiede, wurde zum paarweisen Vergleich einzelner Gruppen der U-Test nach Mann-Whitney herangezogen.

Im Falle von Wiederholungsmessungen wurde eine nicht-parametrische zweifaktorielle Kovarianzanalyse (ANCOVA) der longitudinalen Daten mit Orientierung am Basiswert als Covariate durchgeführt. Der erste Faktor war die Behandlung mit den Abstufungen Kontrollgruppe, Endotoxin-Gruppe, EUK-8-Gruppe, Endotoxin-EUK-8-Gruppe. Der zweite Faktor Zeit war abgestuft in die einzelnen Messzeitpunkte. Bei dieser ANCOVA wurden nicht nur die Wirkungen der beiden Faktoren und deren Interaktion bestimmt, sondern auch der Einfluss der Covariaten. Eine Veränderung bezogen auf die Zugehörigkeit bestimmter Gruppen konnte nur nachgewiesen werden, wenn die Interaktion der beiden Faktoren signifikant war und die Covariate keinen Einfluss hatte. Anschließend wurden mit Hilfe linearer Kontraste die einzelnen Therapiegruppen jeweils mit der Kontrollgruppe in ihrem Verlauf mit Hilfe des U-Tests nach Mann-Whitney verglichen.

Im Falle eines signifikanten Unterschiedes zwischen der Endotoxin- und einer der Therapiegruppen schloss sich ein Post-Hoc-Test an. Dabei wurde paarweise zu den einzelnen Messzeitpunkten verglichen.

Bei allen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $\alpha = 0,05$  angenommen. Bei der Verwendung mehrerer simultaner Signifikanztests kommt es zu der Gefahr einer Alpha-Fehler-Inflation, so auch bei der paarweisen Berechnung von Unterschieden. Hier musste mit Hilfe der Alpha-Adjustierung nach Bonferroni die Irrtumswahrscheinlichkeit nach unten korrigiert werden. Die Formel hierfür lautet  $\alpha_{\text{kor}}=0,05/n$ , wobei n die Anzahl simultan durchgeführter Tests ist.

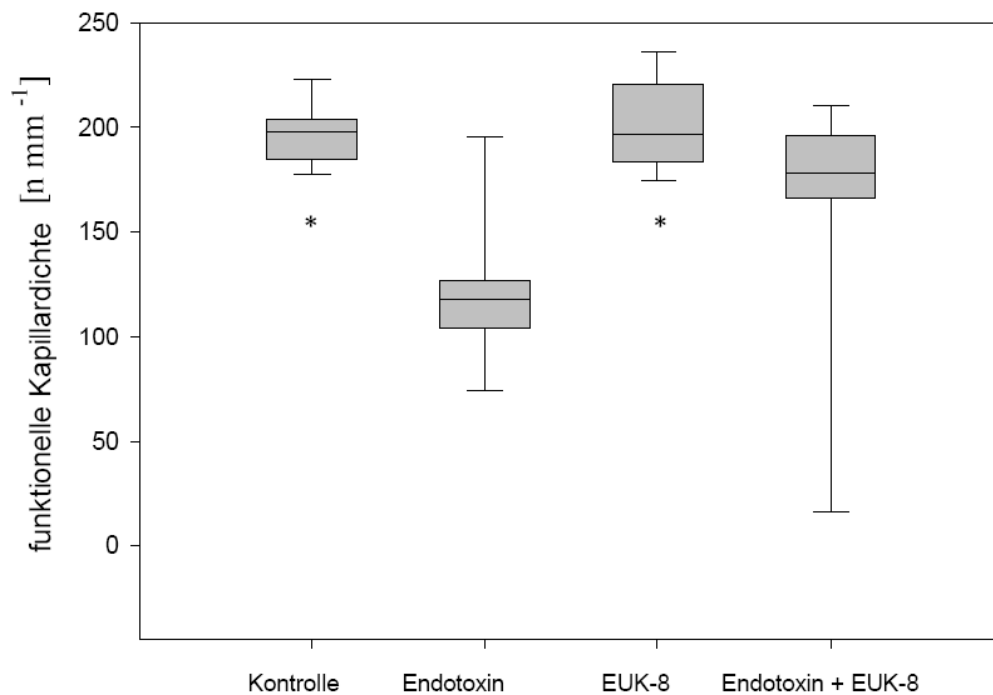
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Intravitalmikroskopie

#### 5.1.1 Funktionelle Kapillardichte

Der H-Test nach Kruskal-Wallis erbrachte einen globalen Unterschied zwischen allen vier Gruppen mit  $\chi^2(3) = 17,91$ ;  $p < 0,05$ . Wie in Abbildung 1 zu sehen, betrug die funktionelle Kapillardichte in der Kontrollgruppe im Median 198  $\text{mm}^{-1}$  (185 - 204,5).

**Abbildung 1: Funktionelle Kapillardichte in  $\text{n mm}^{-1}$  gemessen in der Lamina muscularis eine Stunde nach Beginn der Endotoxininfusion**



Anmerkung: \*  $p < 0,05$  vs. Endotoxin

Bestimmung der funktionellen Kapillardichte (FCD) [ $\text{n mm}^{-1}$ ]. Messungen zum Zeitpunkt 1 Stunde nach Beginn der Endotoxin-Infusion. \*  $p < 0,008$  vs Endotoxin; Unterschied zur Endotoxin-Gruppe



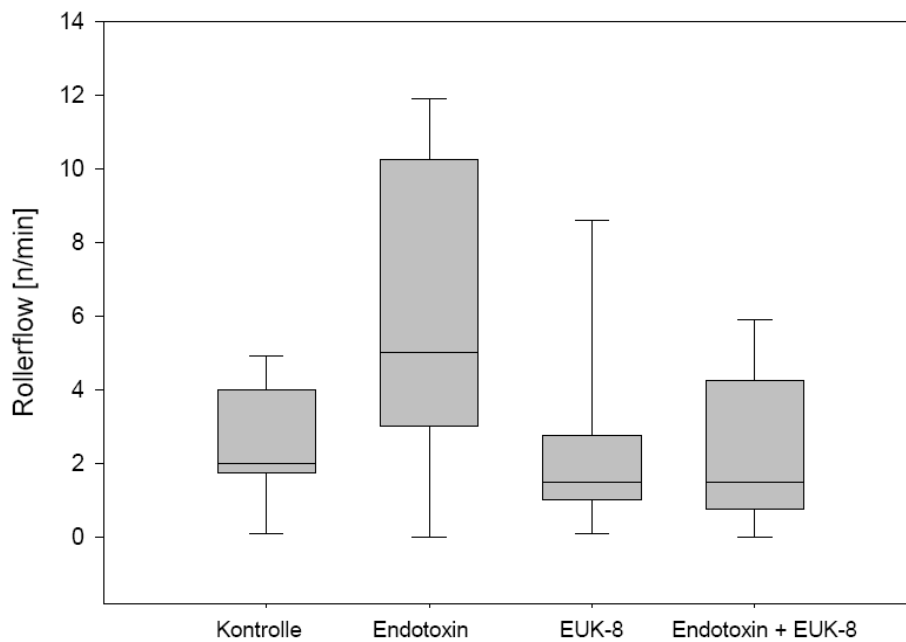
Bei den paarweisen Vergleichen zeigte sich zwischen der Endotoxin- und der Kontrollgruppe ein nachweisbarer Unterschied mit  $U = 7$ ,  $p < 0,008$ . Der Median in der Endotoxingruppe betrug  $118 \text{ mm}^{-1}$  ( $104 - 127,25$ ). In einem ähnlichen Bereich wie die Kontrollgruppe lag die funktionelle Kapillardichte in der EUK-8-Gruppe mit dem Median  $196,5 \text{ mm}^{-1}$  ( $183,75 - 220$ ). Hier konnte kein Unterschied nachgewiesen werden ( $U = 47$ ;  $p > 0,008$ ). Bei Verabreichung von Endotoxin und EUK-8 betrug der Median  $179 \text{ mm}^{-1}$  ( $166,25 - 196$ ). Die FCD war im Vergleich mit der Kontrollgruppe nicht signifikant vermindert ( $U = 25$ ;  $p > 0,008$ ). Die Unterschiede zwischen der Endotoxin- und der Endotoxin-EUK-8-Gruppe waren ebenfalls nur zufällig entstanden mit  $U = 17$ ;  $p > 0,008$ .

## 5.1.2 Leukozytenadhärenz

### 5.1.2.1 Temporär adhärenente Leukozyten

In Abbildung 2 ist die Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten dargestellt. Der H-Test nach Kruskal-Wallis zeigte keinen nachweisbaren Unterschied über alle Gruppen mit  $\chi^2(3) = 6,16$ ;  $p > 0,05$ . In der Kontrollgruppe konnten im Median 2 temporär adhärenente Leukozyten/ Minute (1,75 - 4) gezählt werden. In der Endotoxin-Gruppe konnte ein Trend zu einer höheren Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten festgestellt werden, wobei kein statistisch nachweisbarer Unterschied zu den anderen Gruppen vorlag (5/min, (3 - 10)). In der EUK-8- und der Endotoxin-EUK-8-Gruppe wurden im Median jeweils 1,5 Leukozyten/ Minute registriert (EUK-8-Gruppe 1 - 2,75; Endotoxin-EUK-8-Gruppe 0,75 - 4,25).

**Abbildung 2: Temporär adhärenente Leukozyten (Roller) in den submukösen Venolen in n/min eine Stunde nach Beginn der Endotoxininfusion**

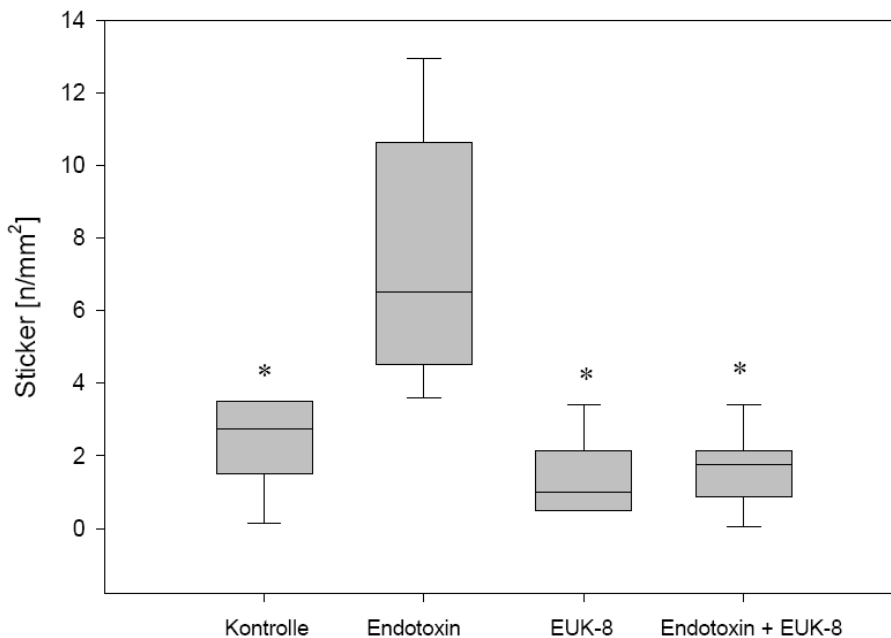


Bestimmung der temporär adhärenenten Leukozyten in Anzahl pro Minute [n/min]. Messung 1 Stunde nach Beginn der Endotoxin-Infusion.

### Fest adhärenente Leukozyten

Der H-Test nach Kruskal-Wallis zeigte einen globalen Unterschied zwischen allen vier Gruppen mit  $\chi^2(3) = 23,98$ ;  $p < 0,05$ . In Abbildung 3 ist die Anzahl der fest adhärenente Leukozyten dargestellt. In der Kontrollgruppe konnten 6 Leukozyten/mm<sup>2</sup> (4 - 7) gezählt werden. Die Endotoxingruppe unterschied sich mit im Median 13 fest adhärenente weißen Blutzellen/mm<sup>2</sup> (9-18) signifikant von der Kontrollgruppe,  $U = 1,5$ ;  $p < 0,008$ . Auch zwischen EUK-8-Gruppe (2 Leukozyten/mm<sup>2</sup>(1 - 3,5)) und Endotoxin-Gruppe konnte ein statistisch bedeutsamer Unterschied festgestellt werden ( $U = 0,50$ ;  $p < 0,008$ ). Die Kontroll- und die Endotoxin-EUK-8-Gruppe (4 Leukozyten/mm<sup>2</sup> (3 - 4)) unterschieden sich nur zufällig mit  $U = 30,00$ ;  $p > 0,008$ . Beim Vergleich der Endotoxin- und der Endotoxin-EUK-8-Gruppe konnte ein Unterschied nachgewiesen werden ( $U = 0,50$ ;  $p < 0,008$ ). Die Kontroll- und die Endotoxin-EUK-8-Gruppe unterschieden sich nicht nachweisbar von einander ( $U = 30,00$ ;  $p > 0,008$ ).

**Abbildung 3: Fest adhärenente Leukozyten (Sticker) in den submukösen Venolen in n/mm<sup>2</sup> eine Stunde nach Beginn der Endotoxininfusion**



Anmerkung: \*  $p < 0,05$  vs. Endotoxin

Bestimmung der fest adhärenente Leukozyten in Anzahl der fest adhärenente Leukozyten pro Quadratmillimeter [n/mm<sup>2</sup>]. Messung, 1 Stunde nach Beginn der Endotoxin-Infusion \*  $p < 0,008$  vs Endotoxin; Unterschied zur Endotoxin-Gruppe

## 5.2 Laborparameter

### 5.2.1 Leukozytenzahl

In Tabelle 1 sind die Veränderungen der Leukozytenzahl im peripheren Blut dargestellt. Die Leukozytenzahl stieg in der Kontrollgruppe nach 2 Stunden geringgradig an (von ca. 4 auf ca. 4,8 Gpt/l). In der Endotoxingruppe konnte eine Reduktion der Leukozyten im peripheren Blut festgestellt werden. Wie in der Kontrollgruppe, konnte auch in der EUK-8-Gruppe ein Anstieg der Anzahl der weißen Blutzellen von ca. 4,8 auf ca. 7,6 Gpt/l registriert werden. Eine deutliche Verminderung der Leukozytenzahl konnte in der Endotoxin-EUK-8-Gruppe verzeichnet werden. Nach 2 Stunden lagen in der Endotoxin- und in der Endotoxin-EUK-8-Gruppe eine Reduktion der Leukozyten im Vergleich zu ihren jeweiligen Ausgangswerten vor. Die nicht-parametrische ANCOVA zeigte sowohl eine Wirkung des Gruppenfaktors ( $p < 0,05$ ) als auch eine Wirkung der Zeit ( $p < 0,05$ ), jedoch keine Interaktion beider Faktoren ( $p > 0,05$ ). Die Covariate Anfangswert hatte ebenfalls einen signifikanten Einfluss ( $p < 0,05$ ). Der Vergleich einzelner Gruppen mit Hilfe linearer Kontraste zeigte keine Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

**Tabelle 1: Leukozytenzahl in Gigapartikel pro Liter [Gpt/l]**

Gruppe / Zeit	0 h	1 h	2 h	<i>p</i>
Kontrollgruppe	4,08 (2,35-6,11)	3,38 (2,41-4,13)	4,82 (2,92-7,52)	
Endotoxin-Gruppe	3,37 (2,10-3,74)	1,61 (0,71-2,84)	2,17 (1,15-3,36)	<i>n.s.</i>
EUK-8-Gruppe	4,87 (4,05-6,26)	3,28 (2,7-4,67)	7,59 (2,50-8,96)	<i>n.s.</i>
Endotoxin-EUK-8-Gruppe	3,37 (2,01-4,43)	1,12 (0,78-2,82)	0,96 (0,38-3,1)	<i>n.s.</i>

Bestimmung der Leukozytenzahl in Gigapartikel pro Liter [Gpt/l]. Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion. *p* für ANCOVA. *n.s.*: nicht signifikant

### 5.2.2 Malondialdehyd

In der Kontrollgruppe konnte in dem zweistündigen Untersuchungszeitraum ein Trend zu einer Erhöhung der Malondialdehyd-Konzentration ermittelt werden. Im Unterschied zu den anderen Gruppen konnten bei den nur mit LPS behandelten Tieren eine Tendenz zu niedrigeren MDA-Konzentrationen nach Beginn der Endotoxininfusion im Vergleich zum Ausgangswert bemerkt werden. Der MDA-Spiegel der EUK-8-Gruppe lag zum Zeitpunkt 0 bei 0,49  $\mu\text{mol/ml}$  und stieg 2 Stunden nach Versuchsbeginn auf 0,63  $\mu\text{mol/ml}$  an. Die MDA-Konzentration in der Endotoxin-EUK-8-Gruppe stieg ebenfalls im Lauf der Untersuchung an (s. Tab. 2). Die nicht-parametrische ANCOVA zeigte für beide Faktoren einen signifikanten Effekt ( $p < 0,05$ ).

Es konnte keine Interaktion nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ). Mit Hilfe der linearen Kontraste zeigten sich Unterschiede im Verlauf zwischen Kontrollgruppe und Endotoxin-Gruppe ( $p < 0,05$ ). Es konnte jedoch kein Zeitpunkt bestimmt werden, an dem zwischen beiden Gruppen ein tatsächlicher Unterschied bestand (0 h:  $U = 35,5$ ,  $p > 0,017$ ; 1 h:  $U = 25,5$ ,  $p > 0,017$ ; 2 h:  $U = 44,5$ ;  $p > 0,017$ ).

**Tabelle 2: Malondialdehyd (MDA) in  $\mu\text{mol/ml}$**

Gruppe / Zeit	0 h	1 h	2 h	<i>p</i>
Kontrollgruppe	0,36 (0,33-0,67)	0,38 (0,32-0,55)	0,55 (0,47-0,83)	
Endotoxin-Gruppe	0,62 (0,41-0,76)	0,43 (0,4-0,86)	0,55 (0,44-0,78)	$p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe
EUK-8-Gruppe	0,49 (0,44-0,65)	0,54 (0,51-0,68)	0,63 (0,45-0,98)	<i>n.s.</i>
Endotoxin-EUK-8-Gruppe	0,64 (0,56-0,81)	0,68 (0,54-0,88)	1,03 (0,89-1,33)	<i>n.s.</i>

Konzentration des Malondialdehyds in  $\mu\text{mol/ml}$ . Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion, *p* für ANCOVA. *n.s.*: nicht signifikant

### 5.2.3 Oxidierte low-density-Lipoproteine (oxLDL)

Eine Stunde nach Beginn der Endotoxininfusion konnte kein deutlicher Unterschied der oxLDL verglichen mit den Ausgangswerten festgestellt werden. Nach zwei Stunden zeigte sich in allen Gruppen eine höhere oxLDL-Konzentration als zum Zeitpunkt 0 (s. Tab. 3). Sowohl der Faktor Zeit ( $p < 0,05$ ) als auch die Covariate ( $p < 0,05$ ) zeigten einen Einfluss auf diese. Statistische Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht festgestellt werden ( $p > 0,05$ ).

**Tabelle 3: oxidierte low-density-Lipoproteine (oxLDL) in ng/ml**

Gruppe / Zeit	0 h	1 h	2 h	<i>p</i>
Kontrollgruppe	73,28 (66,73-98,69)	83,57 (68,58-119,75)	178,45 (126,28-198,85)	
Endotoxin-Gruppe	91,98 (70,93-111,11)	73,81 (63,49-111,48)	189,65 (133,53-228,43)	<i>n.s.</i>
EUK-8-Gruppe	84,41 (76,19-92,65)	89,66 (77,68-120,85)	144,29 (128,18-209,92)	<i>n.s.</i>
Endotoxin-EUK-8-Gruppe	94,93 (68,47-134,06)	91,6 (70,04-159,29)	221,65 (142,62-268,24)	<i>n.s.</i>

Konzentration der oxidierten low-density Lipoproteine in ng/ml. Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion. *p* für ANCOVA. *n.s.*: nicht signifikant

### 5.2.3 Advanced oxidation protein products (AOPP)

Wie in Tabelle 4 zu sehen, war bei der Messung eine Stunde nach Versuchsbeginn die AOPP im Vergleich mit dem Ausgangswert der jeweiligen Gruppe kaum verändert und in allen Gruppen – mit Ausnahme der Kontrollgruppe, bei der es eine Verminderung der AOPP gab - nur geringfügig erhöht. Bei der dritten Messung zwei Stunden nach Versuchsbeginn war in allen Gruppen eine höhere AOPP-Konzentration zu verzeichnen. Die ANCOVA zeigte keinen Gruppeneffekt ( $p > 0,05$ ). Sowohl der Faktor Zeit ( $p < 0,05$ ) als auch die Interaktion beider Faktoren zeigten eine Wirkung auf die AOPP-Konzentration ( $p < 0,05$ ). Die linearen Kontraste zeigten einen unterschiedlichen Verlauf bei Kontroll- und EUK-8-Gruppe. Es konnte kein Zeitpunkt identifiziert werden, an dem sich beide Gruppen nachweisbar voneinander unterschieden (0 h:  $U = 49,0$ ,  $p > 0,017$ ; 1 h:  $U = 26,0$ ,  $p > 0,017$ ; 2 h:  $U = 35,0$ ;  $p > 0,017$ ).

**Tabelle 4: advanced oxidation protein products (AOPP) in  $\mu\text{mol/l}$**

Gruppe / Zeit	0 h	1 h	2 h	<i>p</i>
Kontrollgruppe	3,86 (0,58-9,96)	1,63 (0,76-6,71)	20,06 (16,57-23,25)	
Endotoxin-Gruppe	2,81 (1,75-4,1)	3,04 (0,76-4,97)	22,02 (15,69-36,78)	<i>n.s.</i>
EUK-8-Gruppe	4,2 (1,81-8,06)	3,72 (2,58-8,24)	16,81 (11,75-22,07)	$p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe
Endotoxin-EUK-8-Gruppe	5,52 (4,68-8,08)	5,37 (3,6-9,92)	27,57 (15,51-44,4)	<i>n.s.</i>

Konzentration der advanced oxidation protein products in  $\mu\text{mol/l}$ . Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion, *p* für ANCOVA. *n.s.*: nicht signifikant

### 5.2.5 Kontrollen zur Peroxid-Bestimmung

Im Laufe der Untersuchung konnte in allen Gruppen ein Trend zu einer Verminderung der Peroxid-Konzentration (s. Tab. 5) festgestellt werden. Auf die Veränderung der Peroxidkonzentration wirkten sowohl der Faktor Zeit ( $p < 0.05$ ) als auch der Ausgangswert ( $p < 0,05$ ). Es konnten keine Unterschiede im Verlauf zwischen einzelnen Gruppen nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ).

**Tabelle 5: Kontrollen zur Peroxid-Bestimmung in  $\mu\text{mol/l}$**

Gruppe / Zeit	0 h	1 h	2 h	<i>p</i>
Kontrollgruppe	28,89 (17,47-33,42)	26,91 (14,86-30,38)	21,77 (16,43-28,83)	
Endotoxin-Gruppe	26,53 (18,85-31)	22,44 (13,02-29,82)	18,47 (12,03-24,67)	<i>n.s.</i>
EUK-8-Gruppe	21,94 (14,26-25,32)	16,31 (14,8-22,72)	19,47 (17-22,01)	<i>n.s.</i>
Endotoxin-EUK-8-Gruppe	22,29 (16,92-26,57)	19,53 (8,08-22,48)	15,06 (11,78-21,65)	<i>n.s.</i>

Konzentration der Kontrollen zur Peroxidbestimmung in  $\mu\text{mol/l}$ . Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion, *p* für ANCOVA. n.s.: nicht signifikant



### 5.2.6 Antioxidative Kapazität

Im Versuchsverlauf zeigte sich in allen Gruppen eine Tendenz zu einer Verminderung der antioxidativen Kapazität (s. Tab. 6). Während nach einer Stunde nur eine geringgradige Reduktion und in der Endotoxin-Gruppe sogar ein leichter Anstieg der antioxidativen Kapazität feststellbar war, zeigte sich bei der dritten Messung zwei Stunden nach Versuchsbeginn eine reduzierte antioxidative Kapazität. Die Reduktion der antioxidativen Kapazität war in der EUK-8-Gruppe am schwächsten ausgeprägt. Nur der Faktor Zeit hatte einen Einfluss auf die antioxidative Kapazität ( $p < 0,05$ ). Andere Effekte konnten nicht nachgewiesen werden.

**Tabelle 6: antioxidativen Kapazität in  $\mu\text{mol/l}$**

Gruppe / Zeit	0 h	1 h	2 h	<i>p</i>
Kontrollgruppe	290,9 (277,8-304,6)	284,8 (255,3-302,6)	250,7 (163,9-280,4)	
Endotoxin-Gruppe	250,4 (223,9-302,4)	263,1 (207,7-287,1)	87,2 (11,8-235)	<i>n.s.</i>
EUK-8-Gruppe	282,8 (269,2-289)	274,4 (231,1-285,9)	259 (232,2-273,8)	<i>n.s.</i>
Endotoxin-EUK-8-Gruppe	281,3 (254,3-285,5)	240,2 (200,2-273,3)	138,4 (5,2-264,6)	<i>n.s.</i>

Bestimmung der antioxidativen Kapazität in  $\mu\text{mol/l}$ . Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion. *p* für ANCOVA. *n.s.*: nicht signifikant

## 5.3 Hämodynamik

### 5.3.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Über einen Zeitraum von 2 Stunden wurde der Blutdruck viertelstündlich zur Auswertung festgehalten. In allen Gruppen konnte ein Trend zu einer Verminderung des Blutdrucks beobachtet werden (s. Tab. 7), wobei nur in der Endotoxin-EUK-8-Gruppe zwischen der ersten und zweiten Stunde des Versuchs eine Tendenz zu einem Blutdruckanstieg registriert werden konnte. Der MAP sank sowohl in der EUK-8- als auch in der Endotoxin-EUK-8-Gruppe unter 90 mmHg. Die ANCOVA zeigte zwar eine Wirkung des Faktors Gruppe ( $p < 0,05$ ), jedoch auch den bedeutsamen Einfluss der Ausgangswerte ( $p < 0,05$ ). Die linearen Kontraste konnten keine Unterschiede zwischen der Kontroll- und einzelner Therapiegruppen feststellen ( $p > 0,05$ ).

**Tabelle 7: mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) in mm/Hg**

Gruppe / Zeit	0 h	1 h	2 h	<i>p</i>
Kontrollgruppe	121 (95-129)	100 (86-119)	108 (89-112)	
Endotoxin-Gruppe	107,5 (98-122)	103,5 (80-118)	94,5 (75-111)	<i>n.s.</i>
EUK-8-Gruppe	116 (98-124)	88 (74-103)	84 (48-99)	<i>n.s.</i>
Endotoxin-EUK-8-Gruppe	95 (77-119)	71 (65-91)	82,5 (72-88)	<i>n.s.</i>

Bestimmung des mittleren arteriellen Blutdrucks in Millimeter Quecksilbersäule [mm/Hg]. Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion, *p* für ANCOVA. *n.s.*: nicht signifikant

### 5.3.2 Herzfrequenz

In der Kontrollgruppe kam es in der ersten Stunde nach Versuchsbeginn zu einem tendenziellen Herzfrequenzabfall gefolgt von einer über das Niveau des Ausgangswerts hinausgehenden Herzfrequenz von 394/min zwei Stunden nach Beginn der Endotoxininfusion (s. Tab. 8). In der Endotoxingruppe zeigte sich innerhalb der ersten Stunde nach Versuchsbeginn ein Trend zu einer höheren Herzfrequenz. Die Ausgangswerte in der EUK-8-Gruppe und der Endotoxin-EUK-8-Gruppe lagen mit einem Median von 351,5/min bzw. 343/min unter denen der anderen Gruppen (368,5-377/min). In der EUK-8-Gruppe zeigten sich statistisch nicht relevante leichte Schwankungen der Herzfrequenz im Untersuchungszeitraum. Auch in der Endotoxin-EUK-8-Gruppe konnte im Lauf der ersten Stunde ein tendenzieller Herzfrequenzanstieg festgestellt werden. In der ANCOVA zeigten sich sowohl bei beiden Faktoren als auch bei der Covariaten nachweisbare Wirkungen auf die Herzfrequenz ( $p < 0,05$ ). Eine Interaktion bestand jedoch nicht ( $p > 0,05$ ). Unterschiede im Verlauf einzelner Gruppen konnten nicht nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ).

**Tabelle 8: Herzfrequenz in n/min**

Gruppe / Zeit	0 h	1 h	2 h	<i>p</i>
Kontrollgruppe	377 (342-395)	333,5 (304-383)	394 (368-411)	
Endotoxin-Gruppe	368 (360-411)	394 (364-448)	436 (355-470)	<i>n.s.</i>
EUK-8-Gruppe	351 (342-377)	308 (291-330)	342 (316-385)	<i>n.s.</i>
Endotoxin-EUK-8-Gruppe	343 (333-377)	368 (343-394)	368 (355-419)	<i>n.s.</i>

Bestimmung der Herzfrequenz in Anzahl der Schläge pro Minute [n/min]. Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion, *p* für ANCOVA. *n.s.*: nicht signifikant

### 5.3.3 Atemfrequenz

In allen Gruppen zeigte sich ein Trend zu einer Erhöhung der Atemfrequenz im Untersuchungszeitraum von zwei Stunden (s. Tab. 9). Dieser fiel in den mit Endotoxin bzw. Endotoxin und EUK-8 behandelten Gruppen besonders deutlich aus, wobei der Ausgangswert in der Endotoxingruppe bei 85,5/min, in der Endotoxin-EUK-8-Gruppe bei 95 lag. Sowohl die Faktoren Gruppe und Zeit als auch die Covariate Ausgangswert zeigten einen nachweisbaren Effekt auf die Atemfrequenz ( $p < 0,05$ ). Eine Interaktion konnte nicht nachgewiesen werden ( $p > 0,05$ ). Der Vergleich der Verläufe der Kontrollgruppe mit jeweils einer Therapiegruppe erbrachte nachweisbare Unterschiede zwischen Kontroll- und Endotoxin-Gruppe bzw. Kontroll- und Endotoxin-EUK-8-Gruppe. Vergleiche der jeweils beiden Gruppen zu einzelnen Zeitpunkten zeigten, dass nur Kontrollgruppe und Endotoxin-EUK-8-Gruppe nach zwei Stunden unterschiedliche Atemfrequenzen zeigten ( $p < 0,017$ ).

**Tabelle 9: Atemfrequenz in n/min**

Gruppe / Zeit	0 h	1 h	2 h	<i>p</i>
Kontrollgruppe	92 (83-98)	93 (80-110)	96 (81-100)	
Endotoxin-Gruppe	85 (70-109)	108 (95-131)	121 (104-131)	$p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe
EUK-8-Gruppe	92 (83-105)	100 (91-123)	103 (92-119)	<i>n.s.</i>
Endotoxin-EUK-8-Gruppe	95 (84-103)	119 (92-136)	135* (118-154)	$p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe

Bestimmung der Herzfrequenz in Anzahl der Atemzüge pro Minute [n/min]. Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion. *p* für ANCOVA. *n.s.*: nicht signifikant; \*  $p < 0,017$ , Unterschied zu Kontrollgruppe.

## **6 Diskussion**

### ***6.1 Diskussionsgrundlagen***

Ziel der hier vorliegenden Untersuchung war die Wirkung der antioxidativ wirkenden Substanz EUK-8 auf die gestörte Mikrozirkulation septischer Patienten. Hierfür wurde durch permanente Endotoxininfusion das normotensive Sepsisstadium simuliert und sowohl die Leukozyten-Endothel-Interaktion und die funktionelle Kapillardichte als auch Blutparameter wie beispielsweise oxLDL und Malondialdehyd bestimmt.

### ***6.2 Diskussion der Methodik Methodik***

#### **6.2.1 Sepsismodelle**

Obwohl es eine Reihe von Sepsismodellen gibt, kann die überwiegende Zahl derselben jedoch nur unzureichend die komplexen Vorgänge des septischen Geschehens ausdrücken [164]. So kann hochdosiertes LPS in sensitiven Tieren zwar zum letalen sepsisähnlichen Schock führen [51], einer Bolusinjektion mit LPS hingegen kann aufgrund einer hierdurch induzierten Zytokinausschüttung jedoch eine – auch LPS-Toleranz genannte - verbesserte Überlebensfähigkeit folgen [54, 55].

Desweiteren stellt die tierexperimentelle Forschung zwar das Verbindungsstück zwischen in-vitro-Versuchsreihen und klinischen Studien dar, eine Übertragung der Untersuchungsergebnisse auf den Menschen ist jedoch aufgrund der anatomisch-metabolischen Unterschiede zwischen Versuchstier und Mensch nicht möglich [164-166].

Neben Sepsismodellen mit induzierter Peritonitis existieren solche [167], in denen eine Endotoxinämie per LPS-Applikation erzeugt wird [118, 166]. Hierbei muss zwischen Modellen mit Endotoxin-Bolusgabe und solchen mit einer Endotoxininfusion über einen längeren Zeitraum unterschieden werden, da erstere schnell zu einem hypodynamen Kreislaufstadium mit Tod des Versuchstieres binnen weniger Stunden führen. Dies ist von einem Anstieg der Laborparameter in einem Masse begleitet, wie er in Sepsispatienten eigentlich nicht beobachtet werden kann und spiegelt demnach die klinische Realität nur unzureichend wider [166].

Vorteile des hier gewählten Sepsismodells sind die gute Reproduzierbarkeit und die kurze Versuchsdauer, wobei bereits 30-45 Minuten nach LPS-Verabreichung pathophysiologische Veränderungen festgestellt werden können [168].

In Anlehnung an Xu et al. wurde ebenfalls die Dauerinfusion von Endotoxin zur Sepsisinduktion gewählt, da es bei Bolusapplikation abhängig von der LPS-Dosis zur Induktion eines hypo- oder hyperdynamen Stadiums kommt [166]. So wurde in diesem Falle ebenfalls eine niedrige Endotoxindosis mit 10mg/kg Endotoxin von E. coli O55:B5 gewählt um eine hyperdynamische Reaktion mit den hierfür typischen Reaktionen wie ein erhöhtes Herzminutenvolumen hervorzurufen [168].

### **6.2.2 Anästhesie und Monitoring**

Narkotika wie Fentanyl und auch Morphin können einen Einfluss auf die Mikrozirkulation ausüben [169-173]. Bezüglich der Veränderungen durch Ketamingabe gibt es unterschiedliche Aussagen. Während Schmidt et al. festgestellt haben, dass Ketamin zu einer verminderten Leukozytenadhärenz führt, konnten Lehmann et al. dies nicht bestätigen [170, 174]. Yang et al. fanden eine Reduktion der Entzündungsreaktion in mit Ketamin behandelten Tieren [175]. Beim Einsatz von Propofol hingegen kommt es zu einer Abnahme der Lipidperoxidation [176]. In dieser Versuchsreihe wurde daher auf den Einsatz solcher Substanzen verzichtet und eine Narkose mittels Pentobarbital durchgeführt, da dieser Wirkstoff keinen Einfluss auf die Leukozytenadhärenz ausübt [171, 173].

### **6.2.3 operative Technik**

Desweiteren konnten Starkopf et al. zeigen, dass das Vornehmen eines chirurgischen Eingriffes bereits nach 15 Minuten zu einer Zunahme der Lipidperoxidation bei gleichzeitiger Reduktion der antioxidativen Kapazität führt, wobei eine Normalisierung letzterer erst nach 18 Stunden eintrat [179]. In der genannten Studie konnte anhand des Ausmaßes der Laborveränderungen nicht zwischen einem septischen Prozess und einem operierten Patienten unterschieden werden. Da in der vorliegenden Untersuchung allerdings ausnahmslos alle Tiere laparotomiert wurden, ist dieser Punkt zu vernachlässigen, da sich die der Sepsis zuzuschreibende Lipidperoxidation zu der operationsbedingten hinzuaddiert.

#### **6.2.4 Intravitalmikroskopie**

Zwar wurde auch diskutiert, dass Rhodamin-6G in Verbindung mit langer Inkubationsdauer und fluoreszierendem Licht die Leukozyten-Endothel-Interaktion beeinträchtigt, jedoch konnten in Versuchsmodellen wie dem unseren in der Literatur keine signifikanten Beeinträchtigungen festgestellt werden [119, 177, 178]. Außerdem wurde die Beleuchtungszeit so kurz wie möglich gehalten um diesen Effekt zu minimieren.

## ***6.3 Diskussion der Ergebnisse der Intravitalmikroskopie***

### **6.3.1 Funktionelle Kapillardichte**

In der vorliegenden Untersuchung konnte bezüglich der funktionellen Kapillardichte ein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Endotoxingruppe festgestellt werden. Beim paarweisen Vergleich zeigte sich, dass die Unterschiede zwischen den anderen Gruppen nur zufällig entstanden waren.

Entscheidend für die Erfassung von Perfusionsänderungen der Darmwand bei Endotoxinämie ist sowohl das gewählte Sepsismodell als auch die Methodik. Je nach gewählter Untersuchungstechnik kann eine Minderperfusion nachvollzogen werden [195, 196] oder aber nicht in Erscheinung treten [173, 197]. Andere Studien wiederum belegen zudem eine Durchblutungsumverteilung zugunsten der Mukosa bei dementsprechender Hypoperfusion der Muskularis, wobei die Gesamtpfusion des Darmes unverändert blieb [133, 177, 198].

Obwohl eine gesteigerte intestinale Permeabilität in erster Linie in minderdurchbluteten Darmabschnitten in Erscheinung tritt [132, 168], kann diese nicht als alleinverantwortlich für diesen Vorgang bezeichnet werden. So konnten Fink et al. demonstrieren, dass eine der sepsisbedingten Minderdurchblutung entsprechende mechanisch induzierte mesenteriale Mangelperfusion keine veränderte Darmpermeabilität nach sich zieht [199]. Verantwortlich für die Endotoxin-verursachte Schädigung der Darmbarriere scheint ein Zusammentreffen verschiedener pathogener Faktoren zu sein [177, 198].

Die Anwendung durchblutungsfördernder oder antioxidativ wirkender Medikamente kann die mukosale Perfusion verbessern, wie verschiedene Studien bereits zeigen konnten [198, 200, 201]. In der vorliegenden Untersuchung konnte eine signifikante Reduktion der funktionellen Kapillardichte bei Endotoxin-Verabreichung verglichen mit der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die Gabe von EUK-8 bei Endotoxininfusion wirkte sich hierbei positiv aus, wobei auch in diesem Fall eine geringgradig reduzierte FCD verglichen mit der Kontrolle vorlag. EUK-8 konnte in dieser Untersuchung zwar die kapilläre Perfusion nicht komplett aufrecht erhalten, führte jedoch zu einer deutlich besseren Durchblutung im Endstromgebiet selbst bei vorliegen einer Endotoxinämie. Möglicherweise könnte bei Gabe einer höheren EUK-8-Dosis ein noch besseres Ergebnis erzielt werden.



### **6.3.2 Leukozyten-Endothel-Interaktion**

Unter diesem Begriff ist eine Reaktionskaskade bestehend aus Margination der Leukozyten aus der Blutstrommitte, das mediatorvermittelte Leukozytenrolling und –sticking sowie die Diapedese der weißen Blutzellen zu verstehen [52, 106].

#### **6.3.2.1 Temporär adhärenente Leukozyten**

Bei der Bestimmung der Anzahl der temporär adhärenente Leukozyten konnte in diesem Versuch zwischen den Gruppen kein nachweisbarer Unterschied ermittelt werden.

In noninvasiven intravitalmikroskopischen Untersuchungen an der Haut von Versuchstieren konnte mehrfach eine physiologische temporäre Leukozytenadhärenenz verzeichnet werden [180-182]. Vorteil solcher nicht invasiven Studien ist, dass keine Einflussnahme auf das Leukozytenrolling z. B. durch Gewebetraumatisierung erfolgt. Einzig die durch das Fluoreszenzlicht verursachte Gewebebeeinträchtigung kann in diesem Fall zu einer etwas erhöhten Roller-Zahl beitragen.

Das Leukozytenrolling an sich stellt somit einen physiologischen Prozess dar und beansprucht – je nach untersuchtem Gewebe - bis zu 45% der Gesamtleukozyten. Dies führt zu der Annahme, dass Roller die Bereitschaft zur transendothelialen Leukozytenmigration und somit zur Immunsystemaktivierung kennzeichnen [181, 183, 184]. In der Sepsis kann eine Zunahme des Leukozytenrollings verzeichnet werden [185].

Jegliche Form der Manipulation des untersuchten Gewebes führt also zu einer Erhöhung des Roller-Flow. Da in der Untersuchung eine Laparotomie mit Auslagerung des Darms vorgenommen wurde, muss die hiermit verbundene Beeinträchtigung mit einkalkuliert werden.

Diese konnte von Fiebig et al. sehr gut am Beispiel des Kaninchendarmes dargestellt werden. So zeigten sich 5 Minuten nach Darmauslagerung 8 Roller, während 30 Minuten nach Manipulation bereits 24 Roller registriert werden konnten [186].

Infolge einer Darmauslagerung konnte 20 Minuten nach Präparation in vorangegangenen Studien ein Rolling mit 15-20 Leukozyten pro Minute in den intestinalen Venolen gezeigt werden [108]. In dem hier vorliegenden Versuch wurde im Gegensatz zum von Scalia gewählten Modell bereits 15 Minuten nach Darmauslagerung mit der intravitalmikroskopischen Untersuchung begonnen. Eine Studie, in welcher ebenfalls 15 Minuten post operationem mit der Mikroskopie begonnen wurde, ermittelte dementsprechend einen etwas geringeren Roller-Flow in allen

Untersuchungsgruppen mit durchschnittlich 7 Rollern pro Minute welcher über den gesamten Untersuchungszeitraum konstant blieb [187]. Zu erwähnen ist an dieser Stelle jedoch, dass eine direkte Vergleichbarkeit der vorliegenden Studie mit der Arbeit von Müller nicht gegeben ist, da Müller drei intravitalmikroskopische Untersuchungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der LPS-Infusion durchführt und daher eine wesentlich stärkere Gewebetraumatisierung aufgrund der langen Auslagerungszeit, der eventuell auftretenden Austrocknung und durch das immer wieder auf den untersuchten Darmabschnitt einwirkende Fluoreszenzlicht gegeben ist. Zudem ermittelte Müller den Mittelwert, während in dieser Untersuchung die Angabe von Median und Perzentilen aufgrund der grösseren Aussagekraft gewählt wurde. Zwar blieb in der genannten Studie die Anzahl der Roller über den Versuchszeitraum konstant, dies widerspricht aber den Untersuchungen von Schmidt, denen zufolge nach Endotoxinverabreichung eine Abnahme der Rollerzahl zugunsten der Sticker erfolgt [188]. Andere Autoren hingegen konnten eine Zunahme des Roller-Flows in den intestinalen Venolen verzeichnen [63, 171].

Durch die einmalige Intravitalmikroskopie konnte das Risiko einer zusätzlichen Traumatisierung des Untersuchungsgewebes vermindert und durch die Wahl des Mikroskopiezeitpunktes eine Stunde nach Start der LPS-Infusion dennoch die Ermittlung einer Rollerzahl mit hoher Aussagekraft ermöglicht werden. Die Werte in der Kontrollgruppe lagen hierbei bei 2 Rollern/Minute. Eine Erklärung für die relativ geringe Anzahl an Rollern könnte in der Ruhezeit zwischen Beginn des Versuches und der Probelaparotomie sowie dem Zeitpunkt der mikroskopischen Untersuchung liegen.

In einer vorangegangenen Studie nahm die Anzahl der Roller nach Applikation des nichtsteroidalen Antiphlogistikums Indomethacin zu [189]. Dieser Vorgang konnte durch Metronidazol – ein Antibiotikum mit immunmodulatorischem Effekt – aufgehoben werden [190]. In dieser Untersuchung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontroll-, der EUK-8- und der Endotoxin-EUK-8-Gruppe festgestellt werden. In der Endotoxingruppe hingegen zeigte sich eine deutlich höhere Roller-Zahl (7/Minute). Zwar war diese nicht signifikant, es konnte jedoch gezeigt werden, dass der Einsatz von EUK-8 selbst bei Vorliegen einer Sepsis einer Zunahme des Rollerflow entgegenwirkt.

### 6.3.2.2 Fest adhärenente Leukozyten

In der hier vorliegenden Studie unterschied sich die Endotoxingruppe bezüglich der fest adhärenenten Leukozyten nachweisbar von der Kontrollgruppe, der Euk-8-Gruppe und der Endotoxin-Euk-8-Gruppe.

Das Beobachten fest adhärenenter Leukozyten ist unter physiologischen Bedingungen normalerweise nicht möglich [182]. Einige Untersuchungen belegen hingegen das Auftreten einzelner fest adhärenenter Leukozyten am mesenterialen Endothel von Katzen und Ratten, wobei das Ausmaß der Leukozytenadhärenz bei der Ratte bei 2-6 Stickern liegt [43, 72, 191]. Im Zuge einer Endotoxinämie konnte 60 Minuten nach Induktion derselben ein Sticking mit 12 Leukozyten/ 4000 $\mu\text{m}^2$  Venolenfläche ermittelt werden [192]. Diese Werte stimmen sehr gut mit den erhobenen Daten in dieser Untersuchung überein. In der Kontrollgruppe konnten ebenfalls 6 Sticker/ $\text{mm}^2$  und in der Endotoxin-Gruppe im Median 13 Sticker/ $\text{mm}^2$  registriert werden.

Eine Zunahme des Sticking konnte nach Verabreichung einer Endotoxininfusion bzw. eines Endotoxinbolus, so auch in dieser Studie, mehrfach dargestellt werden [191]. Der Einsatz anti-inflammatorisch agierender Substanzen kann nachgewiesener Maßen zu einer Verminderung der Stickerzahl führen [194].

Schmidt et al. aber auch Müller demonstrierten in ihren Untersuchungen eindrucksvoll das Auftreten einer geringeren Zahl fest adhärenenter Leukozyten bei Einsatz antioxidativ wirkender Substanzen [187, 193]. Auch der Einsatz von EUK-8 führt zu einer deutlichen Verminderung des Sticking selbst im Falle einer Endotoxin-Applikation (4 Sticker/ $\text{mm}^2$ ). Die Anzahl der fest adhärenenten Leukozyten bei den Tieren der EUK-8-Gruppe lag mit 2 Stickern/ $\text{mm}^2$  unter dem ermittelten Wert für die Kontrollgruppe. Dies lässt sich damit erklären, dass bei der Untersuchung eine versuchs- und operationsbedingte Gewebeschädigung erfolgt. Die hierbei ausgeschütteten Entzündungsmediatoren führen auch bei der Kontrollgruppe zu einer höheren Anzahl an fest adhärenenten Leukozyten als dies unter physiologischen Bedingungen der Fall wäre. EUK-8 nimmt Einfluss auf dieses Geschehen. Ob EUK-8 direkt einen Effekt auf die Entstehung der Zytokine hat oder nur deren Wirkung auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion beeinträchtigt, bleibt zu klären. Sinnvoll wäre es daher, in einer ähnlich angelegten Studie die Konzentration der Zytokine zu bestimmen.

## ***6.4 Diskussion der Ergebnisse der Laboruntersuchungen***

Der „Nachweis“ für oxidativen Stress, wie er im septischen Prozess auftritt, ist nicht durch die Auswertung eines einzigen Parameters möglich. Vielmehr gewährt nur ein Puzzle aus vielen, den oxidativen Status beschreibenden Werten einen Einblick in dieses komplexe Geschehen [202].

Es zeigte sich bei den Laboruntersuchungen kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Nicht geklärt wurde in der vorliegenden Arbeit, ob ein im Labor erfassbarer signifikanter Unterschied bei Einsatz von EUK-8 erst nach einer längeren Untersuchungszeit feststellbar ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass dieser Wirkstoff andere Laborparameter, wie Interleukine oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , stärker beeinflusst.

### **6.4.1 Leukozytenzahl**

In dieser Untersuchung kam es zu einer tendenziellen Verminderung der Anzahl der Leukozyten im zweistündigen Untersuchungszeitraum in der Endotoxin und der Endotoxin-EUK-8-Gruppe. Hierbei ergab sich allerdings kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Im Zuge der Sepsis tritt im Anschluss an eine anfängliche Leukozytopenie ( $<4000/\text{ml}$ ), infolge der Leukozytenadhärenz in der Peripherie, eine Leukozytose ( $>12000/\text{ml}$ ) durch Rekrutierung weißer Blutzellen aus den Leukozytenpools in Erscheinung. Hierbei stehen die zirkulierenden Leukozyten im Gleichgewicht mit der Leukozytenbildung und der Leukozytenadhärenz [16, 52].

In vorangegangenen Studien konnte bereits eine Korrelation zwischen Abnahme der Anzahl der Leukozytenzahl pro ml Blut und der Zunahme der Leukozytenadhärenz festgestellt werden. Auch in dieser Versuchsreihe sank bei Zunahme der Stickeranzahl die Leukozytenzahl im peripheren Blut ab [203, 204].

Neben den Medikamenteneffekten hatte auch die Traumatisierung infolge des chirurgischen Eingriffes und der damit verbundenen Immunreaktion einen Einfluss auf die Leukozytenzahl. Zeigt sich hierbei zwar zunächst ein Anstieg der Leukozytenzahl aufgrund der Entleerung der Leukozytenpools, so wird die Anzahl der weißen Blutzellen durch Migration der Leukozyten ins Gewebe und Erschöpfung der Reservoirs normalisiert.

## 6.4.2 Malondialdehyd

In allen Gruppen bis auf die Endotoxingruppe zeigte sich im zweistündigen Versuchszeitraum ein Trend zu einem Anstieg der MDA-Konzentration. Der in der ANCOVA zunächst festgestellte signifikante Unterschied zwischen Endotoxin- und Kontrollgruppe konnte mit dem Post-Hoc-Test nicht bestätigt werden.

In verschiedenen Studien wurde bereits die Veränderung des Malondialdehydspiegels im Bezug auf die Sepsis untersucht und auch darüber hinaus als wichtigster Marker für oxidativen Stress in kritisch erkrankten Patienten identifiziert [78, 205]. Goode et al. kamen zu dem Schluss, dass ein septischer Prozess infolge der Lipidperoxidation einen Malondialdehyd-Anstieg nach sich zieht [76], wobei laut Falconer et al. der generelle Anstieg der Konzentration der mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Blut unter septischen Bedingungen durch Erhöhung der Substratmenge ebenfalls eine Rolle spielt [206].

Zwar spielt die Interaktion aus bakterieller Infektion und der Reaktion des Wirtes hierauf eine entscheidende Rolle auf die Entstehung von MDA [207], Giamarellos-Bourboulis et al. konnten aber zeigen, dass allein das Vorhandensein bakterieller Antigene die Lipidperoxidation vorantreibt [208].

Entscheidend für die Bestimmung von Malondialdehyd ist der Ort der Blutentnahme. So konnte in Studien gezeigt werden, dass nach Verabreichung einer Infusion mit Gamma-Linolensäure und Induktion einer Sepsis mittels *Pseudomonas aeruginosa* der Anstieg von MDA bei Entnahme der Blutprobe aus der Lebervene nach 30 Minuten und bei Entnahme von Blut aus der Arteria carotis erst nach 60 Minuten nachgewiesen werden konnte [208]. Daher erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Blutprobenentnahme zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden aus der Halsschlagader.

Nachteil der Untersuchung der MDA-Konzentration sind die Testbedingungen (niedriger pH-Wert, hohe Temperaturen) unter welchen diese bestimmt wird, da hierbei eine weitere Lipidperoxidation auftreten kann [177, 198]. Die somit entstehenden geringen Abweichungen sind allerdings vernachlässigbar, da durch genormte Versuchsdurchführung die Differenzen in der gegebenenfalls auftretenden nachweisbedingten MDA-Erhöhung innerhalb eines Versuches gering gehalten werden können.

Bereits bei früheren Versuchen konnte eine Verminderung des Malondialdehyd-Spiegels bei Einsatz antioxidativer Substanzen im Rahmen einer Sepsis gezeigt werden [177, 198, 209, 210]. Auch bei einer Erhöhung der Aufnahme antioxidativer Substanzen aus der Nahrung infolge einer

speziellen Vitamin C/E- und Polyphenol-reichen Diät konnte eine geringere Konzentration an MDA nach LPS-Applikation im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden [211].

Wie bereits vorab erwähnt, konnte mit Ausnahme der Endotoxin-Gruppe in allen Versuchsgruppen ein Trend zu einer Erhöhung des MDA-Spiegels festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass in der Endotoxingruppe die Lipidperoxidation zugunsten anderer Peroxidationsprodukte verschoben sein könnte. Der Einsatz von EUK-8 hatte keinen positiven Einfluss auf die Entstehung von MDA. Vermutlich ist dieses Phänomen auf die Schwankungen der Messwerte über den Untersuchungszeitraum zurückzuführen. Bei Konstanthalten der Zeitpunkte konnte daher ein statistisch relevanter Unterschied zwischen den Gruppen nicht ermittelt werden.

### **6.4.3 oxidierte low-density-Lipoproteine (oxLDL)**

Der Einsatz von EUK-8 in dieser Untersuchung führte im Vergleich mit der Kontrollgruppe zu einer geringgradigen Verminderung der Lipidperoxidation, erbrachte jedoch keine signifikante Verbesserung. Der Spiegel an oxLDL war in der Endotoxin-Euk8-Gruppe sogar tendenziell höher als in den anderen Gruppen.

Wagner konnte eine Steigerung der Apoptoserate humaner Makrophagen bei oxLDL-Exposition nachweisen. Dies legt nahe, dass diese Substanz unter anderem mit verantwortlich für das Absinken der Anzahl weißer Blutzellen im septischen Prozess ist, wobei die Schaumzellbildung durch Bindung der oxidierten LDLs an Makrophagen ebenfalls eine Rolle spielt und die Leukozytenmargination fördert [212]. In Verbindung mit einem septischen Geschehen kann eine Leukozytopenie mit weniger als 4000 weißen Blutzellen pro ml Blut in Erscheinung treten. In früheren Studien konnte bereits der positive Einfluss antioxidativer Maßnahmen – wie der Verabreichung von Vitamin E bzw. Vitamin C - auf die oxLDL-Aktivität und somit die Entzündungsreaktion beschrieben werden [213, 214]. Dem widerspricht die Untersuchung von Gaut et al. in welcher durch Vitamin C eine Lipidperoxidation nicht verhindert werden konnte [215]. Auch in einer anderen Studie konnte für die Langzeitverabreichung von Vitamin C und E kein Effekt auf die Bildung von oxidierten low-density-Lipoproteinen festgestellt werden [216].

Der Einsatz des antioxidativ wirkenden Acetylcysteins hingegen hatte eine Verminderung der oxLDL im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Folge [84]. In Verbindung mit den Ergebnissen der anderen Laboruntersuchungen, liegt die Vermutung nahe, dass EUK-8 keinen Einfluss auf die

Lipidperoxidation nimmt. Der starke Anstieg der oxLDL bei der 3. Blutentnahme kann durch den Operationsvorgang und das somit entstehende Trauma erklärt werden, da der Anstieg der oxLDL im Versuch erst nach Durchführung der Laparotomie in Erscheinung trat.

#### **6.4.4 Advanced oxidation protein products (AOPP)**

In allen Gruppen konnte bei der Messung 2 Stunden nach Beginn der Medikamentenapplikation bzw. 1 Stunde nach Probelaparotomie ein Trend zu einem Anstieg der AOPP nachgewiesen werden. Ein statistisch relevanter Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht ermittelt werden.

Die Bestimmung der advanced oxidation protein products konnte ab 1996 als Kontrollkriterium für die Überprüfung von septischen und chronisch kranken Patienten im Hinblick auf den oxidativen Stress etabliert werden [90, 217, 218]. Entscheidend für die Bedeutung der AOPP ist, dass sie zu einer Zunahme der endothelialen Dysfunktion führen und sich auf die Leukozytenfunktion auswirken [92]. Um vergleichbare Ergebnisse der AOPP zu erhalten, musste das Gewicht der Versuchstiere  $210 \pm 50\text{g}$  betragen, da Übergewicht beispielsweise zu einem erhöhten AOPP-Level führt [219]. Veränderungen der AOPP kommen allerdings nicht nur im Falle einer Entzündung oder Sepsis zu Stande, sondern treten auch bei chronisch nierenkranken Patienten in Erscheinung [220]. Dies machte die Auswahl junger, klinisch gesunder Versuchstiere notwendig. Darüber hinaus konnten Kayali et al. zeigen, dass männliche Ratten aufgrund einer etwas höheren Serumproteinkonzentration höhere AOPP-Level zeigen [221]. In Versuchen mit beiden Geschlechtern könnte es zu einer schlechteren Vergleichbarkeit der AOPP kommen. Im vorliegenden Versuch wurden unter anderem aus diesem Grund ausschliesslich männliche Wistar-Ratten untersucht. Dennoch stellen die AOPP einen wichtigen Marker für oxidativen Stress dar, der sich durch die Verabreichung von antioxidative Substanzen im Sinne einer Abnahme der AOPP im Blut beeinflussen lässt [222-225].

Der Anstieg der AOPP in dieser Studie ist mit dem im Rahmen der Narkose bzw. der Operation entstehenden oxidativen Stress zu begründen. Auch wenn zunächst in der ANCOVA ein signifikanter Unterschied zwischen EUK-8- und Kontrollgruppe gezeigt werden konnte, konnte dieser mit dem Post-Hoc-Test nicht nachvollzogen werden. Hierfür sind die Schwankungen der Werte in den Gruppen über den Untersuchungszeitraum verantwortlich. Ein Einfluss von EUK-8 auf die Proteinoxidation bestand also nicht.

#### **6.4.5 Kontrolle zur Peroxid-Bestimmung**

In dieser Untersuchung zeigte sich ein Trend zu einer Verminderung des Lipidperoxid-Spiegels im Verlauf der Untersuchung in allen Gruppen. Zwischen den Gruppen fanden sich jedoch nur zufällige Unterschiede. Vorteil der Peroxidbestimmung ist, dass nicht nur die oxidierten low density Lipoproteinen sondern alle Lipidperoxide erfasst werden. Somit ist eine Quantifizierung des oxidativen Stresses möglich.

Da es zu einer Abnahme der Lipidperoxidation bei Propofol-Gabe aufgrund der immunmodulatorischen Wirkung dieser Substanz kommt [176, 226], wurde in dieser Studie Pentobarbital für die Narkose verwendet, welches die Lipidperoxidation nicht beeinflusst [173].

In diversen Studien konnte eine Zunahme der Lipidperoxide im Gewebe nach Ischämie dargestellt werden [128, 227, 228]. In Verbindung mit oxidativem Stress, insbesondere bei Vorliegen einer Endotoxinämie, ist ein Anstieg der Lipidperoxide im Blut zu erwarten [229]. Yerer et al. konnten nachweisen, dass die Lipidperoxidation durch Einsatz von Antioxidativa reduziert werden kann [230].

Für die Reduktion der Peroxid-Konzentration in diesem Versuch kann eine Verschiebung der Peroxidationsreaktion beispielsweise zugunsten der AOPP in Betracht kommen. Ein Fehler bei der labordiagnostischen Untersuchung erscheint unwahrscheinlich.



#### **6.4.6 Antioxidative Kapazität**

In diesem Versuch konnte in allen Gruppen ein Abfall der antioxidativen Kapazität verzeichnet werden. Durch den Einsatz von EUK-8 bei Endotoxininfusion konnte ein nicht signifikant verminderter Abfall der antioxidativen Kapazität im Vergleich zur Endotoxin-Gruppe erzielt werden.

Die antioxidative Kapazität spiegelt die Gesamtheit aller antioxidativ verfügbaren Substanzen im Blut – also Enzyme (unter anderem SOD, Katalase), antioxidativ wirkende Vitamine (z. B. Vitamin E, Vitamin C) und antioxidativ agierende Medikamente (wie EUK-8, Acetylcystein) - wider. Während im Bezug auf das Meningiom eine direkte Korrelation zwischen oxidativer DNA-Schädigung und der antioxidativen Kapazität festgestellt werden kann [231], tritt im Zuge einer Sepsis zunächst eine Abnahme der antioxidativen Kapazität in Erscheinung, wobei die Höhe der antioxidativen Kapazität mit dem Schweregrad des septischen Krankheitsbildes korreliert [232]. Die antioxidative Kapazität steigt im septischen Schock dann bis über die Höhe der Werte gesunder Kontrollen hinaus an [233]. Der Parameter antioxidative Kapazität ist aufgrund seiner Schwankungsbreite im Hinblick auf ein septisches Geschehen daher nur in Verbindung mit weiteren Werten, wie oxLDL, MDA und AOPP aussagekräftig, um den Schweregrad der Erkrankung zu verifizieren [202]. In einer Ischämie-Studie konnte darüber hinaus festgestellt werden, dass eine Zunahme der antioxidativen Kapazität bei Mangelperfusion nicht ausreichend die Lipidperoxidation vermindern kann [234]. Durch Verbesserung des antioxidativen Status nach Verabreichung von Selen konnte eine Senkung der Mortalitätsrate in septischen Patienten festgestellt werden [235].

Interessant wäre, wie sich die antioxidative Kapazität über einen längeren Untersuchungszeitraum verhält. Möglicherweise würde sich ein deutlicherer Unterschied zwischen der Endotoxin- und der Endotoxin-EUK-8-Gruppe zeigen.

## ***6.5 Diskussion der Hämodynamik***

Entscheidend bei der Bewertung des Ausmaßes der Leukozytenadhärenz ist die Abgrenzung von hämodynamischen Prozessen, die den Gesamtorganismus betreffen wie beispielsweise die Hypotension [236].

So hat der arterielle Blutdruck über seinen Einfluss auf die Scherkräfte eine direkte Wirkung auf das Rolling und Sticking [237]. Jedoch wurde in dieser Studie durch Volumensubstitution weitestgehend ein normotensiver Zustand erreicht. Da es aber neben einer Aktivierung der Leukozyten ebenso zu einer Thrombozytenaggregation und einer damit verbundenen DIC (Disseminierte Intravasale Coagulopathie) kommen kann [238], ist auch hier in wenigen Fällen ein Blutdruckabfall feststellbar.

### **6.5.1 Mittlerer arterieller Blutdruck**

Der MAP zeigte in allen Gruppen im Lauf der Untersuchung geringgradige Schwankungen. Zwischen den Gruppen fand sich in dieser Studie kein signifikanter Unterschied. Das Zustandekommen eines Blutdruckabfalls bei Vorliegen einer Sepsis kann folgendermaßen erklärt werden.

Durch die sepsisbedingte Ausschüttung von TNF- $\alpha$  oder IL-1 tritt eine Vasodilatation in Erscheinung. Dem somit eintretenden Blutdruckabfall wird durch Vasokonstriktiva, wie dem Noradrenalin, in anderen Endstrombahngebieten entgegen gewirkt. Allerdings reicht die endogene vasokonstriktive Kapazität nicht aus, wodurch es trotz dieser regulatorischen Maßnahmen zu einem Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) kommt [239, 240]. Zusätzlich ist in septischen Patienten die Fähigkeit zur Vasokonstriktion vermindert, wobei eine eingeschränkte Ansprechbarkeit bei Gabe von Norepinephrin und Arginin-Vasopressin besteht [241]. Daraus ergibt sich im septischen Schock die Notwendigkeit einer Therapie mit vasokonstriktiven Substanzen [137]. Ein anderer Ansatz ist die Inhibition von NO – einem endogenen Vasodilatator [242].

Bezüglich des Einflusses von Antioxidativa auf die Hämodynamik septischer Patienten kommen bisherige Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während McKechnie et al. sowie Müller keinen Effekt auf die Hypotension feststellen konnten, zeigte ein Versuch mit Tirilazad Mesylat einen positiven Einfluss [187, 243, 244]. Für EUK-8 konnten Barandier et al. bereits einen

vasodilatatorischen Effekt infolge einer Hemmung der Adenylatcyclase und der löslichen Guanylatcyclase aufzeigen [245].

Entscheidend für die Auswertung der intravitalmikroskopischen Untersuchung ist, dass sich die Makrohämodynamik zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen gleich gestaltete, was eine Vergleichbarkeit der Resultate der Leukozyten-Endothel-Interaktion ermöglicht. Zwischen den Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was einen Vergleich der Ergebnisse der Intravitalmikroskopie ermöglicht.

### **6.5.2 Herzfrequenz**

Zwar konnte in dieser Untersuchung ebenfalls ein Herzfrequenzanstieg nach LPS-Gabe festgestellt werden, eine Veränderung bei Einsatz von EUK-8 konnte jedoch im Vergleich zur Endotoxin-Gruppe nicht festgestellt werden.

Ein weiteres Sepsismerkmal ist die Zunahme der Herzfrequenz auf über 90 Herzschläge/ Minute [7]. Daher dient bei der Durchführung von Versuchen mit Sepsisinduktion durch Verabreichung von LPS der Herzfrequenzanstieg neben dem Blutdruckabfall der Effektivitätsprüfung [187].

In früheren Studien konnte bei Applikation einer mittleren Endotoxindosis eine Erhöhung der Herzfrequenz mit Eintritt in eine hyperdynamische Kreislaufsituation festgestellt werden [16, 168]. Zu beachten ist allerdings, dass bei Gabe grösserer LPS-Dosen (bis zu 40mg/kg) ein Übergang in ein hypodynames Kreislaufstadium erfolgt.

Das Ergebnis dieser Studie stimmt mit den Resultaten früherer Experimente überein, in denen Antioxidativa ebenfalls keinen Einfluss auf die Herzfrequenz hatten. Andererseits macht aber genau dieser Gesichtspunkt die Beobachtung der Herzfrequenz zu einem essentiellen Bestandteil der Versuchsdurchführung da nur hiermit der Erfolg einer Sepsisinduktion überprüft werden kann.

### **6.5.3 Atemfrequenz**

Der Anreicherung saurer Metaboliten durch Störungen der pulmonalen Perfusion und somit des Gasaustausches wird durch vermehrte respiratorische Aktivität entgegen gewirkt, wobei das im Rahmen der metabolischen Azidose entstandene Laktat über eine Verstoffwechslung zu Kohlendioxid abgeatmet wird. Für den nachweisbaren Unterschied zum Zeitpunkt 2 Stunden nach Beginn der Endotoxininfusion zwischen Endotoxin-EUK-8-Gruppe und Kontrollgruppe könnte das Vorliegen der Sepsis die Ursache sein. Hinzu kommt möglicherweise auch eine zusätzliche statistisch nicht relevante Erhöhung der Atemfrequenz infolge eines Medikamenteneffektes des EUK-8 im Vergleich zur Endotoxingruppe.

## 7 Zusammenfassung

Trotz der medizinischen Fortschritte der letzten Jahre liegt die Prävalenz der schweren Sepsis bei 11% und stellt die dritthäufigste Todesursache dar. Jährlich sterben in Deutschland 60000 Menschen aufgrund einer Sepsis und auf Intensivstationen steht die durch diese Erkrankung bedingte Mortalität an erster Stelle. Als ursächlich für die Entwicklung einer Sepsis beziehungsweise eines Multiple Organ Dysfunction Syndrom (MODS) werden Alterationen im Bereich der Mikrozirkulation angesehen.

Eine entscheidende Rolle in diesem Prozess spielen die Leukozyten, welche unter anderem durch Freisetzung von Sauerstoffradikalen zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion beitragen und diese zusätzlich agravierern. Daher wird in der Antagonisierung der schädigenden Mediatoren, wie zum Beispiel reaktiven Sauerstoffspezies, ein Behandlungsansatz zur adjunktiven Sepsis-Therapie gesehen.

EUK-8 - ein antioxidativ wirkendes SOD/Katalase-Mimetikum, welches der oxidativen Schädigung von Organen entgegenwirkt, hat bereits in mehreren Studien positive Effekte auf die Mikrozirkulation und die Inflammationsreaktion gezeigt.

Die Beeinflussung der mesenterialen Mikrozirkulation, insbesondere der funktionellen Kapillardichte und der Leukozyten-Endothel-Interaktion, standen im Mittelpunkt dieser Arbeit. Ziel dieser tierexperimentellen Untersuchung war es, dieses Antioxidants hinsichtlich seiner Wirksamkeit bei Vorliegen einer Sepsis tierexperimentell zu untersuchen.

Die Untersuchung mikrozirkulatorischer Störungen ist unter klinischen Bedingungen nur beschränkt möglich, daher wählten wir mit Genehmigung der zuständigen Tierschutzkommission ein Tiermodell an der Ratte. Mit Hilfe dieses Modelles wurde der Effekt der Gabe von EUK-8 auf die mesenteriale Mikrozirkulation, auf die systemische Entstehung von Produkten einer Oxidationsreaktion (MDA, oxLDL, AOPP, Kontrollen zur Peroxidbestimmung), die antioxidative Kapazität und auf paraklinische Parameter, wie die Leukozytenzahl, unter einer Lipopolysaccharidbelastung von 10 mg/kg Körpergewicht untersucht. Die Beurteilung der mesenterialen Mikrozirkulation erfolgte mittels Intravitalmikroskopie. Hierbei wurde das Ausmaß der Leukozytenadhärenz am Endothel der mesenterialen Venolen als Maß für die

Leukozytenaktivierung und die funktionelle Kapillardichte als Parameter für die Endothelperfusion bestimmt.

In der intravitalmikroskopischen Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass nach einer Stunde Endotoxinämie die LPS-bedingte Abnahme der funktionellen Kapillardichte in den mesenterialen Venolen durch die Verabreichung von EUK-8 signifikant beeinflusst werden konnte. Es zeigten sich signifikante Unterschiede beim Vergleich zwischen Kontroll- und Endotoxingruppe sowie zwischen der Endotoxin- und der EUK-8-Gruppe. Ebenso kam es zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl der fest adhärenen Leukozyten an mesenterialen Venolen der Ratte in der Endotoxin-EUK-8-Gruppe im Vergleich zur Endotoxin-Gruppe. Die temporäre Leukozytenadhärenz wurde durch die EUK-8-Gabe nicht statistisch charakteristisch beeinflusst.

Durch den Einsatz von EUK-8 konnten die Parameter MDA, oxLDL und AOPP sowie die Kontrollen zur Peroxidbestimmung nicht signifikant beeinflusst werden. Auch bezüglich der antioxidativen Kapazität und der endotoxinbedingte Leukopenie konnte kein statistisch charakteristischer positiver Effekt nachgewiesen werden.

Der nachgewiesene Effekt von EUK-8 auf die funktionelle Kapillardichte und die feste Leukozytenadhärenz unterstützt die Hypothese, dass leukozytenunabhängige Mechanismen für diesen Vorgang existieren. Gleichzeitig konnte der intravitalmikroskopisch evaluierte Effekt von EUK-8 durch die Bestimmung der gewählten labordiagnostischen Parameter in dieser Versuchsanordnung nicht nachvollzogen werden. Für den klinischen Einsatz von EUK-8 ist ein aussagekräftiger Laborparameter als Kontrolle über den Behandlungserfolg jedoch unerlässlich. Daher sollten sich weiterführende Untersuchungen mit anderen Entzündungsmarkern, wie beispielsweise den Interleukinen, befassen. Andere Studien könnten die bereits evaluierten Parameter über einen längeren Zeitraum erfassen, da nach längerer Untersuchungsdauer möglicherweise noch ein signifikanter Unterschied in Erscheinung treten könnte.

## **8 Summary**

### **Impact of EUK-8 Administration on the Functional Capillary Density and Leukocyte Adherence in Experimental Endotoxemia**

The prevalence of severe sepsis remains by 11 % despite all the medical improvements in recent years. Each year 60000 people die in Germany due to sepsis and in intensive care units it is the main cause for mortality. Alterations within the microcirculation are believed to be causative for the development of sepsis or Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS).

Leukocytes have a decisive role in this process, causing amongst other the release of oxygen radicals, which facilitate endothelial dysfunction and furthermore aggravate this process.

Therefore antagonising harmful mediators such as reactive oxygen radicals is seen as a possible starting point of treatment in adjunctive sepsis therapy.

In several studies EUK- 8, an antioxidative superoxide dismutase/catalase – mimetic, which counters the oxidative damaging of organs, has been shown to have positive effects on the microcirculation and the inflammatory response.

The main focus of this study was on influencing the mesenterial microcirculation, especially of functional capillary density and the leukocyte-endothelial interactions. Aim of this experimental animal study was to investigate the efficiency of the antioxidant EUK-8 in the presence of sepsis.

Investigations on microcirculatory disturbances in a clinical setting are only possible in a limited fashion. Therefore we chose an animal model in the rat with the approval of the animal ethics committee. The effect of giving EUK-8 on the mesenterial microcirculation, on the systemic synthesis of products of oxidative reactions (MDA, oxLDL, AOPP, controls for peroxide evaluation), the antioxidative capacity and on paraclinical parameter such as the number of leukocytes was investigated under a lipopolysaccharid load of 10mg/kg body weight. Mesenterial microcirculation was evaluated using intravital microscopy. The amount of leukocyte adherence to the endothelium of the mesenterial venules was used as a measurement for leukocyte activation. Functional capillary density was used as a parameter for the endothelial perfusion.

Intravital microscopy investigations showed that after an hour of endotoxemia the LPS caused reduction of functional capillary density of the mesenterial venules could be influenced significantly by application of EUK-8. Significant differences were revealed in comparisons of control and endotoxin groups as well as between endotoxin and EUK-8 groups. A significant reduction of the number of sticky adherent leukocytes on mesenterial venules of the rat in the endotoxin-EUK 8 group in comparison to the endotoxin group was also noted. Rolling leukocyte adherence was not significantly influenced by EUK-8 application.

No significant effects on the parameters MDA, oxLDL and AOPP as well as controls for peroxide evaluation were induced by usage of EUK-8. Similarly endotoxin induced leukopenia and antioxidative capacity were not influenced significantly.

The proven effect of EUK-8 on the functional capillary density and on the sticky leukocyte adherence supports the hypothesis that leukocyte independent mechanisms exist for this procedure. The effects of EUK-8 observed by intravital microscopy could not be confirmed by the chosen laboratory parameters of the experiment.

For clinical usage an indicative laboratory parameter as a control for successful treatment is a necessity. Therefore continuing investigations with other inflammatory markers, such as interleukines ought to be conducted. Other studies could investigate the already evaluated parameters over a longer period of time, as significant differences could occur after a longer period of examination.



## 9 Literatur

- [1] K. Reinhart, F. Brunkhorst, H. Bone, H. Gerlach, M. Grundling, G. Kreymann, P. Kujath, G. Marggraf, K. Mayer, A. Meier-Hellmann, C. Peckelsen, C. Putensen, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, and K. Werdan, "Diagnose und Therapie der Sepsis: Leitlinien der Deutschen Sepsisgesellschaft," *Anaesthesist*, vol. 55 Suppl 1, pp. 43-56, 2006.
- [2] C. Engel, F. M. Brunkhorst, H. G. Bone, R. Brunkhorst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gruendling, G. Huhle, U. Jaschinski, S. John, K. Mayer, M. Oppert, D. Olthoff, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, H. Bogatsch, C. Hartog, M. Loeffler, and K. Reinhart, "Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study," *Intensive Care Med*, vol. 33, pp. 606-18, 2007.
- [3] C. Brun-Buisson, F. Doyon, J. Carlet, P. Dellamonica, F. Gouin, A. Lepoutre, J. C. Mercier, G. Offenstadt, and B. Regnier, "Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis," *Jama*, vol. 274, pp. 968-74, 1995.
- [4] J. R. Le Gall, S. Lemeshow, and F. Saulnier, "A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study," *Jama*, vol. 270, pp. 2957-63, 1993.
- [5] H. F. Geerdes, D. Ziegler, H. Lode, M. Hund, A. Loehr, W. Fangmann, and J. Wagner, "Septicemia in 980 patients at a university hospital in Berlin: prospective studies during 4 selected years between 1979 and 1989," *Clin Infect Dis*, vol. 15, pp. 991-1002, 1992.
- [6] R. C. Bone, R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein, and W. J. Sibbald, "Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine," *Chest*, vol. 101, pp. 1644-55, 1992.

- [7] J. Han and H. P. Liang, "Clinical significance of scoring system for systemic inflammatory response syndrome," *Chin J Traumatol*, vol. 9, pp. 316-20, 2006.
- [8] D. C. Angus, D. Burgner, R. Wunderink, J. P. Mira, H. Gerlach, C. J. Wiedermann, and J. L. Vincent, "The PIRO concept: P is for predisposition," *Crit Care*, vol. 7, pp. 248-51, 2003.
- [9] H. Gerlach, J. F. Dhainaut, S. Harbarth, K. Reinhart, J. C. Marshall, and M. Levy, "The PIRO concept: R is for response," *Crit Care*, vol. 7, pp. 256-9, 2003.
- [10] J. L. Vincent, S. Opal, A. Torres, M. Bonten, J. Cohen, and R. Wunderink, "The PIRO concept: I is for infection," *Crit Care*, vol. 7, pp. 252-5, 2003.
- [11] J. L. Vincent, J. Wendon, J. Groeneveld, J. C. Marshall, S. Streat, and J. Carlet, "The PIRO concept: O is for organ dysfunction," *Crit Care*, vol. 7, pp. 260-4, 2003.
- [12] R. Witthaut, K. Werdan, and H. P. Schuster, "[Multiple organ dysfunction syndrome and multiple organ failure. Diagnosis, prognosis and therapeutic concepts]," *Internist (Berl)*, vol. 39, pp. 493-501, 1998.
- [13] H. M. Andresen, H. T. Regueira, and F. Leighton, "[Oxidative stress in critically ill patients]," *Rev Med Chil*, vol. 134, pp. 649-56, 2006.
- [14] K. Werdan, "Pathophysiology of septic shock and multiple organ dysfunction syndrome and various therapeutic approaches with special emphasis on immunoglobulins," *Ther Apher*, vol. 5, pp. 115-22, 2001.
- [15] D. Adam and B. Gerlach, *Antibacterial Treatment of Sepsis. Sepsis - current perspectives in pathophysiology and therapy*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York: Reinhart K, Eyrich K, 1994.
- [16] J. Barroso-Aranda, G. W. Schmid-Schonbein, B. W. Zweifach, and J. C. Mathison, "Polymorphonuclear neutrophil contribution to induced tolerance to bacterial lipopolysaccharide," *Circ Res*, vol. 69, pp. 1196-206, 1991.

- [17] W. C. Marra MN, Griffith JE, Snable JL, Scott RW, "Bactericidal/permeability-increasing protein has endotoxin-neutralizing activity.," *J Immunol* 144, pp. 662-666, 1990.
- [18] S. M. Opal, J. E. Palardy, M. N. Marra, C. J. Fisher, Jr., B. M. McKelligon, and R. W. Scott, "Relative concentrations of endotoxin-binding proteins in body fluids during infection," *Lancet*, vol. 344, pp. 429-31, 1994.
- [19] C. J. de Haas, M. J. Poppelier, K. P. van Kessel, and J. A. van Strijp, "Serum amyloid P component prevents high-density lipoprotein-mediated neutralization of lipopolysaccharide," *Infect Immun*, vol. 68, pp. 4954-60, 2000.
- [20] M. Tanaka, A. F. Gombart, H. P. Koeffler, and M. Shiohara, "Expression of Bactericidal/Permeability-Increasing Protein Requires C/EBP," *Int J Hematol*, vol. 85, pp. 304-11, 2007.
- [21] C. J. Fisher, Jr., M. N. Marra, J. E. Palardy, C. R. Marchbanks, R. W. Scott, and S. M. Opal, "Human neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein reduces mortality rate from endotoxin challenge: a placebo-controlled study," *Crit Care Med*, vol. 22, pp. 553-8, 1994.
- [22] H. Zhou, "[A study on bactericidal/permeability increasing protein (BPI) as a natural inhibitor of endotoxin]," *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, vol. 17, pp. 102-4, 2001.
- [23] M. J. Sweet and D. A. Hume, "Endotoxin signal transduction in macrophages," *J Leukoc Biol*, vol. 60, pp. 8-26, 1996.
- [24] P. R. Mayeux, "Pathobiology of lipopolysaccharide," *J Toxicol Environ Health*, vol. 51, pp. 415-35, 1997.
- [25] C. Alexander and E. T. Rietschel, "Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity," *J Endotoxin Res*, vol. 7, pp. 167-202, 2001.
- [26] R. R. Schumann, S. R. Leong, G. W. Flaggs, P. W. Gray, S. D. Wright, J. C. Mathison, P. S. Tobias, and R. J. Ulevitch, "Structure and function of lipopolysaccharide binding protein," *Science*, vol. 249, pp. 1429-31, 1990.

- [27] T. R. Martin, J. C. Mathison, P. S. Tobias, D. J. Leturcq, A. M. Moriarty, R. J. Maunder, and R. J. Ulevitch, "Lipopolysaccharide binding protein enhances the responsiveness of alveolar macrophages to bacterial lipopolysaccharide. Implications for cytokine production in normal and injured lungs," *J Clin Invest*, vol. 90, pp. 2209-19, 1992.
- [28] P. W. Gray, A. E. Corcorran, R. L. Eddy, Jr., M. G. Byers, and T. B. Shows, "The genes for the lipopolysaccharide binding protein (LBP) and the bactericidal permeability increasing protein (BPI) are encoded in the same region of human chromosome 20," *Genomics*, vol. 15, pp. 188-90, 1993.
- [29] C. J. Kirschning, H. Wesche, T. Merrill Ayres, and M. Rothe, "Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide," *J Exp Med*, vol. 188, pp. 2091-7, 1998.
- [30] M. G. Netea, C. A. Van Der Graaf, A. G. Vonk, I. Verschueren, J. W. Van Der Meer, and B. J. Kullberg, "The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis," *J Infect Dis*, vol. 185, pp. 1483-9, 2002.
- [31] B. Beutler and A. Poltorak, "Sepsis and evolution of the innate immune response," *Crit Care Med*, vol. 29, pp. S2-6; discussion S6-7, 2001.
- [32] U. N. Das, "Critical advances in septicemia and septic shock," *Crit Care*, vol. 4, pp. 290-6, 2000.
- [33] T. J. Murphy, H. M. Paterson, J. A. Mannick, and J. A. Lederer, "Injury, sepsis, and the regulation of Toll-like receptor responses," *J Leukoc Biol*, vol. 75, pp. 400-7, 2004.
- [34] A. Dunne and L. A. O'Neill, "The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense," *Sci STKE*, vol. 2003, pp. re3, 2003.
- [35] S. Akira, "Mammalian Toll-like receptors," *Curr Opin Immunol*, vol. 15, pp. 5-11, 2003.
- [36] S. Akira, K. Takeda, and T. Kaisho, "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity," *Nat Immunol*, vol. 2, pp. 675-80, 2001.

- [37] R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, and C. A. Janeway, Jr., "A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity," *Nature*, vol. 388, pp. 394-7, 1997.
- [38] D. Aderka, P. Sorkine, S. Abu-Abid, D. Lev, A. Setton, A. P. Cope, D. Wallach, and J. Klausner, "Shedding kinetics of soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors after systemic TNF leaking during isolated limb perfusion. Relevance to the pathophysiology of septic shock," *J Clin Invest*, vol. 101, pp. 650-9, 1998.
- [39] E. A. Frey, D. S. Miller, T. G. Jahr, A. Sundan, V. Bazil, T. Espevik, B. B. Finlay, and S. D. Wright, "Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide," *J Exp Med*, vol. 176, pp. 1665-71, 1992.
- [40] M. J. Fenton and D. T. Golenbock, "LPS-binding proteins and receptors," *J Leukoc Biol*, vol. 64, pp. 25-32, 1998.
- [41] S. Vogel, M. J. Hirschfeld, and P. Y. Perera, "Signal integration in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated murine macrophages," *J Endotoxin Res*, vol. 7, pp. 237-41, 2001.
- [42] J. M. Schuster and P. S. Nelson, "Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease," *J Leukoc Biol*, vol. 67, pp. 767-73, 2000.
- [43] H. Arndt, K. D. Palitzsch, D. C. Anderson, J. Rusche, M. B. Grisham, and D. N. Granger, "Leucocyte-endothelial cell adhesion in a model of intestinal inflammation," *Gut*, vol. 37, pp. 374-9, 1995.
- [44] R. Y. Hampton, D. T. Golenbock, M. Penman, M. Krieger, and C. R. Raetz, "Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors," *Nature*, vol. 352, pp. 342-4, 1991.
- [45] S. Gordon, "Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response," *Cell*, vol. 111, pp. 927-30, 2002.
- [46] W. J. Kox, T. Volk, S. N. Kox, and H. D. Volk, "Immunomodulatory therapies in sepsis," *Intensive Care Med*, vol. 26 Suppl 1, pp. S124-8, 2000.

- [47] T. S. Blackwell and J. W. Christman, "Sepsis and cytokines: current status," *Br J Anaesth*, vol. 77, pp. 110-7, 1996.
- [48] Y. Fong and S. F. Lowry, "Tumor necrosis factor in the pathophysiology of infection and sepsis," *Clin Immunol Immunopathol*, vol. 55, pp. 157-70, 1990.
- [49] B. Beutler and G. E. Grau, "Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases," *Crit Care Med*, vol. 21, pp. S423-35, 1993.
- [50] J. C. Alves-Filho, C. Benjamim, B. M. Tavares-Murta, and F. Q. Cunha, "Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome," *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 100 Suppl 1, pp. 223-6, 2005.
- [51] C. Galanos and M. A. Freudenberg, "Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity," *Immunobiology*, vol. 187, pp. 346-56, 1993.
- [52] G. Opdenakker, "New insights in the regulation of leukocytosis and the role played by leukocytes in septic shock," *Verh K Acad Geneeskd Belg*, vol. 63, pp. 531-8; discussion 538-41, 2001.
- [53] H. Loppnow, "[Cytokines: classification, receptors, mechanisms of action]," *Internist (Berl)*, vol. 42, pp. 13-4, 17-27, 2001.
- [54] B. Echtenacher and D. N. Mannel, "Requirement of TNF and TNF receptor type 2 for LPS-induced protection from lethal septic peritonitis," *J Endotoxin Res*, vol. 8, pp. 365-9, 2002.
- [55] T. Volk, M. Schmutzler, L. Engelhardt, W. D. Docke, H. D. Volk, W. Konertz, and W. J. Kox, "Influence of aminosteroid and glucocorticoid treatment on inflammation and immune function during cardiopulmonary bypass," *Crit Care Med*, vol. 29, pp. 2137-42, 2001.
- [56] D. Fukumura, S. Miura, I. Kurose, H. Higuchi, H. Suzuki, H. Ebinuma, J. Y. Han, N. Watanabe, G. Wakabayashi, M. Kitajima, and H. Ishii, "IL-1 is an important mediator for

- microcirculatory changes in endotoxin-induced intestinal mucosal damage," *Dig Dis Sci*, vol. 41, pp. 2482-92, 1996.
- [57] P. Loisa, T. Rinne, S. Laine, M. Hurme, and S. Kaukinen, "Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis," *Acta Anaesthesiol Scand*, vol. 47, pp. 319-25, 2003.
- [58] P. Damas, D. Ledoux, M. Nys, Y. Vrindts, D. De Groote, P. Franchimont, and M. Lamy, "Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity," *Ann Surg*, vol. 215, pp. 356-62, 1992.
- [59] M. K. Lustig, V. H. Bac, D. Pavlovic, S. Maier, M. Grundling, O. Grisk, M. Wendt, C. D. Heidecke, and C. Lehmann, "Colon Ascendens Stent Peritonitis-A Model Of Sepsis Adopted To The Rat: Physiological, Microcirculatory And Laboratory Changes," *Shock*, vol. 28, pp. 59-64, 2007.
- [60] R. C. Bone, "Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation," *Crit Care Med*, vol. 24, pp. 163-72, 1996.
- [61] Engelhardt L, *Einfluss von Methylprednisolon und Tirilazad Mesylat auf immunologische Parameter nach koronarer Bypassoperation - eine placebokontrollierte Studie*. Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin, 2001.
- [62] W. K. Schuster HP., *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen.*, vol. 3. Auflage. Berlin Heidelberg New York Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio: Springer Verlag, 2000.
- [63] M. J. Hickey, A. C. Issekutz, P. H. Reinhardt, R. N. Fedorak, and P. Kubes, "Endogenous interleukin-10 regulates hemodynamic parameters, leukocyte-endothelial cell interactions, and microvascular permeability during endotoxemia," *Circ Res*, vol. 83, pp. 1124-31, 1998.

- [64] A. H. Cruz, R. Z. Mendonca, and V. L. Petricevich, "Crotalus durissus terrificus venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage," *Mediators Inflamm*, vol. 2005, pp. 349-59, 2005.
- [65] A. Jerin, N. Pozar-Lukanovic, V. Sojar, D. Stanisavljevic, V. Paver-Erzen, and J. Osredkar, "Balance of pro- and anti-inflammatory cytokines in liver surgery," *Clin Chem Lab Med*, vol. 41, pp. 899-903, 2003.
- [66] B. Conti, I. Tabarean, C. Andrei, and T. Bartfai, "Cytokines and fever," *Front Biosci*, vol. 9, pp. 1433-49, 2004.
- [67] W. P. Arend, M. Malyak, C. J. Guthridge, and C. Gabay, "Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology," *Annu Rev Immunol*, vol. 16, pp. 27-55, 1998.
- [68] P. A. Riley, "Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation," *Int J Radiat Biol*, vol. 65, pp. 27-33, 1994.
- [69] A. Boveris, "Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues," *Medicina (B Aires)*, vol. 58, pp. 350-6, 1998.
- [70] T. Niidome, N. Morimoto, S. Iijima, A. Akaike, T. Kihara, and H. Sugimoto, "Mechanisms of cell death of neural progenitor cells caused by trophic support deprivation," *Eur J Pharmacol*, vol. 548, pp. 1-8, 2006.
- [71] E. Roth, N. Manhart, and A. Punz, "Role of antioxidants in Sepsis.," *Intensivmedizin*, vol. 35, pp. 95-105, 1998.
- [72] P. Kubes, M. B. Grisham, J. A. Barrowman, T. Gaginella, and D. N. Granger, "Leukocyte-induced vascular protein leakage in cat mesentery," *Am J Physiol*, vol. 261, pp. H1872-9, 1991.
- [73] A. Walther, C. Barth, M. M. Gebhard, and E. Martin, "Role of nitric oxide in leukocyte-independent endothelial damage during experimental endotoxemia," *Shock*, vol. 20, pp. 286-91, 2003.



- [74] S. Prayag, "Role of oxygen free radicals in septic shock," *J Assoc Physicians India*, vol. 48, pp. 953-5, 2000.
- [75] V. Mishra, M. Baines, R. Wenstone, and A. Shenkin, "Markers of oxidative damage, antioxidant status and clinical outcome in critically ill patients," *Ann Clin Biochem*, vol. 42, pp. 269-76, 2005.
- [76] H. F. Goode, H. C. Cowley, B. E. Walker, P. D. Howdle, and N. R. Webster, "Decreased antioxidant status and increased lipid peroxidation in patients with septic shock and secondary organ dysfunction," *Crit Care Med*, vol. 23, pp. 646-51, 1995.
- [77] G. M. Koksall, C. Sayilgan, S. Aydin, H. Oz, and H. Uzun, "Correlation of plasma and tissue oxidative stresses in intra-abdominal sepsis," *J Surg Res*, vol. 122, pp. 180-3, 2004.
- [78] P. Bela, R. Bahl, A. S. Sane, P. H. Sawant, V. R. Shah, V. V. Mishra, and H. L. Trivedi, "Oxidative stress status: possible guideline for clinical management of critically ill patients," *Panminerva Med*, vol. 43, pp. 27-31, 2001.
- [79] S. Basu and M. Eriksson, "Vitamin E in relation to lipid peroxidation in experimental septic shock," *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, vol. 62, pp. 195-9, 2000.
- [80] L. Cominacini, A. F. Pasini, U. Garbin, A. Davoli, M. L. Tosetti, M. Campagnola, A. Rigoni, A. M. Pastorino, V. Lo Cascio, and T. Sawamura, "Oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) binding to ox-LDL receptor-1 in endothelial cells induces the activation of NF-kappaB through an increased production of intracellular reactive oxygen species," *J Biol Chem*, vol. 275, pp. 12633-8, 2000.
- [81] J. Galle, T. Quaschnig, S. Seibold, and C. Wanner, "Endothelial dysfunction and inflammation: what is the link?" *Kidney Int Suppl*, pp. S45-9, 2003.
- [82] H. Morawietz, "Antioxidative defense in endothelial cells: new kids on the block," *Thromb Haemost*, vol. 97, pp. 3-4, 2007.
- [83] B. Schulz, "Untersuchung der Opsonin-Aktivität von CRP, SAP, A-beta42 und SAA und deren Rolle bei der Schaumzellbildung.," Universität Regensburg, 2006.

- [84] C. C. Hsieh, M. H. Yen, C. H. Yen, and Y. T. Lau, "Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells," *Cardiovasc Res*, vol. 49, pp. 135-45, 2001.
- [85] O. S. Kim, C. S. Lee, E. H. Joe, and I. Jou, "Oxidized low density lipoprotein suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in microglia: oxidative stress acts through control of inflammation," *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 342, pp. 9-18, 2006.
- [86] J. Galle, T. Hansen-Hagge, C. Wanner, and S. Seibold, "Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells," *Atherosclerosis*, vol. 185, pp. 219-26, 2006.
- [87] L. Cominacini, A. Rigoni, A. F. Pasini, U. Garbin, A. Davoli, M. Campagnola, A. M. Pastorino, V. Lo Cascio, and T. Sawamura, "The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide," *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 13750-5, 2001.
- [88] J. Galle, A. Mameghani, S. S. Bolz, S. Gambaryan, M. Gorg, T. Quaschnig, U. Raff, H. Barth, S. Seibold, C. Wanner, and U. Pohl, "Oxidized LDL and its compound lysophosphatidylcholine potentiate AngII-induced vasoconstriction by stimulation of RhoA," *J Am Soc Nephrol*, vol. 14, pp. 1471-9, 2003.
- [89] M. Kalousova, T. Zima, V. Tesar, and S. Stipek, "[New markers of advanced damage caused by oxidative and carbonyl stress]," *Sb Lek*, vol. 102, pp. 465-72, 2001.
- [90] L. Selmecci, L. Seres, M. Antal, J. Lukacs, A. Regoly-Merei, and G. Acsady, "Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique," *Clin Chem Lab Med*, vol. 43, pp. 294-7, 2005.
- [91] Z. H. Zhang, S. X. Liu, F. F. Hou, J. W. Tian, L. Wang, Z. Q. Liu, and Y. Chen, "[Advanced oxidation protein products-induced tumor necrosis factor alpha secretion in

- monocytes via reactive oxygen species generation]," *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, vol. 25, pp. 493-7, 2005.
- [92] S. Chen, L. Liu, X. Sun, Y. Liu, and T. Song, "Captopril restores endothelium-dependent relaxation induced by advanced oxidation protein products in rat aorta," *J Cardiovasc Pharmacol*, vol. 46, pp. 803-9, 2005.
- [93] F. Yuan, S. X. Liu, and J. W. Tian, "[Advanced oxidation protein products induce reactive oxygen species production in endothelial cells]," *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, vol. 24, pp. 1350-2, 2004.
- [94] Y. Iwao, M. Anraku, M. Hiraike, K. Kawai, K. Nakajou, T. Kai, A. Suenaga, and M. Otagiri, "The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP)," *Drug Metab Pharmacokinet*, vol. 21, pp. 140-6, 2006.
- [95] A. B. Lentsch and P. A. Ward, "Activation and regulation of NFkappaB during acute inflammation," *Clin Chem Lab Med*, vol. 37, pp. 205-8, 1999.
- [96] K. Ley and T. F. Tedder, "Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling," *J Immunol*, vol. 155, pp. 525-8, 1995.
- [97] Y. Ogura, "In vivo evaluation of leukocyte dynamics in the retinal and choroidal circulation," *Jpn J Ophthalmol*, vol. 44, pp. 322-3, 2000.
- [98] M. Bauer, "Pathophysiologie der Sepsis," *Anaesthesist*, vol. 45, pp. 312-22, 1996.
- [99] T. A. Springer, "Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm," *Cell*, vol. 76, pp. 301-14, 1994.
- [100] T. A. Springer, "Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration," *Annu Rev Physiol*, vol. 57, pp. 827-72, 1995.

- [101] Y. Guo, L. Lindbom, and P. Hedqvist, "Spontaneous leukocyte rolling in rat and mouse microvessels is independent of mast cell activity," *Inflamm Res*, vol. 49, pp. 325-9, 2000.
- [102] M. Thiel, C. Zourelidis, and K. Peter, "[The role of polymorphonuclear neutrophilic leukocytes in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome (ARDS)]," *Anaesthetist*, vol. 45, pp. 113-30, 1996.
- [103] D. N. Granger and P. Kubes, "The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion," *J Leukoc Biol*, vol. 55, pp. 662-75, 1994.
- [104] T. Barkhausen, C. Krettek, and M. van Griensven, "L-selectin: adhesion, signalling and its importance in pathologic posttraumatic endotoxemia and non-septic inflammation," *Exp Toxicol Pathol*, vol. 57, pp. 39-52, 2005.
- [105] C. F. Benjamim, J. S. Silva, Z. B. Fortes, M. A. Oliveira, S. H. Ferreira, and F. Q. Cunha, "Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils," *Infect Immun*, vol. 70, pp. 3602-10, 2002.
- [106] K. Ley, "Histamine can induce leukocyte rolling in rat mesenteric venules," *Am J Physiol*, vol. 267, pp. H1017-23, 1994.
- [107] R. Bonfanti, B. C. Furie, B. Furie, and D. D. Wagner, "PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells," *Blood*, vol. 73, pp. 1109-12, 1989.
- [108] R. Scalia, V. E. Armstead, A. G. Minchenko, and A. M. Lefer, "Essential role of P-selectin in the initiation of the inflammatory response induced by hemorrhage and reinfusion," *J Exp Med*, vol. 189, pp. 931-8, 1999.
- [109] C. S. Bonder, M. U. Norman, T. Macrae, P. R. Mangan, C. T. Weaver, D. C. Bullard, D. M. McCafferty, and P. Kubes, "P-selectin can support both Th1 and Th2 lymphocyte rolling in the intestinal microvasculature," *Am J Pathol*, vol. 167, pp. 1647-60, 2005.
- [110] K. Ley, "Leukocyte adhesion to vascular endothelium," *J Reconstr Microsurg*, vol. 8, pp. 495-503, 1992.

- [111] M. A. Perry, M. Phillipson, and L. Holm, "Transmural gradient of leukocyte-endothelial interaction in the rat gastrointestinal tract," *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, vol. 289, pp. G852-9, 2005.
- [112] U. H. von Andrian, E. M. Berger, L. Ramezani, J. D. Chambers, H. D. Ochs, J. M. Harlan, J. C. Paulson, A. Etzioni, and K. E. Arfors, "In vivo behavior of neutrophils from two patients with distinct inherited leukocyte adhesion deficiency syndromes," *J Clin Invest*, vol. 91, pp. 2893-7, 1993.
- [113] R. Gonzalez-Amaro, F. Diaz-Gonzalez, and F. Sanchez-Madrid, "Adhesion molecules in inflammatory diseases," *Drugs*, vol. 56, pp. 977-88, 1998.
- [114] H. Rossiter, R. Alon, and T. S. Kupper, "Selectins, T-cell rolling and inflammation," *Mol Med Today*, vol. 3, pp. 214-22, 1997.
- [115] C. Lehmann, *Tierexperimentelle Untersuchungen zur intestinalen Mikrozirkulation bei Endotoxinämie*. Berlin, 2000.
- [116] R. O. Hynes, "Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion," *Cell*, vol. 69, pp. 11-25, 1992.
- [117] D. Nolte, W. M. Kuebler, W. A. Muller, K. D. Wolff, and K. Messmer, "Attenuation of leukocyte sequestration by selective blockade of PECAM-1 or VCAM-1 in murine endotoxemia," *Eur Surg Res*, vol. 36, pp. 331-7, 2004.
- [118] J. N. Hoffmann, B. Vollmar, D. Inthorn, F. W. Schildberg, and M. D. Menger, "A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia," *Shock*, vol. 12, pp. 355-64, 1999.
- [119] S. Massberg, S. Eisenmenger, G. Enders, F. Krombach, and K. Messmer, "Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse," *Res Exp Med (Berl)*, vol. 198, pp. 23-35, 1998.

- [120] M. D. Menger, D. Steiner, and K. Messmer, "Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow"," *Am J Physiol*, vol. 263, pp. H1892-900, 1992.
- [121] L. B. Hildebrand, V. Krejci, M. E. tenHoevel, A. Banic, and G. H. Sigurdsson, "Redistribution of microcirculatory blood flow within the intestinal wall during sepsis and general anesthesia," *Anesthesiology*, vol. 98, pp. 658-69, 2003.
- [122] K. Klemm and F. G. Moody, "Regional intestinal blood flow and nitric oxide synthase inhibition during sepsis in the rat," *Ann Surg*, vol. 227, pp. 126-33, 1998.
- [123] M. T. Piascik, E. E. Soltis, M. M. Piascik, and L. B. Macmillan, "Alpha-adrenoceptors and vascular regulation: molecular, pharmacologic and clinical correlates," *Pharmacol Ther*, vol. 72, pp. 215-41, 1996.
- [124] M. Grotz, G. Regel, L. Bastian, A. Weimann, K. Neuhoff, M. Stalp, and H. Tscherne, "[The intestine as the central organ in the development of multiple organ failure after severe trauma--pathophysiology and therapeutic approaches]," *Zentralbl Chir*, vol. 123, pp. 205-17, 1998.
- [125] J. C. Marshall, N. V. Christou, and J. L. Meakins, "The gastrointestinal tract. The "undrained abscess" of multiple organ failure," *Ann Surg*, vol. 218, pp. 111-9, 1993.
- [126] L. J. Magnotti and E. A. Deitch, "Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure," *J Burn Care Rehabil*, vol. 26, pp. 383-91, 2005.
- [127] H. Schmidt, A. Secchi, R. Wellmann, A. Bach, H. Bohrer, M. M. Gebhard, and E. Martin, "Effect of endotoxemia on intestinal villus microcirculation in rats," *J Surg Res*, vol. 61, pp. 521-6, 1996.
- [128] J. Kaszaki, A. Wolfard, L. Szalay, and M. Boros, "Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury," *Transplant Proc*, vol. 38, pp. 826-8, 2006.

- [129] B. Schwarz, N. Salak, H. Hofstotter, W. Pajik, H. Knotzer, A. Mayr, and W. Hasibeder, "[Intestinal ischemic reperfusion syndrome: pathophysiology, clinical significance, therapy]," *Wien Klin Wochenschr*, vol. 111, pp. 539-48, 1999.
- [130] E. Clark, C. Hoare, J. Tanianis-Hughes, G. L. Carlson, and G. Warhurst, "Interferon gamma induces translocation of commensal *Escherichia coli* across gut epithelial cells via a lipid raft-mediated process," *Gastroenterology*, vol. 128, pp. 1258-67, 2005.
- [131] M. P. Fink, "Leaky gut hypothesis: a historical perspective," *Crit Care Med*, vol. 18, pp. 579-80, 1990.
- [132] G. M. Swank and E. A. Deitch, "Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes," *World J Surg*, vol. 20, pp. 411-7, 1996.
- [133] J. P. Revelly, T. Ayuse, N. Brienza, H. E. Fessler, and J. L. Robotham, "Endotoxic shock alters distribution of blood flow within the intestinal wall," *Crit Care Med*, vol. 24, pp. 1345-51, 1996.
- [134] G. Friedman, G. Berlot, R. J. Kahn, and J. L. Vincent, "Combined measurements of blood lactate concentrations and gastric intramucosal pH in patients with severe sepsis," *Crit Care Med*, vol. 23, pp. 1184-93, 1995.
- [135] R. Zander, "[Arterial-intramuscular CO<sub>2</sub>--partial pressure difference (aiDCO<sub>2</sub>)]," *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, vol. 33 Suppl 2, pp. S52-3, 1998.
- [136] C. Jung, Y. Rong, S. Doctrow, M. Baudry, B. Malfroy, and Z. Xu, "Synthetic superoxide dismutase/catalase mimetics reduce oxidative stress and prolong survival in a mouse amyotrophic lateral sclerosis model," *Neurosci Lett*, vol. 304, pp. 157-60, 2001.
- [137] R. P. Dellinger, J. M. Carlet, H. Masur, H. Gerlach, T. Calandra, J. Cohen, J. Gea-Banacloche, D. Keh, J. C. Marshall, M. M. Parker, G. Ramsay, J. L. Zimmerman, J. L. Vincent, and M. M. Levy, "Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock," *Intensive Care Med*, vol. 30, pp. 536-55, 2004.

- [138] K. Reinhart, M. Meisner, and F. M. Brunkhorst, "Markers for sepsis diagnosis: what is useful?" *Crit Care Clin*, vol. 22, pp. 503-19, ix-x, 2006.
- [139] J. N. Hoffmann, B. Vollmar, M. W. Laschke, D. Inthorn, J. Fertmann, F. W. Schildberg, and M. D. Menger, "Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia," *Crit Care Med*, vol. 32, pp. 1011-7, 2004.
- [140] F. Bloos and K. Reinhart, "[New treatment approaches in sepsis]," *Zentralbl Chir*, vol. 127, pp. 174-9, 2002.
- [141] J. N. Hoffmann, J. M. Fertmann, and K. W. Jauch, "Microcirculatory disorders in sepsis and transplantation: therapy with natural coagulatory inhibitors antithrombin and activated protein C," *Curr Opin Crit Care*, vol. 12, pp. 426-30, 2006.
- [142] G. R. Bernard, J. L. Vincent, P. F. Laterre, S. P. LaRosa, J. F. Dhainaut, A. Lopez-Rodriguez, J. S. Steingrub, G. E. Garber, J. D. Helterbrand, E. W. Ely, and C. J. Fisher, Jr., "Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis," *N Engl J Med*, vol. 344, pp. 699-709, 2001.
- [143] E. Neugebauer, D. Rixen, M. Raum, and U. Schafer, "Thirty years of anti-mediator treatment in sepsis and septic shock--what have we learned?" *Langenbecks Arch Surg*, vol. 383, pp. 26-34, 1998.
- [144] K. Baker, C. B. Marcus, K. Huffman, H. Kruk, B. Malfroy, and S. R. Doctrow, "Synthetic combined superoxide dismutase/catalase mimetics are protective as a delayed treatment in a rat stroke model: a key role for reactive oxygen species in ischemic brain injury," *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 284, pp. 215-21, 1998.
- [145] A. Puglisi, G. Tabbi, and G. Vecchio, "Bioconjugates of cyclodextrins of manganese salen-type ligand with superoxide dismutase activity," *J Inorg Biochem*, vol. 98, pp. 969-76, 2004.
- [146] S. Pucheu, F. Boucher, T. Sulpice, N. Tresallet, Y. Bonhomme, B. Malfroy, and J. de Leiris, "EUK-8 a synthetic catalytic scavenger of reactive oxygen species protects isolated



- iron-overloaded rat heart from functional and structural damage induced by ischemia/reperfusion," *Cardiovasc Drugs Ther*, vol. 10, pp. 331-9, 1996.
- [147] A. J. Bruce, B. Malfroy, and M. Baudry, "beta-Amyloid toxicity in organotypic hippocampal cultures: protection by EUK-8, a synthetic catalytic free radical scavenger," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 93, pp. 2312-6, 1996.
- [148] J. S. Friedman, V. I. Rebel, R. Derby, K. Bell, T. T. Huang, F. A. Kuypers, C. J. Epstein, and S. J. Burakoff, "Absence of mitochondrial superoxide dismutase results in a murine hemolytic anemia responsive to therapy with a catalytic antioxidant," *J Exp Med*, vol. 193, pp. 925-34, 2001.
- [149] G. Wolf, T. Hannken, R. Schroeder, G. Zahner, F. N. Ziyadeh, and R. A. Stahl, "Antioxidant treatment induces transcription and expression of transforming growth factor beta in cultured renal proximal tubular cells," *FEBS Lett*, vol. 488, pp. 154-9, 2001.
- [150] S. R. Doctrow, K. Huffman, C. B. Marcus, G. Tocco, E. Malfroy, C. A. Adinolfi, H. Kruk, K. Baker, N. Lazarowych, J. Mascarenhas, and B. Malfroy, "Salen-manganese complexes as catalytic scavengers of hydrogen peroxide and cytoprotective agents: structure-activity relationship studies," *J Med Chem*, vol. 45, pp. 4549-58, 2002.
- [151] M. A. Sharpe, R. Olsson, V. C. Stewart, and J. B. Clark, "Oxidation of nitric oxide by oxomanganese-salen complexes: a new mechanism for cellular protection by superoxide dismutase/catalase mimetics," *Biochem J*, vol. 366, pp. 97-107, 2002.
- [152] Y. G. Abashkin and S. K. Burt, "(salen)MnIII compounds as nonpeptidyl mimics of catalase. Mechanism-based tuning of catalase activity: a theoretical study," *Inorg Chem*, vol. 44, pp. 1425-32, 2005.
- [153] T. S. Jackson, A. Xu, J. A. Vita, and J. F. Keane, Jr., "Ascorbate prevents the interaction of superoxide and nitric oxide only at very high physiological concentrations," *Circ Res*, vol. 83, pp. 916-22, 1998.

- [154] M. Kasapoglu and T. Ozben, "Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging," *Exp Gerontol*, vol. 36, pp. 209-20, 2001.
- [155] Tierschutzgesetz, "TierSchG Geltung ab 01.01.1987 Neugefasst durch Bek. v. 25.5.1998 I 1105. 1818, zuletzt geändert durch Art. 7b G v. 21.6.2005 I 1666," 2005.
- [156] G. W. Schmid-Schoenbein, B. W. Zweifach, and S. Kovalcheck, "The application of stereological principles to morphometry of the microcirculation in different tissues," *Microvasc Res*, vol. 14, pp. 303-17, 1977.
- [157] R. V. Bianca, N. S. Wayman, M. C. McDonald, A. Pinto, M. A. Shape, P. K. Chatterjee, and C. Thiemermann, "Superoxide dismutase mimetic with catalase activity, EUK-134, attenuates the multiple organ injury and dysfunction caused by endotoxin in the rat," *Med Sci Monit*, vol. 8, pp. BR1-7, 2002.
- [158] P. K. Gonzalez, J. Zhuang, S. R. Doctrow, B. Malfroy, P. F. Benson, M. J. Menconi, and M. P. Fink, "EUK-8, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, ameliorates acute lung injury in endotoxemic swine," *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 275, pp. 798-806, 1995.
- [159] S. Pucheu, F. Boucher, B. Malfroy, and J. De Leiris, "Protective effect of the superoxide scavenger EUK8 against ultrastructural alterations induced by ischemia and reperfusion in isolated rat hearts," *Nutrition*, vol. 11, pp. 582-4, 1995.
- [160] B. Malfroy, S. R. Doctrow, P. L. Orr, G. Tocco, E. V. Fedoseyeva, and G. Benichou, "Prevention and suppression of autoimmune encephalomyelitis by EUK-8, a synthetic catalytic scavenger of oxygen-reactive metabolites," *Cell Immunol*, vol. 177, pp. 62-8, 1997.
- [161] M. C. McDonald, R. d'Emmanuele di Villa Bianca, N. S. Wayman, A. Pinto, M. A. Sharpe, S. Cuzzocrea, P. K. Chatterjee, and C. Thiemermann, "A superoxide dismutase mimetic with catalase activity (EUK-8) reduces the organ injury in endotoxic shock," *Eur J Pharmacol*, vol. 466, pp. 181-9, 2003.

- [162] P. K. Gonzalez, J. Zhuang, S. R. Doctrow, B. Malfroy, P. F. Benson, M. J. Menconi, and M. P. Fink, "Role of oxidant stress in the adult respiratory distress syndrome: evaluation of a novel antioxidant strategy in a porcine model of endotoxin-induced acute lung injury," *Shock*, vol. 6 Suppl 1, pp. S23-6, 1996.
- [163] H. A. Baboolal, F. Ichinose, R. Ullrich, N. Kawai, K. D. Bloch, and W. M. Zapol, "Reactive oxygen species scavengers attenuate endotoxin-induced impairment of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice," *Anesthesiology*, vol. 97, pp. 1227-33, 2002.
- [164] E. A. Deitch, "Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned," *Shock*, vol. 9, pp. 1-11, 1998.
- [165] J. C. Marshall, "Iatrogenesis, inflammation and organ injury: insights from a murine model," *Crit Care*, vol. 10, pp. 173, 2006.
- [166] K. Koike, "[Animal models for sepsis]," *Nippon Rinsho*, vol. 62, pp. 2262-6, 2004.
- [167] E. A. Deitch, "Rodent models of intra-abdominal infection," *Shock*, vol. 24 Suppl 1, pp. 19-23, 2005.
- [168] D. Xu, L. Qi, D. Guillory, N. Cruz, R. Berg, and E. A. Deitch, "Mechanisms of endotoxin-induced intestinal injury in a hyperdynamic model of sepsis," *J Trauma*, vol. 34, pp. 676-82; discussion 682-3, 1993.
- [169] X. Ni, K. R. Gritman, T. K. Eisenstein, M. W. Adler, K. E. Arfors, and R. F. Tuma, "Morphine attenuates leukocyte/endothelial interactions," *Microvasc Res*, vol. 60, pp. 121-30, 2000.
- [170] H. Schmidt, D. Ebeling, H. Bauer, A. Bach, H. Bohrer, M. M. Gebhard, and E. Martin, "Ketamine attenuates endotoxin-induced leukocyte adherence in rat mesenteric venules," *Crit Care Med*, vol. 23, pp. 2008-14, 1995.
- [171] S. Miura, Y. Tsuzuki, I. Kurose, M. Suematsu, T. Shigematsu, H. Kimura, H. Higuchi, H. Serizawa, H. Yagita, K. Okumura, D. N. Granger, and H. Ishii, "Endotoxin stimulates

- lymphocyte-endothelial interactions in rat intestinal Peyer's patches and villus mucosa," *Am J Physiol*, vol. 271, pp. G282-92, 1996.
- [172] G. H. Janssen, G. J. Tangelder, M. G. oude Egbrink, and R. S. Reneman, "Different effects of anesthetics on spontaneous leukocyte rolling in rat skin," *Int J Microcirc Clin Exp*, vol. 17, pp. 305-13, 1997.
- [173] R. R. Neviere, M. L. Pitt-Hyde, R. D. Piper, W. J. Sibbald, and R. F. Potter, "Microvascular perfusion deficits are not a prerequisite for mucosal injury in septic rats," *Am J Physiol*, vol. 276, pp. G933-40, 1999.
- [174] C. Lehmann, F. Feyerherd, T. Feyerherd, M. Fogliata, M. Grundling, T. I. Usichenko, K. Meissner, M. Wendt, and D. Pavlovic, "Ketamine does not affect intestinal microcirculation in pentobarbital-anaesthetized rats during experimental endotoxaemia," *Lab Anim*, vol. 41, pp. 55-62, 2007.
- [175] J. Yang, W. Li, M. Duan, Z. Zhou, N. Lin, Z. Wang, J. Sun, and J. Xu, "Large dose ketamine inhibits lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats," *Inflamm Res*, vol. 54, pp. 133-7, 2005.
- [176] S. Basu, D. K. Mutschler, A. O. Larsson, R. Kiiski, A. Nordgren, and M. B. Eriksson, "Propofol (Diprivan-EDTA) counteracts oxidative injury and deterioration of the arterial oxygen tension during experimental septic shock," *Resuscitation*, vol. 50, pp. 341-8, 2001.
- [177] C. Lehmann, A. Georgiew, M. Weber, J. Birnbaum, and W. J. Kox, "Reduction in intestinal leukocyte adherence in rat experimental endotoxemia by treatment with the 21-aminosteroid U-74389G," *Intensive Care Med*, vol. 27, pp. 258-63, 2001.
- [178] Y. Yuan and B. P. Fleming, "A method for isolation and fluorescent labeling of rat neutrophils for intravital microvascular studies," *Microvasc Res*, vol. 40, pp. 218-29, 1990.

- [179] J. Starkopf, K. Tamme, M. Zilmer, R. Talvik, and J. Samarutel, "The evidence of oxidative stress in cardiac surgery and septic patients: a comparative study," *Clin Chim Acta*, vol. 262, pp. 77-88, 1997.
- [180] M. G. oude Egbrink, G. H. Janssen, K. Ookawa, D. W. Slaaf, R. S. Reneman, X. H. Wehrens, K. J. Maaijwee, N. Ohshima, H. A. Struijker Boudier, and G. J. Tangelder, "Especially polymorphonuclear leukocytes, but also monomorphonuclear leukocytes, roll spontaneously in venules of intact rat skin: involvement of E-selectin," *J Invest Dermatol*, vol. 118, pp. 323-6, 2002.
- [181] G. H. Janssen, G. J. Tangelder, M. G. Oude Egbrink, and R. S. Reneman, "Spontaneous leukocyte rolling in venules in untraumatized skin of conscious and anesthetized animals," *Am J Physiol*, vol. 267, pp. H1199-204, 1994.
- [182] H. N. Mayrovitz, "Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice," *Am J Physiol*, vol. 262, pp. H157-61, 1992.
- [183] E. C. Butcher, "Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity," *Cell*, vol. 67, pp. 1033-6, 1991.
- [184] W. A. Muller, S. A. Weigl, X. Deng, and D. M. Phillips, "PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes," *J Exp Med*, vol. 178, pp. 449-60, 1993.
- [185] P. B. Anning and T. W. Evans, "Leukocytes in sepsis: do they just keep rolling along?" *Crit Care Med*, vol. 28, pp. 3108-9, 2000.
- [186] E. Fiebig, K. Ley, and K. E. Arfors, "Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery," *Int J Microcirc Clin Exp*, vol. 10, pp. 127-44, 1991.
- [187] Birnbaum J, Klotz E, Spies CD, Mueller J, Vargas Hein O, Feller J, Lehmann C., „Impact of Combined C1 Esterase Inhibitor/Coagulation Factor XIII or N-Acetylcysteine/Tirilazad Mesylate Administration on Leucocyte Adherence and Cytokine Release in Experimental Endotoxaemia,” *J Int Med Res*. 2008 Jul-Aug;36(4):748-59.

- [188] H. Schmidt, M. A. Weigand, C. Li, W. Schmidt, E. Martin, and H. J. Bardenheuer, "Intestinal formation of hypoxanthine and uric acid during endotoxemia," *J Surg Res*, vol. 71, pp. 61-6, 1997.
- [189] C. Anthoni, E. J. Rijcken, M. G. Laukoetter, H. U. Spiegel, N. Senninger, G. Schurmann, and C. F. Kriegelstein, "Submucosal collecting venules: a reliable site for intestinal intravital microscopy in rats," *J Invest Surg*, vol. 15, pp. 259-67, 2002.
- [190] H. Arndt, K. D. Palitzsch, M. B. Grisham, and D. N. Granger, "Metronidazole inhibits leukocyte-endothelial cell adhesion in rat mesenteric venules," *Gastroenterology*, vol. 106, pp. 1271-6, 1994.
- [191] D. Seiffge, T. Bissinger, E. Kremer, V. Laux, and R. Schleyerbach, "Inhibitory effects of pentoxifylline on LPS-induced leukocyte adhesion and macromolecular extravasation in the microcirculation," *Inflamm Res*, vol. 44, pp. 281-6, 1995.
- [192] I. Kurose, M. Suematsu, S. Miura, D. Fukumura, E. Sekizuka, H. Nagata, C. Oshio, and M. Tsuchiya, "Oxyradical generation from leukocytes during endotoxin-induced microcirculatory disturbance in rat mesentery--attenuating effect of cetraxate," *Toxicol Appl Pharmacol*, vol. 120, pp. 37-44, 1993.
- [193] H. Schmidt, W. Schmidt, T. Muller, H. Bohrer, A. Bach, M. M. Gebhard, and E. Martin, "Effect of the 21-aminosteroid tirilazad mesylate on leukocyte adhesion and macromolecular leakage during endotoxemia," *Surgery*, vol. 121, pp. 328-34, 1997.
- [194] J. N. Hoffmann, B. Vollmar, M. W. Laschke, J. M. Fertmann, K. W. Jauch, and M. D. Menger, "Microcirculatory alterations in ischemia-reperfusion injury and sepsis: effects of activated protein C and thrombin inhibition," *Crit Care*, vol. 9 Suppl 4, pp. S33-7, 2005.
- [195] R. Drazenovic, R. W. Samsel, M. E. Wylam, C. M. Doerschuk, and P. T. Schumacker, "Regulation of perfused capillary density in canine intestinal mucosa during endotoxemia," *J Appl Physiol*, vol. 72, pp. 259-65, 1992.

- [196] C. J. Theuer, M. A. Wilson, G. D. Steeb, and R. N. Garrison, "Microvascular vasoconstriction and mucosal hypoperfusion of the rat small intestine during bacteremia," *Circ Shock*, vol. 40, pp. 61-8, 1993.
- [197] T. J. VanderMeer, H. Wang, and M. P. Fink, "Endotoxemia causes ileal mucosal acidosis in the absence of mucosal hypoxia in a normodynamic porcine model of septic shock," *Crit Care Med*, vol. 23, pp. 1217-26, 1995.
- [198] C. Lehmann, J. P. Konig, J. Dettmann, J. Birnbaum, and W. J. Kox, "Effects of iloprost, a stable prostacyclin analog, on intestinal leukocyte adherence and microvascular blood flow in rat experimental endotoxemia," *Crit Care Med*, vol. 29, pp. 1412-6, 2001.
- [199] M. P. Fink, J. B. Antonsson, H. L. Wang, and H. R. Rothschild, "Increased intestinal permeability in endotoxic pigs. Mesenteric hypoperfusion as an etiologic factor," *Arch Surg*, vol. 126, pp. 211-8, 1991.
- [200] J. Birnbaum, E. Klotz, C. D. Spies, B. Lorenz, P. Stuebs, O. V. Hein, M. Grundling, D. Pavlovic, T. Usichenko, M. Wendt, W. J. Kox, and C. Lehmann, "Effects of dopexamine on the intestinal microvascular blood flow and leukocyte activation in a sepsis model in rats," *Crit Care*, vol. 10, pp. R117, 2006.
- [201] C. Lehmann, V. H. Bac, D. Pavlovic, M. Lustig, S. Maier, F. Feyerherd, T. I. Usichenko, K. Meissner, H. Haase, M. Junger, M. Wendt, C. D. Heidecke, and M. Grundling, "Metronidazole improves intestinal microcirculation in septic rats independently of bacterial burden," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 34, pp. 427-38, 2006.
- [202] E. Roth, N. Manhart, and B. Wessner, "Assessing the antioxidative status in critically ill patients," *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, vol. 7, pp. 161-8, 2004.
- [203] H. Schmidt, W. Schmidt, T. Muller, H. Bohrer, M. M. Gebhard, and E. Martin, "N-acetylcysteine attenuates endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo," *Crit Care Med*, vol. 25, pp. 858-63, 1997.

- [204] W. Schmidt, H. Schmidt, H. Bauer, M. M. Gebhard, and E. Martin, "Influence of lidocaine on endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo," *Anesthesiology*, vol. 87, pp. 617-24, 1997.
- [205] M. Taccone-Gallucci, R. Lubrano, C. Meloni, M. Morosetti, C. M. Adolfo, and C. U. Casciani, "Malonyldialdehyde content of cell membranes is the most important marker of oxidative stress in haemodialysis patients," *Nephrol Dial Transplant*, vol. 13, pp. 2711-2, 1998.
- [206] J. S. Falconer, J. A. Ross, K. C. Fearon, R. A. Hawkins, M. G. O'Riordain, and D. C. Carter, "Effect of eicosapentaenoic acid and other fatty acids on the growth in vitro of human pancreatic cancer cell lines," *Br J Cancer*, vol. 69, pp. 826-32, 1994.
- [207] A. Unlu, N. Turkozkan, B. Cimen, U. Karabicak, and H. Yaman, "The effect of Escherichia coli-derived lipopolysaccharides on plasma levels of malondialdehyde and 3-nitrotyrosine," *Clin Chem Lab Med*, vol. 39, pp. 491-3, 2001.
- [208] E. J. Giamarellos-Bourboulis, S. Skiathitis, A. Dionyssiou-Asteriou, S. Hatziantoniou, K. Demetzos, I. Dontas, G. T. Papaioannou, G. Karatzas, and G. Helen, "Lipid peroxidation by Pseudomonas aeruginosa in the pathogenesis of nosocomial sepsis," *J Postgrad Med*, vol. 49, pp. 11-6; discussion 16, 2003.
- [209] V. M. Victor, M. Rocha, and M. De la Fuente, "N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells," *Free Radic Res*, vol. 37, pp. 919-29, 2003.
- [210] C. Ritter, M. E. Andrades, A. Reinke, S. Menna-Barreto, J. C. Moreira, and F. Dal-Pizzol, "Treatment with N-acetylcysteine plus deferoxamine protects rats against oxidative stress and improves survival in sepsis," *Crit Care Med*, vol. 32, pp. 342-9, 2004.
- [211] S. Abe, Y. Tanaka, N. Fujise, T. Nakamura, H. Masunaga, T. Nagasawa, and M. Yagi, "An antioxidative nutrient-rich enteral diet attenuates lethal activity and oxidative stress induced by lipopolysaccharide in mice," *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, vol. 31, pp. 181-7, 2007.



- [212] K. Wagner, "MnSOD und p53 - Bedeutung für die durch oxidierte Low Density Lipoproteine induzierte Apoptose von Makrophagen," Universität Heidelberg, 2004.
- [213] J. C. Fang, S. Kinlay, J. Beltrame, H. Hikiti, M. Wainstein, D. Behrendt, J. Suh, B. Frei, G. H. Mudge, A. P. Selwyn, and P. Ganz, "Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial," *Lancet*, vol. 359, pp. 1108-13, 2002.
- [214] A. Munteanu, M. Taddei, I. Tamburini, E. Bergamini, A. Azzi, and J. M. Zingg, "Antagonistic effects of oxidized low density lipoprotein and alpha-tocopherol on CD36 scavenger receptor expression in monocytes: involvement of protein kinase B and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma," *J Biol Chem*, vol. 281, pp. 6489-97, 2006.
- [215] J. P. Gaut, A. Belaouaj, J. Byun, L. J. Roberts, 2nd, N. Maeda, B. Frei, and J. W. Heinecke, "Vitamin C fails to protect amino acids and lipids from oxidation during acute inflammation," *Free Radic Biol Med*, vol. 40, pp. 1494-501, 2006.
- [216] S. Kinlay, D. Behrendt, J. C. Fang, D. Delagrangé, J. Morrow, J. L. Witztum, N. Rifai, A. P. Selwyn, M. A. Creager, and P. Ganz, "Long-term effect of combined vitamins E and C on coronary and peripheral endothelial function," *J Am Coll Cardiol*, vol. 43, pp. 629-34, 2004.
- [217] Z. X. Wu, Y. M. Xue, C. Z. Li, and M. P. Guan, "[Advanced oxidation protein products in diabetic nephropathy patients and its relation with superoxide dismutase, glutathione peroxidase, neopterin]," *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, vol. 30, pp. 704-7, 2005.
- [218] A. Piwowar, M. Knapik-Kordecka, and M. Warwas, "AOPP and its relations with selected markers of oxidative/antioxidative system in type 2 diabetes mellitus," *Diabetes Res Clin Pract*, vol. 77, pp. 188-92, 2007.

- [219] M. E. Atabek, M. Keskin, C. Yazici, M. Kendirci, N. Hatipoglu, E. Koklu, and S. Kurtoglu, "Protein oxidation in obesity and insulin resistance," *Eur J Pediatr*, vol. 165, pp. 753-6, 2006.
- [220] A. Valli, M. E. Suliman, N. Meert, R. Vanholder, B. Lindholm, P. Stenvinkel, M. Watanabe, P. Barany, A. Alvestrand, and B. Anderstam, "Overestimation of advanced oxidation protein products in uremic plasma due to presence of triglycerides and other endogenous factors," *Clin Chim Acta*, vol. 379, pp. 87-94, 2007.
- [221] R. Kayali, U. Cakatay, and F. Tekeli, "Male rats exhibit higher oxidative protein damage than females of the same chronological age," *Mech Ageing Dev*, 2007.
- [222] M. Skvarilova, A. Bulava, D. Stejskal, S. Adamovska, and J. Bartek, "Increased level of advanced oxidation products (AOPP) as a marker of oxidative stress in patients with acute coronary syndrome," *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, vol. 149, pp. 83-7, 2005.
- [223] A. B. Jolitha, M. V. Subramanyam, and S. Asha Devi, "Modification by vitamin E and exercise of oxidative stress in regions of aging rat brain: studies on superoxide dismutase isoenzymes and protein oxidation status," *Exp Gerontol*, vol. 41, pp. 753-63, 2006.
- [224] M. Lazarova, D. Stejskal, B. Lacnak, J. Vaclavik, S. Adamovska, R. Ochmanova, V. Hanak, and M. Skacelova, "The antioxidant acetylcysteine reduces oxidative stress by decreasing level of AOPPs," *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, vol. 148, pp. 131-3, 2004.
- [225] V. Witko-Sarsat, V. Gausson, A. T. Nguyen, M. Touam, T. Drueke, F. Santangelo, and B. Descamps-Latscha, "AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients," *Kidney Int*, vol. 64, pp. 82-91, 2003.
- [226] P. E. Marik, "Propofol: an immunomodulating agent," *Pharmacotherapy*, vol. 25, pp. 28S-33S, 2005.

- [227] I. Papezikova, A. Lojek, H. Cizova, and M. Ciz, "Alterations in plasma antioxidants during reperfusion of the ischemic small intestine in rats," *Res Vet Sci*, vol. 81, pp. 140-7, 2006.
- [228] K. Herbaczynska-Cedro and W. Gordon-Majszak, "Evidence for increased lipid peroxidation in the non-ischaemic portion of the heart with coronary occlusion," *Cardiovasc Res*, vol. 23, pp. 98-103, 1989.
- [229] S. Basu and M. Eriksson, "Lipid peroxidation induced by an early inflammatory response in endotoxaemia," *Acta Anaesthesiol Scand*, vol. 44, pp. 17-23, 2000.
- [230] M. B. Yerer, H. Yapilar, S. Aydogan, O. Yalcin, and O. Baskurt, "Lipid peroxidation and deformability of red blood cells in experimental sepsis in rats: The protective effects of melatonin," *Clin Hemorheol Microcirc*, vol. 30, pp. 77-82, 2004.
- [231] H. Hanimoglu, T. Tanriverdi, T. Kacira, G. Z. Sanus, P. Atukeren, S. Aydin, Y. Tunali, K. Gumustas, and M. Y. Kaynar, "Relationship between DNA damage and total antioxidant capacity in patients with transitional meningioma," *Clin Neurol Neurosurg*, 2007.
- [232] H. C. Cowley, P. J. Bacon, H. F. Goode, N. R. Webster, J. G. Jones, and D. K. Menon, "Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors," *Crit Care Med*, vol. 24, pp. 1179-83, 1996.
- [233] C. Pascual, W. Karzai, A. Meier-Hellmann, M. Oberhoffer, A. Horn, D. Bredle, and K. Reinhart, "Total plasma antioxidant capacity is not always decreased in sepsis," *Crit Care Med*, vol. 26, pp. 705-9, 1998.
- [234] H. Cizova, I. Papezikova, L. Kubala, A. Lojek, and M. Ciz, "Increased antioxidant capacity of serum did not prevent lipid peroxidation in the intermittent ischemia-reperfusion of rat small intestine," *Dig Dis Sci*, vol. 51, pp. 657-61, 2006.
- [235] M. W. Angstwurm, L. Engelmann, T. Zimmermann, C. Lehmann, C. H. Spes, P. Abel, R. Strauss, A. Meier-Hellmann, R. Insel, J. Radke, J. Schuttler, and R. Gartner, "Selenium in

- Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock," *Crit Care Med*, vol. 35, pp. 118-26, 2007.
- [236] H. Baatz, U. Pleyer, H. J. Thiel, and C. Hammer, "In vivo study of leukocyte-endothelium interaction in endotoxin-induced uveitis," *Invest Ophthalmol Vis Sci*, vol. 36, pp. 1960-7, 1995.
- [237] F. Moazzam, F. A. DeLano, B. W. Zweifach, and G. W. Schmid-Schonbein, "The leukocyte response to fluid stress," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 94, pp. 5338-43, 1997.
- [238] R. S. Croner, E. Hoerer, Y. Kulu, T. Hackert, M. M. Gebhard, C. Herfarth, and E. Klar, "Hepatic platelet and leukocyte adherence during endotoxemia," *Crit Care*, vol. 10, pp. R15, 2006.
- [239] S. Ghosh, R. D. Latimer, B. M. Gray, R. J. Harwood, and A. Oduro, "Endotoxin-induced organ injury," *Crit Care Med*, vol. 21, pp. S19-24, 1993.
- [240] L. B. Hinshaw, T. E. Emerson, Jr., P. F. Iampietro, and C. M. Brake, "A comparative study of the hemodynamic actions of histamine and endotoxin," *Am J Physiol*, vol. 203, pp. 600-6, 1962.
- [241] T. Bennett, R. P. Mahajan, J. E. March, P. A. Kemp, and S. M. Gardiner, "Regional and temporal changes in cardiovascular responses to norepinephrine and vasopressin during continuous infusion of lipopolysaccharide in conscious rats," *Br J Anaesth*, vol. 93, pp. 400-7, 2004.
- [242] A. B. Iskit and M. O. Guc, "A new therapeutic approach for the treatment of sepsis," *Med Hypotheses*, vol. 62, pp. 342-5, 2004.
- [243] H. Zhang, H. Spapen, P. Manikis, P. Rogiers, G. Metz, W. A. Buurman, and J. L. Vincent, "Tirilazad mesylate (U-74006F) inhibits effects of endotoxin in dogs," *Am J Physiol*, vol. 268, pp. H1847-55, 1995.

- [244] K. McKechnie, B. L. Furman, and J. R. Parratt, "Modification by oxygen free radical scavengers of the metabolic and cardiovascular effects of endotoxin infusion in conscious rats," *Circ Shock*, vol. 19, pp. 429-39, 1986.
- [245] C. Barandier, F. Boucher, B. Malfroy, and J. de Leiris, "Vasodilatory effects of a salen-manganese complex with potent oxyradical scavenger activities," *J Vasc Res*, vol. 34, pp. 49-57, 1997.

## **Danksagung**

Frau Prof. Dr. Claudia Spies möchte ich für die Idee zu dieser Studie, die Überlassung des Themas, die Beantragung der notwendigen Genehmigungen bei der Tierschutzbehörde, die Bereitstellung aller erforderlichen Ressourcen sowie die kritische Durchsicht des Manuskripts danken.

Bei Frau Prof. Dr. Heike Tönhardt möchte ich mich ebenfalls für die Betreuung der Arbeit und die Begutachtung des Manuskripts bedanken.

Herrn Prof. Dr. Christian Lehmann danke ich für die Vorbereitung des Antrags, die Beantragung des Versuches bei der Tierschutzbehörde und Einarbeitung in die Methodik.

Mein ganz besonderer Dank geht an Oberarzt Dr. Jürgen Birnbaum, der mir bei der Betreuung der Arbeit ständig hilfreich zur Seite stand und mich mit konstruktiver Kritik und Hilfestellung – aber auch immer wieder mit aufmunternden Worten - unterstützt hat.

Des Weiteren geht ein großer Dank an die statistische Abteilung der Charité – allen voran Dr. Katrin Brauns, die mir mit sehr viel Geduld bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse behilflich war und Frau Barbara Egerer für die hervorragende biochemische Bestimmung und Mitteilung der Laborparameter.

Ebenso danke ich recht herzlich meiner Mit-Doktorandin Vera Christoph, ohne die die Durchführung des tierexperimentellen Teiles nicht in dieser Qualität und Kürze möglich gewesen wäre. Darüber hinaus danke ich dem Team der Tierpfleger für die sorgsame Betreuung der Versuchstiere.

Außerdem danke ich meiner Familie und meinen lieben Freunden, die mir stets hilfreich und ermunternd zur Seite standen. An erster Stelle sind hier meine Eltern zu nennen, die mir das Tiermedizinstudium ermöglicht und mir mit ihrer liebevollen Erziehung viel Kraft gegeben haben.

Mein unermesslicher Dank gilt auch meinem Ehemann, der immer für mich da war, mich motiviert und an mich geglaubt hat.

## **Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig ausgeführt und andere Hilfsmittel, als die darin aufgeführten, nicht benutzt habe und dass von mir weder diese noch eine andere Dissertation an einer anderen Fakultät eingereicht wurde.

Nürnberg, den 13.08.2008

Constanze Gilch