

Einleitung

Die inflammatorische Reaktion ist ein wesentlicher, allgemeiner Abwehrmechanismus des vaskularisierten Gewebes.

Inflammatorische Reaktionen können durch unterschiedliche Stimuli, wie z.B. Infektionen, Traumata und Reperfusion nach Ischämie ausgelöst werden. Die Inflammation ist notwendig zur Eindämmung des entstandenen Gewebsschadens. Inflammatorische Reaktionen können jedoch auch überproportional und überschießend sein. Dies wird durch ein Verstärkungssystem, das zusätzliche Komponenten des Abwehrsystems rekrutiert, erreicht. In diesem System kann es zum Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren kommen. Damit kann der primäre Abwehrmechanismus potentiell zu einer Schädigung führen [37,38,39]. Bei einigen Einwirkungen treten Schädigungen an Organen und Geweben erst durch die überschießende inflammatorischen Reaktion auf das Primäreignis ein, welches isoliert nicht zu Schädigungen solchen Ausmaßes geführt hätte.

Stimuli für die Auslösung eines systemischen inflammatorischen Reaktions Syndroms (SIRS) sind unter anderem chirurgische Traumata, Fremdoberflächenkontakt und Ischämie-Reperfusionsvorgänge [100, 101, 102].

Es ist seit Jahrzehnten bekannt, dass eine Unterbrechung der Blutversorgung von Geweben (Ischämie) zu schweren zellulären Dysfunktionen und abhängig von der Dauer der Ischämie letztendlich zum Zelltod führt. Durch Ischämien ausgelöste Krankheiten tragen weltweit entscheidenden Anteil an Morbidität und Mortalität. Das ärztliche therapeutische Handeln zielt zunächst direkt auf die Wiederherstellung des Blutflusses ab. Jedoch ist in den letzten 15 Jahren immer offensichtlicher geworden, dass die Wiederherstellung des Blutflusses in das ischämische Gewebe (Reperfusion) diesen Arealen weiteren Schaden zufügt [2,65-68,70,71]. Diese Art der Schädigung wird daher auch Ischämie-Reperfusion-Schädigung genannt.

Diese hat nicht nur pathologische Konsequenzen für das betroffene Gewebe, sondern in unterschiedlichem Ausmaß auch für den gesamten Organismus.

Dabei ist das Ausmaß der lokalen und systemischen Inflammation sehr unterschiedlich, von vielen Begleitumständen abhängig und letztendlich individuell nicht vorhersehbar.

In den letzten Jahren wurde das Komplementsystem als ein Haupteffektor des Reperfusionsschadens erkannt [103,105,107]. Die gemeinsame Endstrecke der pathophysiologischen Veränderungen bei einem SIRS ist die Störung der Mikrozirkulation. Dazu tragen verschiedene Mediatorsysteme und Zellkomponenten in einem Netzwerk von pro- und anti-inflammatorischen Mechanismen bei.

Die mikrovaskuläre Schädigung zeigt sich in einer erhöhten vaskulären Permeabilität, in einer Schädigung der vaskulären Endothelzelle und in einer mikrovaskulären Hämorrhagie. Dadurch kommt es zu einer Funktionsstörung des Gewebes bzw. Organs. Abb. 1 zeigt einen von mehreren denkbaren Mechanismen der Aktivierung von Leukozyten und Endothel, die zu Schädigung der Mikrozirkulation und schließlich zum SIRS führen kann.

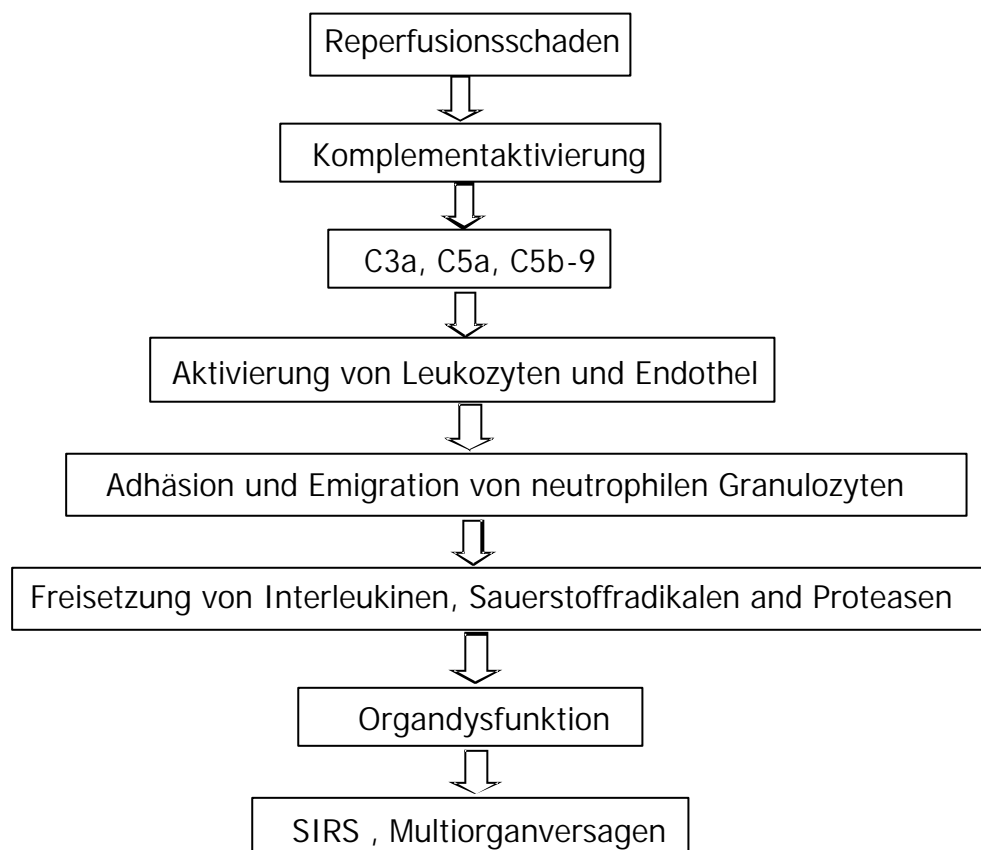


Abb.1 Pathophysiologische Veränderungen beim SIRS durch Ischämie/Reperfusionsschädigung

Die Grundlagen dieser morphologischen und funktionellen Veränderungen bilden Interaktionen zwischen aktivierten polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten

(PMN, Neutrophile) und aktivierten Endothelzellen sowie die programmierte Expression von Adhäsionsmolekülen als Grundlage einer Sequenz molekularer Interaktionen, die zur Margination, Adhäsion und transendothelialen Migration zirkulierender Leukozyten ins Gewebe führen [56]. Diese Sequenz ist in Abb.2 schematisch dargestellt und wird im Folgenden genauer beschrieben.

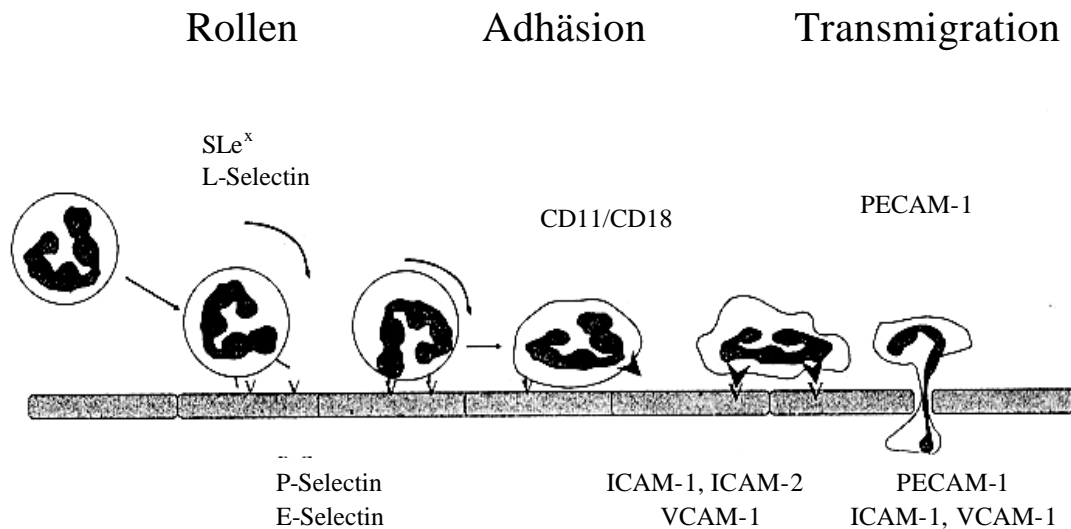


Abb.2 Interaktion von Endothelzellen und Neutrophilen: Expression von Adhäsionsmolekülen nach Aktivierung [83].

Das Rollen der PMN

Für den initialen Kontakt zwischen PMN und Endothelzelle ist eine spezielle Gruppe von Adhäsionsmolekülen, die sogenannten Selektine, verantwortlich. Diese Selektine bauen Bindungen zwischen PMN im strömenden Blut und Endothel auf. Drei verschiedene Selektine, konstitutiv auf Leukozyten exprimiertes L-Selektin (CD62L) sowie das auf aktiviertem Endothel vorkommende P-Selektin (CD62-P) und E-Selektin (CD62-E), übernehmen diese Aufgabe.

L-Selektin, das nach Aktivierung der Leukozyten enzymatisch abgespalten wird (Selektin shedding), bewirkt die initiale Bindung der PMN an das Endothel [30-33]. Diese initiale Bindung führt unmittelbar zu einer rollenden Bewegung der PMN um die eigene Achse entlang der Endothelbarriere. Das Rollen kommt durch eine Vielzahl von transienten, repetitiven Bindungen von Selektinen und deren Liganden zustande, wobei der L-Selektin-Expression besondere Bedeutung zufällt. Durch diese

Interaktionen, die letztendlich zum Rollen der PMN führen, werden die Leukozyten „eingefangen“ und aus dem Blutstrom abgebremst [54].

Jung et al konnten in Versuchen mit E- und P-Selektin-defizienten Mäusen nachweisen, dass L-Selektin unabhängig von den anderen Selektinen das Rollen von Leukozyten sowie die nachfolgende Adhäsion induzieren und vermitteln kann [49]. Auch Tedder et al konnten in Versuchen mit L-Selektin-defizienten Mäusen die prominente Rolle von L-Selektin bei der Rekrutierung von Leukozyten in das entzündete Gewebe aufzeigen [17].

Die Interaktion von P-Selektin und E-Selektin mit den Liganden auf den PMN reduziert die Rollgeschwindigkeit und trägt weiter zum Abbremsen der rollenden Bewegung bei. Die endothelialen Selektine sind induzierbar und weisen unterschiedliche Kinetiken auf. P-Selektin, welches in Weibel-Pallade-Körperchen in den Endothelzellen präformiert gespeichert ist, wird Minuten nach Endothelstimulation externalisiert. Die P-Selektin Expression ist jedoch transient und hat daher ihre Bedeutung vor allem in der Frühphase der Leukozytenmigration [34]. Die Expression von E-Selektin erreicht erst nach entsprechender Synthetisierung vier bis sechs Stunden nach Stimulation maximale Werte, die daraufhin wieder abnehmen [34,35].

Während des Rollens sind die Granulozyten vermehrt aktivierenden Stimuli ausgesetzt, insbesondere durch von den Endothelzellen sezernierte Chemokine.

Zusätzlich vermittelt die direkte Bindung zwischen den Adhäsionsmolekülen aktivierende intrazelluläre Signale („outside-in signalling“), die unter anderem auch zu einer erhöhten Expression vom β_2 -Integrin Mac-1 führen [55]. Die Hochregulation dieser Integrine auf der Oberfläche der Neutrophilen ist für die weitere und festere Adhäsion der Leukozyten am Endothel von Bedeutung.

Unterbindung des L-Selektin-abhängigen Rollens der Leukozyten [17,28] hemmt die Migration der PMN in das Gewebe, so dass das Selektin-vermittelte Rollen der Leukozyten als essentieller Schritt in der frühen Phase der Extravasation der Neutrophilen am Ort des entzündlichen Geschehens betrachtet werden muß.

Die Adhäsion der Granulozyten

Die nächsten Schritte, das feste Anheften der aktivierten PMN an der Endothelzelle und die Diapedese, werden von leukozytären β_2 -Integrinen (CD11b/CD18) und endothelialen Adhäsionsmolekülen der Immunglobulinklasse (ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, PECAM-1) vermittelt. Aktivierende Stimuli, unter anderem Komplementfaktoren und Interleukin 6, führen auf Leukozyten zu einer Erhöhung von funktionellem, d.h. bindungsfähigem CD11b/CD18 (Mac-1, CR3) mit entsprechend höherer Affinität und Avidität. Auf Endothelzellen führen diese aktivierenden Stimuli zu einer erhöhten Expression von vaskulären Adhäsionsmolekülen wie z.B. dem ICAM-1, welches als endothelialer Ligand für leukozytäres CD11b/CD18 fungiert. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung zwischen L-Selektin und seinen endothelialen Liganden, wie sie beim Rollen der Leukozyten auftreten, zu einer L-Selektin abhängigen Aktivierung der neutrophilen Granulozyten sowie zur verstärkten Expression von CD11b/CD18 (Mac-1) führt [29].

Alle diese phänotypischen Veränderungen gehen einher mit einer Verringerung der Rollgeschwindigkeit sowie dem Übertritt der PMN in die feste Adhäsion. Parallel wird im Zuge des Rollens der PMN L-Selektin von der Zellmembran enzymatisch abgespalten (L-Selektin-shedding) [47,48].

Die CD11b/CD18 – ICAM-1 Bindung ist deutlich stärker als die Bindungen zwischen den Selektinen und deren Liganden und führt zur festen Adhäsion der PMN an das Endothel. Diese adhäsive Bindung ist durch eine hohe Resistenz gegenüber den im strömenden Blut auftretenden Scherkräften gekennzeichnet und Voraussetzung für die mit hoher Wahrscheinlichkeit nachfolgende transendotheliale Migration der Granulozyten.

Transendotheliale Migration

Nach der festen Adhäsion beginnen die Granulozyten bei entsprechender Aktivierung von Endothel und Leukozyt mit einem Haptotaxis genannten Prozess [8]. Im Verlaufe dieses von Chemokinen (insbesondere endothelial sezerniertes IL-8) sowie Adhäsionsmolekülen (insbesondere PECAM-1, CD11b/CD18) gesteuerten

Vorgangs kommt es zum transzellulären wie auch parazellulären Durchtritt der Neutrophilen durch die Endothelbarriere und damit zur Extravasation von PMNs. Die Aggregation und Sequestration von aktivierten PMNs in der Mikrozirkulation diverser Organgewebe gilt als Schlüsselereignis in der Pathogenese des Multiorgansversagens (MOF) [20].

Interleukin 6

Neben den aktivierten Granulozyten und den Adhäsionsmolekülen spielen bei der Vermittlung der mikrovaskulären Veränderungen weitere Mediatorsysteme eine Rolle.

Zu den wichtigsten gehören das Zytokin- und das Komplementsystem.

Das Zytokinsystem umfaßt eine Gruppe von Polypeptidhormonen mit para- und autokriner Wirkung, die von Leukozyten, Endothelzellen und anderen immunologisch kompetenten Zellen synthetisiert und sezerniert werden.

Die Zytokine besitzen verschiedene, z.T. antagonistische Effekte auf ihre Zielzellen und haben sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen. TNF α , IL-1 und IL-6 sind die wesentlichen Zytokine, die eine Immunstimulation bis hin zur überschießenden Inflammation bewirken können. Dagegen wirken IL-10 und IL-13 immunsuppressiv.

Interleukin 6 (IL-6) kann von einer Vielzahl von Zellen produziert werden, unter anderem von Neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen [16]. Es ist einer der Hauptmediatoren einer systemischen inflammatorischen Reaktion [2]. Die Ausschüttung von IL-6 wird unter anderem durch IL-1 und TNF α stimuliert [57], aber auch durch Ischämie-Reperfusionsschädigungen [22,40,42]. Die Sekretion von IL-6 aus Monozyten kann auch durch aktivierten Komplementfaktor C5a induziert werden [23]. Selbst geringste Mengen Endotoxin stimulieren signifikante IL-6 Ausschüttungen [36]. Erhöhte IL-6 Konzentrationen wurden im Rahmen einer Sepsis [18] sowie nach Trauma [19,21] beobachtet. Interleukin 6 aktiviert PMNs, stimuliert die endotheliale Expression von ICAM-1 und steigert die endotheliale Permeabilität [41, 43]. Des Weiteren induziert IL-6 Expression von C5a-Rezeptoren in diversen Organen [104] sowie die hepatische Produktion von Akute Phase Proteinen und gilt als einer der Hauptmediatoren einer systemischen inflammatorischen Reaktion (SIRS) [41].

Komplementsystem

Das Komplementsystem spielt eine Schlüsselrolle in der Entstehung und Unterhaltung einer systemischen Inflammation. Es besteht aus einem komplizierten Netzwerk aus Plasma und Membran-Proteinen und ähnelt damit anderen Kaskadensystemen, wie z.B. dem Gerinnungssystem, dem Kallikreinsystem oder dem Fibrinolyse-System. Das Netzwerk und die Komponenten des Komplementsystems sind schematisch in Abb. 3 dargestellt.

Das Komplementsystem hat die Funktion, Inflammation zu initiieren, Pathogene zu zerstören, Immun-Komplexe zu eliminieren sowie Zellmembranen fremdartiger oder infizierter Zellen zu zerstören.

Die Aktivierung des Komplementsystems kann auf dem klassischen Weg durch Interaktion mit gebundenen Immunglobulinen, auf dem alternativen Weg durch Kontakt mit Oberflächen von Mikroorganismen (z.B. Lipopolysacchariden) sowie auf dem Lektin-Weg durch Bindung von mannanosehaltigen Proteinen oder Kohlenhydraten auf Mikroorganismen an im Serum befindliches mannanbindendes Lektin erfolgen. Zusätzlich kann Komplement aber auch durch sog. „akute Phase“ Proteine (z.B. C-reaktives Protein, Fibrinogen etc.), aktivierten Faktor XII (FXIIa), Fremdoberflächenkontakt, aber auch im Rahmen von Ischämie und Reperfusion aktiviert werden. Baldwin et al konnten zeigen, dass die Komplementkaskade durch die pathophysiologischen Abläufe während Ischämie und Reperfusion sowohl über den klassischen als auch den alternativen Weg aktiviert wird [69]. Väkevä, A. und Meri, S. wiesen nach, dass anoxisch geschädigtes Endothel im Gegensatz zu gesundem Endothel Komplement aktiviert [58]. In-vivo und in-vitro Studien deuten darauf hin, dass das Komplementsystem eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Gewebsschädigung nach Ischämie/Reperfusion spielt [3-5,84,95]. Allen Aktivierungswegen gemeinsam ist die Entstehung von Anaphylatoxinen (z.B. C3a, C5a) und eines terminalen Komplexes (C5b-9), der direkt Membranen von Zielzellen zerstören kann. Anaphylatoxine vermitteln verschiedene Entzündungsreaktionen wie Veränderung der Gefäßpermeabilität, Kontraktion der glatten Muskelzellen, Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten, Degranulation von Phagozyten sowie Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten [1,109]. Das Anaphylatoxin C5a wie auch der C5b-9-Komplex besitzen die Fähigkeit, PMNs zu aktivieren und deren Produktion und Sekretion von reaktiven Sauerstoff-Spezies, proteolytischen

Enzymen sowie pro-inflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-6) [23] zu stimulieren [6,7].

Die C1-Komponente des Komplementsystems gehört zum klassischen Weg der Komplementaktivierung. Die Kaskade wird durch Interaktion von C1 mit Immunglobulinen ausgelöst, die ihrerseits auf Zelloberflächen oder in Immunkomplexen gebunden sind. C1 kann aber auch antikörperunabhängig unter anderem durch C-reaktives Protein aktiviert werden [9,10], wodurch die Phagozytenrekrutierung in das Gewebe verstärkt wird. Weiterhin kann C1 auch direkt durch geschädigtes Gewebe oder Membran-Proteine antikörperunabhängig aktiviert werden [11]. C1 besteht strukturell und funktionell aus zwei Bausteinen, dem C1q-Protein und einem Tetramer aus je zwei C1r und C1s-Molekülen. Über die Bindung eines Immunglobulins an die C1q-Untereinheit kommt es zu einer Konfigurationsänderung des C1-Komplexes und nachfolgend zur katalytischen Aktivität von C1s und C1r, die den weiteren Reaktionsweg der Komplementaktivierung über den klassischen Weg einleitet.

KOMPLEMENTSYSTEM

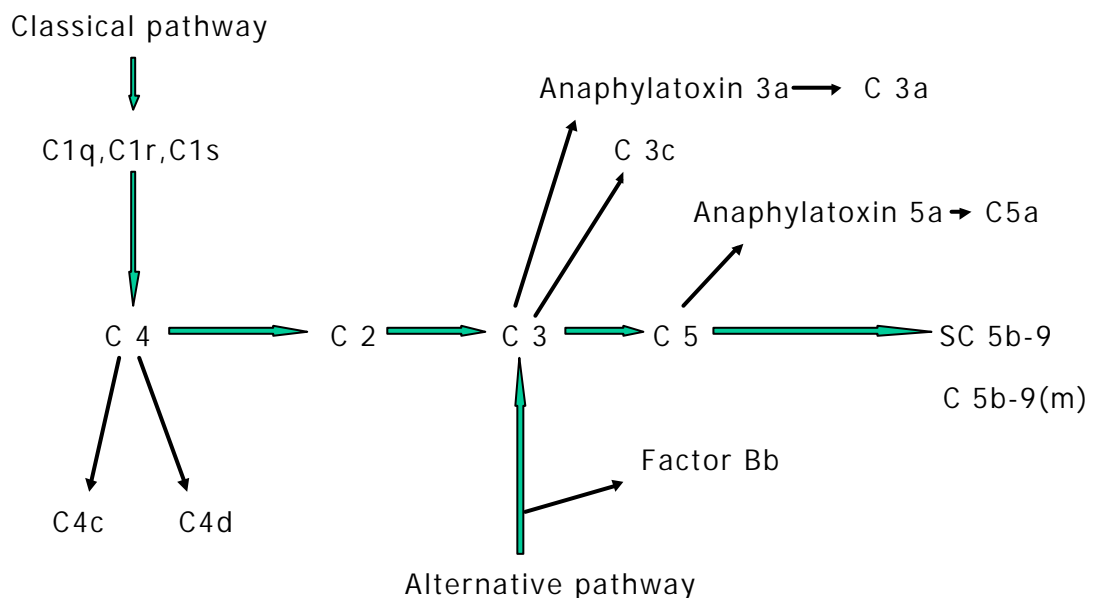


Abb.3 Komponenten und Aktivierungswege des Komplementsystems (von Bengtsson/Heidemann). Die schraffierten Pfeile charakterisieren die Bildung nachfolgender Komponenten, während die schmalen Pfeile den Zerfall einer Komponente in Spaltprodukte verdeutlichen. SC 5b-9 ist der lösliche terminale Komplex der Komplementkaskade, der nach Bindung an Zielzellen als membrangebundener Komplex C 5b-9(m) diese direkt durch Zellyse zerstören kann.

Inhibition des Komplementsystems

Die Komplementaktivierung stellt einen wichtigen Abwehrmechanismus des Organismus gegen Mikroorganismen dar. Die exzessive Stimulation kann jedoch zu schweren Schäden führen. Aus diesem Grunde wurden Wege gesucht, die Komplementaktivierung abzuschwächen bzw. zu steuern. Einen möglichen Ansatzpunkt dafür bildet der Einsatz von C1-Esterase-Inhibitoren.

Die C1-Untereinheiten C1r und C1s werden durch den Serinproteinaseinhibitor, C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH), gebunden und inaktiviert. Dieses Glykoprotein wird in Hepatozyten, Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen synthetisiert [12].

C1-INH ist der stärkste Inhibitor des klassischen Weges der Komplementaktivierung und der einzige Inaktivator von C1s und C1r [1]. In kürzlich veröffentlichten Publikationen konnte gezeigt werden, dass C1-INH zusätzlich sowohl den Lektin-Weg [110] als auch den alternativen Weg [106] der Komplementaktivierung inhibieren kann.

Darüber hinaus beeinflusst C1-INH neben dem Komplementsystem weitere Kaskadensysteme, vor allem das Gerinnungssystem, das Kallikrein/Kinin-System sowie die Fibrinolyse. Dies spiegelt sich in der hemmenden bzw. inaktivierenden Wirkung von C1-INH auf Faktor XII und Faktor XI, Kallikrein sowie die Plasminsynthese wieder [13]. Diese Wirkungen von C1-INH sind schematisch in Abb. 4 zusammengefaßt.

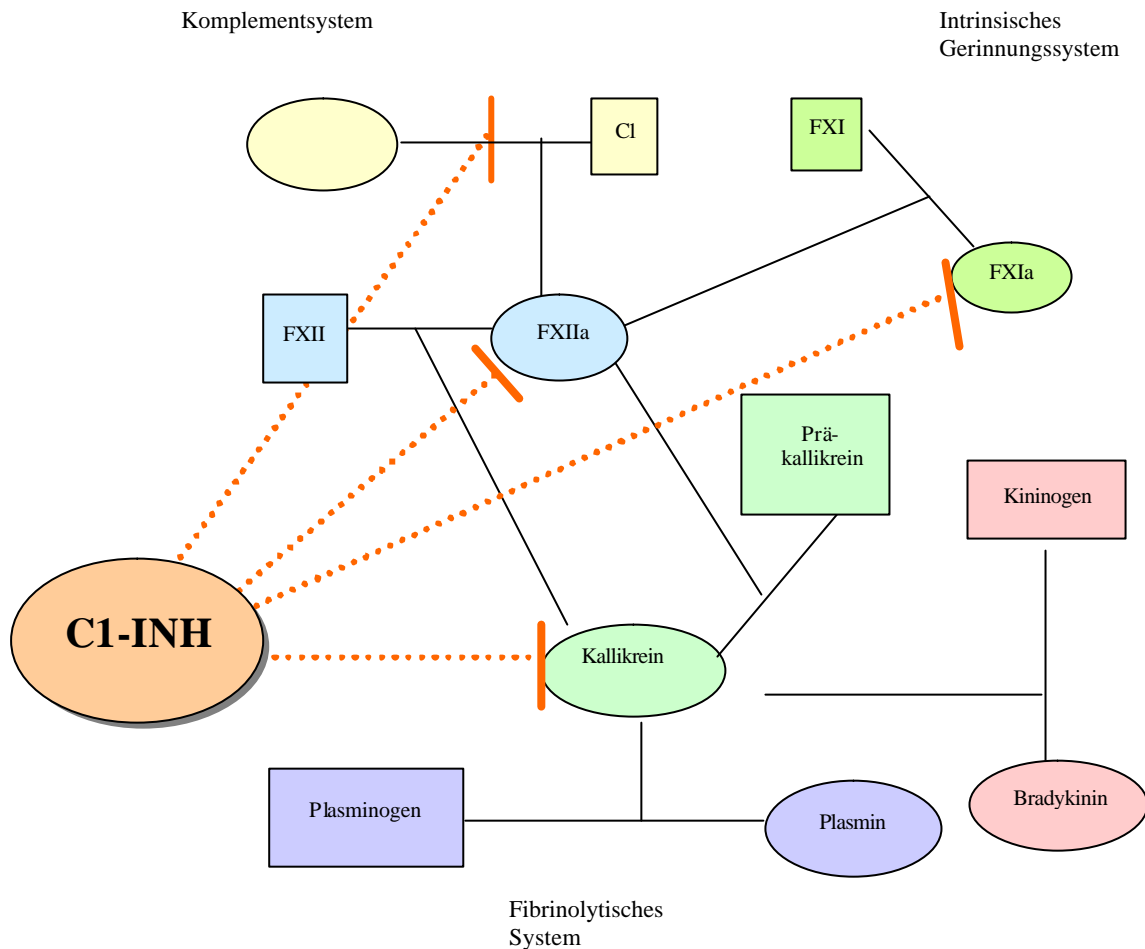


Abb.4 Beeinflussung des Komplementsystems, des Gerinnungs- und fibrinolytischen Systems durch C1-INH (modifiziert nach Zeerleder et al [13]).

Der klinische Einsatz von C1-INH beschränkte sich bisher auf die Therapie des hereditären Angioödems bei angeborenem C1-INH-Mangel [14,86,87]. In den letzten Jahren wurden einige Studien durchgeführt, die den Einsatz von C1-INH bei inflammatorischen Reaktionen verschiedener Ursachen und im Rahmen von Ischämie-Reperfusion-Vorgängen untersuchten [89,108].

Murohara, T. et al konnten am Rattenherz im Ischämie-Reperusionsmodell durch den Einsatz von C1-INH eine Abnahme der Myokardnekrose sowie eine geringere Neutrophilenakkumulation nachweisen [15]. Sie wiesen darauf hin, dass durch die selektive Hemmung des klassischen Wegs der Komplementaktivierung ein besserer Myokardschutz zu erzielen ist, als durch die Hemmung des alternativen Wegs der Komplementaktivierung.

Buerke, M. et al wiesen bei Katzen ebenfalls einen Schutz des Myokards vor Reperfusionsschäden durch den Einsatz von C1-INH nach [24]. Sie führten diesen Effekt auf eine Blockade des klassischen Wegs der Komplementaktivierung und auf eine Hemmung der Interaktion zwischen polymorphkernigen Leukozyten und dem Endothel zurück. In einer weiterführenden Untersuchung zeigten Buerke, M. et al, dass durch den Einsatz von C1-INH die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (P-Selektin und ICAM-1) reduziert wird [25]. Durch intrakoronare Anwendung von C1-INH im Schweinemodell senkten Horstick, G. et al die Infarktgröße um 33% [26]. Hack, C.E. et al konnten durch die Gabe von C1-INH bei Patienten mit septischem Schock die Komplement- und Kontaktaktivierung vermindern [27].

Die meisten bisherigen Untersuchungen zu den Auswirkungen einer selektiven Hemmung des Komplementsystems durch C1-INH bezogen sich auf Einflüsse, die direkt das geschädigte Organ oder Gewebe betreffen. Wenig ist jedoch über die Auswirkungen einer Hemmung des Komplementsystems bei einer systemischen Inflammation bekannt.

Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, die Auswirkungen eines chirurgischen Traumas sowie einer Ischämie/Reperfusionsschädigung auf die systemische inflammatorische Reaktion und die Mikrozirkulation außerhalb des ischämischen Areals sowie die Beeinflussung dieser Prozesse durch C1-INH zu untersuchen. Hierzu wurde ein Tiermodell an der Ratte konzipiert. Das chirurgische Trauma wurde durch die Präparation bzw. offene Katheterisierung der großen Halsgefäße und Trachiotomie und Intubation sowie Präparation und chirurgische Freilegung des M. cremaster ausgelöst. Die Ischämie/Reperfusionsschädigung erfolgte durch eine Tourniquet-Ischämie der hinteren Extremitäten über drei Stunden mit nachfolgender dreistündiger Reperfusion.

Zur Beantwortung der Frage, ob durch das chirurgische Trauma und die Ischämie/Reperfusionsschädigung eine systemische Inflammation ausgelöst wird, wurde Interleukin 6 im Plasma mittels ELISA gemessen. Als Zeichen der Leukozytenaktivierung wurden die Leukozytenaktivierungsmarker L-Selektin (CD62L) sowie CD11b/CD18 (CR3) mittels FACS-Analyse bestimmt. Zur Einschätzung und Quantifizierung der Auswirkungen obiger Einflüsse auf die Mikrozirkulation wurde das Leukozytenverhalten mittels Intravitalmikroskopie in postkapillären Venolen untersucht und arterielle bzw. venöse Blutströmungsgeschwindigkeiten sowie entsprechende Gefäßdurchmesser gemessen. Die Beeinflussung dieser Parameter durch frühe Hemmung des klassischen Weges der Komplementaktivierung wurde durch systemische Applikation von C1-INH untersucht.