

Aus der Universitätsklinik für Anästhesiologie  
mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin  
Campus Charité Mitte und Campus Virchow Klinikum  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

Untersuchung des Einflusses von  
C1-Esterase-Inhibitor in Kombination mit Faktor XIII  
auf die funktionelle Kapillardichte und die Leukozytenadhärenz  
in der intestinalen Mikrozirkulation bei experimenteller  
Endotoxinämie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Renata Izabella Kawka  
aus Skierniewice

Gutachter: 1. Prof. Dr. C. Spies  
2. Priv.-Doz. Dr. med. A. Pascher  
3. Priv.-Doz. Dr. med. H. Kern

Datum der Promotion: 19. März 2010

## INHALTSVERZEICHNIS

<b><u>1</u></b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>5</u></b>
<b>1.1</b>	<b>SEPSIS</b>	<b>5</b>
1.1.1	DEFINITIONEN	6
1.1.2	PATHOGENESE DER SEPSIS	8
1.1.3	BEDEUTUNG DES INTESTINUMS	14
1.1.4	BEDEUTUNG DES ENDOTHEL	15
<b>1.2</b>	<b>THERAPIEKONZEPTE BEI SEPSIS</b>	<b>16</b>
1.2.1	KAUSALE THERAPIE	16
1.2.2	SUPPORTIVE THERAPIE	16
1.2.3	ADJUNKTIVE THERAPIE	16
<b>1.3</b>	<b>C 1-ESTERASE-INHIBITOR</b>	<b>17</b>
1.3.1	STRUKTUR UND SYNTHESE	17
1.3.2	PHAMAKOKINETIK	17
1.3.3	PHARMAKODYNAMIK	17
1.3.4	THERAPEUTISCHE ANWENDUNG	18
1.3.5	TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN	18
1.3.6	KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN	18
<b>1.4</b>	<b>FAKTOR XIII</b>	<b>19</b>
1.4.1	STRUKTUR UND SYNTHESE	19
1.4.2	PHAMAKOKINETIK	19
1.4.3	PHARMAKODYNAMIK	19
1.4.4	THERAPEUTISCHE ANWENDUNG	20
1.4.5	EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN	20
1.4.6	KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN	21
<b><u>2</u></b>	<b><u>FRAGESTELLUNG</u></b>	<b><u>23</u></b>
<b><u>3</u></b>	<b><u>MATERIAL UND METHODIK</u></b>	<b><u>24</u></b>
<b>3.1</b>	<b>VERSUCHSTIERE</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>GRUPPENEINTEILUNG</b>	<b>24</b>
<b>3.3</b>	<b>VERSUCHSABLAUF</b>	<b>24</b>
<b>3.4</b>	<b>NARKOSEFÜHRUNG</b>	<b>25</b>
<b>3.5</b>	<b>OPERATIVE TECHNIKEN</b>	<b>25</b>
3.5.1	TRACHEOTOMIE UND KATHETERIMPLANTATION	25
3.5.2	DARMPRÄPARATION	26
<b>3.6</b>	<b>MONITORING</b>	<b>26</b>
<b>3.7</b>	<b>VOLUMENSUBSTITUTION UND MEDIKAMENTENZUFUHR</b>	<b>27</b>
<b>3.8</b>	<b>ENDOTOXINMODEL</b>	<b>27</b>
<b>3.9</b>	<b>INTRAVITALMIKROSKOPIE</b>	<b>27</b>
3.9.1	TECHNIK	27
3.9.2	DURCHFÜHRUNG DER INTRAVITALMIKROSKOPIE	29
3.9.3	FUNKTIONELLE KAPILLARDICHTE	29
3.9.4	LEUKZYTENADHÄRENZ	30
<b>3.10</b>	<b>LABORPARAMETER</b>	<b>32</b>
3.10.1	LEUKOZYTEN	32
3.10.2	GERINNUNGSFAKTOREN	32
<b>3.11</b>	<b>STATISTISCHE METHODEN</b>	<b>32</b>

<b><u>4</u></b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b><u>34</u></b>
<b>4.1</b>	<b>INTRAVITALMIKROSKOPIE</b>	<b>34</b>
4.1.1	FUNKTIONELLE KAPILLARDICHTE	34
4.1.2	LEUKOZYTENADHÄRENZ	37
<b>4.2</b>	<b>LABORPARAMETER</b>	<b>41</b>
4.2.1	LEUKOZYTEN	41
4.2.2	C1-ESTERASE-INHIBITOR-AKTIVITÄT	41
4.2.3	FAKTOR-XIII-AKTIVITÄT	42
4.2.4	ANTITHROMBIN-III-AKTIVITÄT	42
<b>4.3</b>	<b>HÄMODYNAMIK</b>	<b>43</b>
4.3.1	HERZFREQUENZ	43
4.3.2	MITTLERER ARTERIELLER BLUTDRUCK	43
<b><u>5</u></b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b><u>44</u></b>
<b>5.1</b>	<b>METHODIK</b>	<b>44</b>
5.1.1	SEPSISMODELL	44
<b>5.2</b>	<b>INTRAVITALMIKROSKOPIE</b>	<b>47</b>
5.2.1	FUNKTIONELLE KAPILLARDICHTE	47
5.2.2	LEUKOZYTENADHÄRENZ	49
<b>5.3</b>	<b>LABORPARAMETER</b>	<b>53</b>
5.3.1	LEUKOZYTEN	53
5.3.2	C1-INH-, FXIII- UND ATIII-AKTIVITÄT	54
<b>5.4</b>	<b>HÄMODYNAMIK</b>	<b>55</b>
<b><u>6</u></b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>56</u></b>
<b><u>7</u></b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>58</u></b>
<b><u>8</u></b>	<b><u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>69</u></b>
<b><u>9</u></b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b><u>73</u></b>
<b><u>10</u></b>	<b><u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</u></b>	<b><u>74</u></b>
<b><u>11</u></b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b><u>75</u></b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 SEPSIS

Sepsis und septischer Schock sind trotz aller Fortschritte der modernen Medizin eine der Haupttodesursachen auf nichtkardiologischen Intensivstationen. Die steigende Inzidenz wird durch die Zunahme diagnostischer und therapeutischer invasiver Techniken (Punktionen, intravaskuläre Katheter, Blasen Katheter, Intubation) verursacht. Durch die Verbesserung der medizinischen Versorgung haben die Patienten mit chronischen Erkrankungen zwar eine erhöhte Lebenserwartung, aber auch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionserkrankungen. Zu dem werden die Inzidenz und Mortalität durch den zunehmenden Einsatz immunsuppressiver Medikamente sowie die zunehmende Resistenz der Mikroorganismen beeinflusst [1].

Eine aktuelle Studie, die durch das „Kompetenznetzwerk Sepsis“ durchgeführt wurde, zeigte, dass die Sepsis mit 154.000 Erkrankten die siebthäufigste Krankenhausentlassungsdiagnose unter den lebensbedrohlichen Erkrankungen pro Jahr in Deutschland darstellt [2]. Dabei wurde bei 75.000 Einwohnern (110 von 100.000) eine schwere Sepsis bzw. septischer Schock diagnostiziert und bei 79.000 (116 von 100.000) eine Sepsis. Die 90-Tage-Sterblichkeit betrug 54 % (ca. 60.000 Todesfälle). Septische Erkrankungen sind die dritthäufigste Todesursache nach der chronischen koronaren Herzkrankheit und dem akuten Myokardinfarkt.

Die offizielle Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes hingegen geht von ca. 39.000 erkrankten Patienten pro Jahr in Deutschland aus, von denen ca. 6.000 versterben. Die Diskrepanz ist auf die unzureichende Definition in der ICD-10 Kodierung zurückzuführen, deshalb wurde diese ab dem Jahr 2007 durch eine Zusatzkodierung ergänzt.

Die Therapie- und Behandlungskosten der Patienten mit schwerer Sepsis auf der Intensivstation liegen in Deutschland bei schätzungsweise 1,77 Milliarden Euro, was ca. 30 % der Kosten ausmacht, die auf Intensivstationen insgesamt anfallen [1].

Eine Studie aus von Angus et al. aus dem Jahr 2001 zeigt, dass die Inzidenz einer schweren Sepsis in den USA bei etwa 751.000 Menschen pro Jahr liegt und die Letalität bei 28,6 %, was 21.500 Todesfällen entspricht. Die Sepsis verursacht in den USA Kosten von ca. 16,7 Milliarden Dollar jährlich [3].

### 1.1.1 DEFINITIONEN

Der Terminus Sepsis leitet sich von dem griechischen Wort σηπω ab, was „faul machen“ bedeutet. Dieser wurde bereits ca. 460-370 v. Chr. von Hippokrates eingeführt, der von einem Fieber berichtete, das durch eine faulende Materie verursacht wird [4].

Heute wird die Sepsis als „die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen“ verstanden [5].

Auf der International Sepsis Definitions Conference im Jahr 2001 wurden die Definitionen für Sepsis, schwere Sepsis, septischer Schock, Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) und Multiorganversagen (MOV) auf Anlehnung auf die Kriterien der „Society of Critical Care Medicine“ und des „American College of Chest Physicians“ (ACCP/SCCM) Consensus Conference neu evaluiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Diagnosekriterien der Sepsis entsprechend den Kriterien der ACCP/SCCM Consensus-Conference [6].

Infektion	<ul style="list-style-type: none"><li>• dokumentiert oder vermutet</li></ul>
Allgemeine Parameter	<ul style="list-style-type: none"><li>• Fieber &gt; 38°C Kerntemperatur</li><li>• Hypothermie &lt; 36°C Kerntemperatur</li><li>• Herzfrequenz &gt; 90/min</li><li>• Tachypnoe &gt; 20/min</li><li>• veränderter mentaler Status</li><li>• Ödeme oder positive Bilanz (&gt; 20ml/kg KG in 24 h)</li><li>• Hyperglykämie (Glukose &gt; 120mg/dl, kein Diabetes)</li></ul>
Inflamationsparameter	<ul style="list-style-type: none"><li>• Leukozytose &gt; 12000/mm<sup>3</sup> oder Leukopenie &lt; 4000/mm<sup>3</sup> oder &gt;10 % unreife Neutrophile im Differentialblutbild</li><li>• C-reaktives Protein (CRP) &gt; 2 Standardabweichungen (SD) oberhalb der Norm</li><li>• Procalcitonin (PCT) &gt; 2 SD oberhalb der Norm</li></ul>

Hämodynamische Parameter	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Arterielle Hypotension (syst. art. Blutdruck &lt; 90 mmHg, MAP &lt; 70 mmHg, oder systol. Druckabfall &gt; 40 mmHg bei Erwachsenen oder &lt; 2 SD unter altersentsprechendem Normwert)</li> <li>• SvO<sub>2</sub> &gt; 70 %</li> <li>• Herzindex &gt; 3.5 l/min/m<sup>2</sup></li> </ul>
Parameter der Organdysfunktion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• arterielle Hypoxämie (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> &lt; 300)</li> <li>• Oligurie (Diurese &lt; 0,5 ml/kg/h über mindestens 2h)</li> <li>• Kreatinin-Anstieg 0,5 mg/dl</li> <li>• Gerinnungsstörung (INR &gt; 1.5 oder aPTT &gt; 60 sec)</li> <li>• Ileus (fehlende Darmgeräusche)</li> <li>• Thrombocytopenie (&lt; 100.000/μl)</li> <li>• Hyperbilirubinämie (Gesamtbilirubin &gt; 4 mg/dl)</li> </ul>
Parameter der Gewebepfusion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hyperlaktatämie &gt; 1 mmol/l</li> <li>• reduzierte Kapillarfüllung</li> </ul>

Eine **schwere Sepsis** ist eine Sepsis mit zusätzlich einer oder mehreren Organdysfunktionen. Von einem **septischen Schock** spricht man, wenn während einer Sepsis ein akutes Kreislaufversagen mit einer persistierenden Hypotension auftritt, die durch eine adäquate Volumensubstitution nicht behoben werden kann.

Das **Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)** wird als Sammelbegriff für systemische inflammatorische Antwort auf verschiedene Auslöser nicht infektiöser oder nicht gesicherter infektiöser Genese definiert wie z. B. Trauma, Verbrennung, Intoxikation oder Pankreatitis. Im Unterschied dazu bleibt der Begriff Sepsis einer systemischen inflammatorischen Reaktion mit vermuteter oder gesicherter infektiöser Genese vorbehalten. In der Studie von Audebert et al. wurde bei 38 % Patienten eine Infektion als sicher, bei 58 % als wahrscheinlich nachgewiesen, wobei bei 29 % der Patienten grampositive Erreger, bei 23 % gramnegative Keime und bei 19 % Mischinfektionen nachgewiesen werden konnten. Bei 10 % der Patienten wurde eine

Pilzinfektion diagnostiziert [7]. Unabhängig von der Auslöserart ist die Pathophysiologie der Entzündungsreaktion des Organismus gleich.

Eine weitere gefürchtete und mit einer sehr hohen Letalität verbundene Komplikation der Sepsis ist das **Multiorganversagen** (MOV). Hierbei ist die zeitliche Dynamik sowie die Interaktion zwischen den einzelnen Organsystemen von Bedeutung. Dabei wird eine primäre Organdysfunktion als Folge der unmittelbaren Schädigung von einer sekundären Organdysfunktion als Folge der Abwehrreaktion des Körpers unterscheiden.

Die Definition der 1991 niedergeschriebenen Sepsis-Kriterien hat sich zwar bewährt, eine Schweregradeinteilung der Sepsis ist jedoch kaum möglich. 2001 kam es zu einer erneuten Konferenz, auf der ein Klassifikationssystem für Sepsis vorgestellt wurde. Das **PIRO-Konzept** stratifiziert die Patienten auf der Grundlage ihres Risikos und setzt sich aus folgenden Kriterien zusammen:

- **PREDISPOSITION** (Vorerkrankungen, genetische Faktoren)
- **INSULT** (Infektion, Trauma, Ischämie)
- **RESPONSE** (Inflammationsreaktion, Fieber, Zytokine)
- **ORGAN DYSFUNCTION** (Anzahl betroffener Organsysteme)

Dieses Konzept hat zurzeit allerdings noch keine klinische Bedeutung, da es einer Evaluierung in der klinischen Routine sowie einer Verbesserung bedarf, damit es hier angewendet werden kann [6].

#### 1.1.2 PATHOGENESE DER SEPSIS

Kommt es zur Invasion von Mikroorganismen in den Körper, wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Dabei ist das Ausmaß der Reaktion weniger durch die Zahl, Pathogenität und Virulenz der Erreger bestimmt, sondern mehr durch die Funktion der körpereigenen Abwehrmechanismen sowie der Reaktion des Organismus [8].

Im Normalfall ist das Immunsystem in der Lage, durch gerichtete Aktivierung der Abwehrfunktionen die Mikroorganismen zu eliminieren. Versagt diese Abwehr wie z.B. im Rahmen der Sepsis, kommt es zur Einschwemmung pathogener Keime oder deren toxischer Produkte in die Blutbahn und damit zu einer unkontrollierten und überschießenden Entzündungsreaktion des Organismus. Hierbei reagiert der Organismus mit Aktivierung der immunologischen Abwehrsysteme. Im Rahmen der

bakteriellen Sepsis kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems, des Gerinnungs-Fibrinolyse-Systems und des Kallikrein-Kinin-Systems [9]. Es kommt zur Aktivierung von Entzündungszellen wie Makrophagen, Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten und Endothelzellen mit einer überschießenden Freisetzung verschiedener Mediatoren [10]. Zu diesen gehören Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukine (IL), Prostaglandine (PG), Interferone (IFN) und freie Sauerstoffradikale, die nicht nur eine proinflammatorische, sondern eine antiinflammatorische Wirkung besitzen können. Normalerweise herrscht im Körper ein ausgewogenes Verhältnis innerhalb dieser Systeme. Bei der Sepsis kann die überschießende Entzündungsreaktion zu Dysbalancen führen. Durch die gesteigerte Mediatorenfreisetzung (Mediatorenexplosion) kommt es zu Permeabilitätsstörungen des Endothels mit Ödembildung (capillary leakage). Durch die verstärkte Vasodilatation kommt es zur Makro- und Mikrozirkulationsstörung mit einer hyperdynamen Kreislaufreaktion und somit zur hypoxischen Gewebsschädigung. Weiterhin kommt es zur direkten toxischen Schädigung des Gewebes mit anschließender Apoptose. Dies alles kann zu einem Multiorganversagen und somit zu einer vitalen Bedrohung des Patienten führen [11].

#### 1.1.2.1 *ENDOTOXIN UND ENDOTOXINREZEPTOREN*

Zu den mikrobiellen Antigenen der pathogenen Keime gehören das Lipopolysaccharid (Endotoxin) gramnegativer Bakterien, Zellwandbestandteile von Bakterien oder Pilzen wie Peptidoglykane und Lipoeichonsäuren, virale Nukleinsäuren und Bestandteile von Parasiten. Diese werden mittels Rezeptoren vor allem durch Leukozyten erkannt und lösen infolgedessen eine Entzündungskaskade [12]. In unserem tierexperimentellen Modell haben wir das Endotoxin von *Escherichia coli* eingesetzt.

Endotoxine sind Bestandteile der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien. Biochemisch handelt es sich um Lipopolysaccharide (LPS). Diese bestehen aus einem für alle Bakterien einheitlichen Lipidanteil (Lipid A) und einem variablen Polysaccharidanteil, der in eine Kernregion (core) und ein O-Antigen unterteilt ist. Das O-Antigen, was aus der Oberfläche der Bakterien hervorragt, ist über die Core-Struktur mit dem fest in der Membran verankertem Lipid A kovalent verbunden.

Das O-Antigen ist variabel in Länge und Zusammensetzung und ist somit spezifisch für bestimmte Bakterienspezies, sodass die Typisierung verschiedener Stämme möglich ist („fingerprint“). Gegen diesen Bestandteil werden stereotypspezifische Antikörper

gebildet, die zu einer Opsonierung und Phagozytose des Bakteriums führen. Das isolierte O-Antigen ist wenig toxisch. Für die Toxizität des Bakteriums ist das Lipid A verantwortlich. Diese Struktur ist essenziell für das Überleben von Bakterien und für deren biologische Aktivität zuständig wie z.B. die Fähigkeit zur Zytokininduktion. Oft werden die Begriffe Endotoxin und Lipopolysaccharid als Synonym gebraucht, nach dem letzten Stand der Wissenschaft entspricht das Endotoxin dem Lipid A [13].

Die Lipopolysaccharide werden von Bakterien während des Wachstums oder ihrer Zerstörung freigesetzt. Gelangen diese in den Blutstrom, binden sie sich an das Lipopolysaccharid-bindende Protein (LBP). Über membranständige CD14-Rezeptoren (Cluster of Differentiation) kommt es zum Andocken des LPS-LBP-Komplexes an die Zelloberfläche von Monozyten und Makrophagen. Die so aktivierte Zelle wird zur Synthese proinflammatorischer Zytokine angeregt [14].

Das LBP wird in der Leber als ein Akut-Phase-Protein sezerniert und verstärkt durch die hohe Affinität zu LPS dessen Toxizität dramatisch [15]. Bereits niedrig dosiertes LBP kann die Zytokinausschüttung von Monozyten um den Faktor 100 bis 1000 verstärken. In Anwesenheit von LBP sind LPS-Mengen von 1 µg/ml ausreichend, um die Sezernierung der proinflammatorischen Zytokine IL-1β, IL-6 und TNF-α durch Makrophagen auszulösen [16].

Das membrangebundene CD14 (mCD14) ist ein Glykoprotein, das sich auf der Zelloberfläche aller reifen myeloischen Zellen befindet [17]. Das CD14 Molekül ist kein transmembranöser Rezeptor und ist nicht zur Signaltransduktion durch Endotoxin befähigt. Es ist über einen Glycophosphatidylinositolanker (GPI) mit der Zellmembran verbunden, der eine gewisse Mobilität des Rezeptors ermöglicht [18]. Für die Signaltransduktion sind „Toll-like“-Rezeptoren verantwortlich. Diese „Toll-like“-Rezeptoren sind somit die Schlüsselmoleküle bei der Interaktion zwischen mikrobiellen Fremdstrukturen wie LPS und dem angeborenen Immunsystem. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt über eine Signaltransduktionskaskade zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. nukleärem Faktor-κB (NF-κB) und zur Synthese proinflammatorischer Mediatoren wie z.B. TNF-α, IL-1, IL-6 [19].

Das lösliche CD14 (sCD14) wird entweder durch Abspaltung von seinem Lipidanker von der Zelloberfläche abgegeben („shedding“) oder aber als lösliches Protein sezerniert [20]. Lösliches sCD14 kann einerseits endotoxinneutralisierend wirken, indem es die

Bindung von LPS und LPS/LBP-Komplexen an Monozyten inhibiert. Andererseits können LPS/LBP-Komplexe Zellen aktivieren, die CD14 nicht an der Membranoberfläche exprimieren wie z.B. Endothelzellen.

LPS kann ebenfalls an andere Serumproteine gebunden werden, die entweder als Transporter (LDL, Albumin, Transferrin) oder als neutralisierende Proteine (HDL, BPI, Komplementfaktoren C1 und C3, Apolipoprotein) wirken.

#### 1.1.2.2 *MEDIATOREN*

Im Rahmen einer Reaktion auf die Mikroorganismen und deren Produkte kommt es zu Aktivierung von Entzündungszellen, die eine Vielzahl humoraler Entzündungsmediatoren freisetzt. Kommt es zu einer überschießenden und lang anhaltenden Stimulation der Entzündungszellen, kann es zu einer Mediatorenexplosion und damit zur Generalisierung der Entzündungsreaktion kommen.

Initial kommt es zur Freisetzung der frühen Mediatoren, zu denen Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IL-18 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) gehören. Diese rufen durch ihre Einwirkung auf neutrophile Granulozyten, Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Thrombozyten eine inflammatorische Reaktion hervor und werden somit als Aktivatoren bezeichnet. Als Reaktion darauf werden die antiinflammatorischen Kaskaden mit der Freisetzung der antiinflammatorischen Zytokine wie IL-4, IL-10, IL-13 und Transforming Growth Factor (TGF- $\beta$ ) aktiviert.

Zu den sekundären Mediatoren gehören die Eicosanoide, Proteasen, Sauerstoffradikale und Stickoxid, die für die direkte funktionelle und strukturelle Schädigung am Endothel und Parenchymzellen verantwortlich sind. Diese werden auch als Effektoren bezeichnet [21].

Darüber hinaus kommt es zu Aktivierung des Komplementsystems, des Gerinnungs-, Fibrinolyse- und des Kallikrein-Kinin-Systems.

#### 1.1.2.3 *KOMPLEMENTSYSTEM*

Das Komplementsystem besteht aus einer Kaskade von ca. 30 Komplementfaktoren, die meistens in der Leber synthetisiert werden.

Das Komplementsystem kann auf drei Wegen aktiviert werden. Der klassische Aktivierungsweg der Komplementkaskade wird durch Antigen-Antikörper-Komplexe oder durch aktivierten Faktor XII (FXIIa) aktiviert [22, 23]. Der alternative Aktivierungsweg des Komplementsystems wird durch fremde Oberflächen wie z.B. Endotoxin (Lipopolysaccharide) aktiviert. Der dritte Weg der Aktivierung geht über den Lectin-Weg, bei dem Mannose bindendes Lectin (MBL) bakterielle Antigene erkennt. Alle Aktivierungswege führen schließlich zur Bildung des so genannten Membranangriffskomplexes und zur osmotischen Lyse der Zielzelle oder des Mikroorganismus durch Bildung von Poren in der Zellmembran [24]. Weiterhin kommt es durch die Aktivierung der Komplementkaskade zur Induktion der Mastzelldegranulierung mit Anaphylatoxine (C3a, C4a, C5a). Die Anaphylatoxine vermitteln verschiedene Entzündungsreaktionen wie Veränderung der Gefäßpermeabilität, Kontraktion der glatten Muskelzellen, Chemotaxis der neutrophilen Granulozyten sowie Aktivierung und Aggregation von Thrombozyten.

Das Komplementsystem wird durch Inhibitoren reguliert, die eine überschießende Komplementaktivierung verhindern. C1-Esterase-Inhibitor ist der wichtigste Inhibitor des klassischen Aktivierungswegs des Komplementsystems (C1s und C1r), des Kallikrein-Kinin-Systems (Faktor XIIa und Kallikrein) und der intrinsischen Gerinnung (Faktor XIa) [25, 26].

#### 1.1.2.4 GERINNUNGSSYSTEM

An der Erhaltung der Balance des Gerinnungssystems ist neben den Thrombozyten, Plasmafaktoren und dem Endothel auch das Fibrinolyse-System beteiligt. Bei der Sepsis entgleist das System durch Aktivierung der Gerinnung mit Thrombenbildung einerseits und Verbrauch von Plasmafaktoren und Thrombozyten mit erhöhter Blutungsneigung andererseits. Die Aktivierung der Gerinnungskaskade erfolgt über das extrinsische System, wobei das Endotoxin durch TNF- $\alpha$  zur Expression von Gewebefaktor Tissue Factor (TF) auf Endothelzellen und Monozyten führt [27, 28]. Gleichzeitig wird die Expression des Thrombomodulins gehemmt, was einen wesentlichen Faktor bei der Aktivierung des endogenen Antikoagulans Protein C darstellt [29].

#### 1.1.2.5 LEUKOZYTEN UND LEUKOZYTEN-ENDOTHEL-INTERAKTION

Im Rahmen einer Erregerabwehr kommt es zur Aktivierung von Leukozyten durch Mediatoren und zu ihrer Migration aus der Blutbahn ins Gewebe. Dieser Vorgang der

Leukozytenmargination aus der Gefäßmitte, die temporäre Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel („Rolling“), die feste Adhäsion am Endothel („Sticking“) und die Diapedese der Leukozyten durch das Endothel sowie Migration in das umliegende Gewebe werden als Leukozyten/Endothel-Interaktion bezeichnet [30].

Während einer Sepsis kommt es zu einer überschießenden Leukozytenaktivierung mit erhöhter Adhärenz der Leukozyten an der Gefäßwand, was zur Behinderung des Blutflusses und Verlegung der Blutbahn führen kann. Im Gewebe setzen die Leukozyten vermehrt Prostaglandine, Leukotriene und freie Sauerstoffradikale frei, die zur Schädigung des Gefäßendothels, Störung der Mikrozirkulation und Organversagen führen können.

Entscheidend für die Leukozyten/Endothel-Interaktion ist die verstärkte Expression von leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen während einer Entzündungsreaktion [31].

#### 1.1.2.5.1 LEUKOZYTEN-ROLLING

Eine wichtige Rolle im Prozess des initialen Kontakts der Leukozyten mit Endothelzellen und des Rolling von Leukozyten entlang Endothelzellen spielen die Selectine.

L-Selectin, das kleinste der Selectine, wird reichlich auf Granulozyten, Monozyten und zirkulierenden Lymphozyten exprimiert. In seiner Rezeptorfunktion erkennt es komplexe Zuckerstrukturen wie z.B. das Sialyl-Lewisx-Antigen (SLe<sup>x</sup>) und ist somit für das primäre Andocken der Leukozyten an das Endothel verantwortlich. Diese initiale Bindung geht direkt in eine rollende Bewegung über, bei der sich die Zellen im Blutstrom um ihre eigene Achse drehen. In einem Gefäß rollen die Leukozyten mit einer Geschwindigkeit von ca. 50µm/s. L-Selectin präsentiert selbst das SLe<sup>x</sup>- enthaltende Epitope und ist ein Ligand für die P- und E-Selectine [32].

P-Selectin ist das größte der bekannten Selectine. Es ist in Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen gespeichert und wird nach kurzer Stimulation z.B. mit LPS, TNF-α oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> innerhalb weniger Minuten auf der Oberfläche des Endothels exprimiert. Die Expression ist jedoch nicht dauerhaft und scheint somit nur in der Frühphase der Leukozytenadhäsion von Bedeutung zu sein [33].

E-Selectin wird ausschließlich auf Zytokin- und/oder LPS-aktivierten Endothelzellen gefunden, somit spielt E-Selectin eine wichtige Rolle bei der Granulozytenmigration durch zytokinaktivierte Endothelzellen. Die maximale Expression findet nach vier

Stunden statt und hält ca. 24 Stunden an. An E-Selectin binden hauptsächlich Granulozyten, aber auch Monozyten und einige T-Zell-Subpopulationen [34].

#### 1.1.2.5.2 LEUKOZYTEN-STICKING

Das Leukozyten-Rolling kann zu einer festen Adhäsion der Leukozyten am Endothel führen. Die Leukozyten, die in postkapillaren Venolen für Minuten 30 Sekunden haften bleiben, werden als Sticker bezeichnet [35]. Das feste Anheften der aktivierten Leukozyten an aktivierte Endothelzellen und die Diapedese werden von Integrinen (CD11/CD18) und „de novo“ synthetisierten endothelialen Adhäsionsmolekülen vermittelt. Integrine sind Heterodimere, die aus größeren  $\alpha$ -Untereinheiten und kleineren  $\beta$ -Untereinheiten bestehen und als Transmembranproteine ihren Hauptteil extrazellulär exponieren. Die Subfamilie der  $\beta$ 2-Integrine kommt nur auf weißen Blutzellen vor und wird entsprechend den Zelltypen unterschieden. Somit werden LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1, CD11a/CD18,  $\alpha$ L $\beta$ 2-Integrin) auf Lymphozyten und Mac-1 (CD11b/CD18,  $\alpha$ M $\beta$ 2-Integrin) auf Granulozyten/Monozyten ständig exprimiert. Durch chemotaktische Aktivierung kommt es zu einer schnellen Actin-Polymerisierung in den Granulozyten und gleichzeitig zu einem Rearrangement der Integrine an deren Oberfläche, was eine Anheftung der Integrine an das Zytoskelett verursacht. Gleichzeitig führt die Stimulation des Endothels zur Synthesesteigerung von interzellularen Adhäsionsmolekülen ICAM-1 und ICAM-2, den Liganden für Integrine. ICAM-1 ist der wichtigste physiologische Ligand für Integrine auf dem Endothel. Er kann ebenfalls auf einer Vielzahl anderen Zellen wie z.B. auf Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten exprimiert werden. Konstitutiv wird er nur wenig exprimiert. Seine Synthese wird durch Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1, aber auch durch bakterielle Lipopolysaccharide um das 2-5-fache erhöht. ICAM-2 kommt dagegen auch an nicht aktivierten Endothelzellen vor. Seine Synthese ist von den Entzündungsmediatoren unabhängig, aus diesem Grund wird ICAM-2 eine Bedeutung bei der Lymphozyten-Rezirkulation zugeschrieben [36].

#### 1.1.3 BEDEUTUNG DES INTESTINUMS

Im Rahmen einer Sepsis kommt es durch Umverteilung der Durchblutung zu Gunsten von Gehirn und Herz zu einer Minderdurchblutung des Darmes. Durch Störungen der Mikrozirkulation und Minderperfusion kommt es am Darm verstärkt zu O<sub>2</sub>-Diffusion von

der Arteriole in die Vene, was zu einer Abnahme der Oxygenierung der Endozotten führt. Dadurch kann es zu Läsionen, Ödem und Nekrosen des Darmepithels kommen, was durch eine direkte Schädigung durch freie Sauerstoffradikale sowie Proteasen verstärkt wird [37]. Der Darm verliert somit seine wichtige immunologische Barrierefunktion. Es kommt zur Translokation von Bakterien und Toxinen in das portale Stromgebiet [38]. Dadurch wird das septische Geschehen forciert. Der Darm wird deshalb auch als „Motor der Sepsis“ bezeichnet [39].

#### 1.1.4 BEDEUTUNG DES ENDOTHELIS

Das Endothel spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der Sepsis. Die Aktivierung von Endothelzellen - einerseits durch Bakterien und ihre Toxine und andererseits durch im Rahmen der Entzündung freigesetzte Mediatoren - ist an der Initiierung und der Aufrechterhaltung des septischen Geschehens beteiligt. Das Endothel bildet eine zwischen Blut und dem Gewebe interaktive Barriere. Es ist gegenüber Pathogenen, ihren Toxinen sowie Mediatoren ständig exponiert. Kommt es zur Endothelschädigung mit dem Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion, folgt ein Verlust der selektiven Permeabilität der endothelialen Grenzschicht, was als „Capillary-leak-syndrom“ bezeichnet wird. Dies bewirkt den Austritt von intravaskulärer Flüssigkeit in den intestinalen Raum. Es kommt zur Ödembildung, was mit massiver Organdysfunktion einhergehen kann. Weiterhin kommt es zur Beeinträchtigung weiterer endothelialer Funktionen [40].

Das Endothel spielt bei der Regulation der entzündlichen Prozesse eine wichtige Rolle. Als immunologisch aktives Organ ist das Endothel an der Extravasation von Granulozyten und Monozyten, der Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine sowie der Expression von Adhäsionsmolekülen beteiligt [41]. Durch die Synthese vasoaktiver Substanzen wie PGI<sub>2</sub>, NO und Endothelin-1 ist das Endothel als kreislaufaktives Organ wesentlich an der Blutdruckregulation beteiligt [42]. Nach proinflammatorischer Stimulation verlieren die Endothelzellen als gerinnungsaktives Organ ihre antikoagulatorische Funktion und beeinflussen somit die Blutgerinnung. Durch die erhöhte Expression des Tissue factors, die Reduktion von Antithrombin und Protein C sowie die gestörte Fibrinolyse kommt es zur verstärkten Bildung von Fibringerinnseln und Thrombosen [43].

## 1.2 THERAPIEKONZEPTE BEI SEPSIS

Die Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) hat zusammen mit der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) Leitlinien zur Diagnose und Therapie der Sepsis erarbeitet [44]. Der Therapieerfolg der Sepsis ist vor allem von der Früherkennung und Frühbehandlung abhängig.

### 1.2.1 KAUSALE THERAPIE

Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Therapie der Sepsis ist die Fokussanierung. Weiterhin muss eine antiinfektiöse Therapie unter Berücksichtigung der spezifischen Keime durchgeführt werden [45].

### 1.2.2 SUPPORTIVE THERAPIE

Um die Organperfusion und Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, um Vor- und Nachlast und somit die Herzkontraktilität zu verbessern und um eine effiziente Diurese zu erreichen, sind eine adäquate Volumen- und Katecholamingabe eine wichtige Voraussetzung. Eine frühzeitige zielorientierte Kreislauftherapie (Zielwerte: zentraler Venendruck (ZVD) 8-12 mmHg, mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) >65 mmHg, zentralvenöse Sauerstoffsättigung ( $ScvO_2$ ) > 70 %) kann die Krankenhausletalität von 46,5 % auf 30,5 % senken [46]. Die Sauerstoffsättigung sollte bei über 90 % gehalten werden. Die Indikation zur Intubation sollte bei Patienten mit schwerer Sepsis großzügig gestellt werden. Durch eine mechanische Beatmung mit niedrigen Atemzugvolumina ( $V_t$ ) von 6 ml/kg KG kann die Sterblichkeit bei akutem Lungenversagen von 40 % ( $V_t$  12 ml/kg) auf 31 % reduziert werden [47].

### 1.2.3 ADJUNKTIVE THERAPIE

Eine adäquate Blutzuckereinstellung mittels intensivierter Insulintherapie (Zielglukose 80–110 mg/dl) reduziert die Gefahr der Bakteriämie, des akuten Nierenversagens und des septischen Multiorganversagens. Außerdem wird die Krankenhaussterblichkeit von chirurgischen Intensivpatienten gegenüber einer konventionellen Insulinbehandlung (Glucose 180-200 mg/dl) von 20,2 % auf 10,6 % gesenkt [48]. Während die Therapieversuche mit hoch dosierten Glukokortikoiden nicht erfolgreich waren, zeigte sich, dass eine niedrig dosierte Hydrocortisontherapie (50 mg Hydrocortison/alle 6 Stunden) bei Patienten mit septischem Schock und einer Nebennierenrindeninsuffizienz die Letalität von 63 % auf 53 % verringern kann [49]. Darüber hinaus senkt aktiviertes

Protein C (Drotrecogin alfa) die 28-Tage-Letalität bei Patienten mit schwerer Sepsis signifikant von 30,8 auf 24,7 % [50].

Bei einer systemischen Entzündungsreaktion kommt es über eine Mediatorenfreisetzung zur Aktivierung der Gerinnungskaskade, der Kallikrein-Kinin-Kaskade und der Komplementkaskade. Ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Behandlung einer überschießenden Gerinnung besteht in der Substitution von Inhibitoren oder Gerinnungsfaktoren. In dieser Arbeit sollen die Wirkungen des C1-Esterase-Inhibitors (C1-INH) sowie des Faktors XIII (FXIII) untersucht werden.

### **1.3 C 1-ESTERASE-INHIBITOR**

#### **1.3.1 STRUKTUR UND SYNTHESE**

C1-Esterase-Inhibitor ist ein  $\mu$ 2-Globulin aus der Familie der Proteinase-Inhibitoren. Sein Molekulargewicht beträgt ca. 104 kDa, sein Kohlenhydratanteil 32 - 35 %. C1-Esterase-Inhibitor hemmt die Startphasen des Fibrinolyse-, Gerinnungs-, Kinin- und Komplementsystems, indem er stöchiometrisch mit aktiviertem C1, aktiviertem Hagemannfaktor (XIIa), Faktor XIa, Plasma-Kallikrein und Plasmin nicht dissoziierbare Komplexe bildet. Synthetisiert wird er vorwiegend in der Leber, aber auch in Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten und Endothelzellen [51]. Die Synthese wird überwiegend durch IFN- $\gamma$  und im geringeren Ausmaß durch TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  und IL-6 stimuliert. Die normale Serumkonzentration beträgt etwa 23 mg/dl bei einer biologischen Halbwertszeit von 64h [52, 53].

#### **1.3.2 PHAMAKOKINETIK**

Der aus dem menschlichen Plasma hergestellte C1-Esterase-Inhibitor wird intravenös appliziert und ist sofort in einer der Dosierung entsprechenden Plasmakonzentration verfügbar [54].

#### **1.3.3 PHARMAKODYNAMIK**

C1-Esterase-Inhibitor hemmt den klassischen Weg der Aktivierung der Komplementkaskade durch Inaktivierung der enzymatisch aktiven Komponenten C1s und C1r durch Komplexbildung mit dem Inhibitor in einem Verhältnis von 1:1. Außerdem ist C1-Esterase-Inhibitor der wichtigste Inhibitor der Kontaktaktivierung, indem er Faktor XIIa und seine Fragmente hemmt. Neben Alpha-2-Makroglobulin ist er weiterhin der wichtigste Inhibitor des plasmatischen Kallikreins [55].

#### 1.3.4 THERAPEUTISCHE ANWENDUNG

Die Therapie mit C1-Esterase-Inhibitor wurde vor ca. 30 Jahren zur Behandlung des hereditären Angioödems, das durch C1-Esterase-Inhibitor Mangel verursacht wurde, eingeführt. Sowohl in tierexperimentellen Studien als auch in der Patientenbeobachtung ergaben sich Hinweise, dass die Behandlung ebenfalls in der Sepsis, beim akuten Myokardinfarkt, beim systemischen Kapillarlecksyndrom sowie anderen Erkrankungen von Nutzen für die Patienten sein könnte.

#### 1.3.5 TIEREXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

In einer tierexperimentellen Untersuchung bei Hunden mit schwerer Sepsis konnte durch C1-Esterase-Inhibitor-Substitution der Blutdruckabfall und die Lungendysfunktion reduziert werden [56]. Bei Kaninchen mit Endotoxin-induzierter Sepsis führte die C1-Esterase-Inhibitor-Substitution zu Stabilisierung des arteriellen Druckes und zur Verminderung der Fibrin-Ablagerungen in den Gefäßen [57]. Bei Mäusen mit induzierter Sepsis konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von C1-Esterase-Inhibitor zu einer Verminderung der Mortalität führte [58]. Die Verabreichung von C1-Esterase-Inhibitor bei Affen mit septischem Schock führte zu einer Reduktion der Aktivierung von C3 und C4 sowie zu einer Verminderung der Mortalität, wobei die komplementvermittelte Beseitigung der Mikroorganismen unbeeinflusst blieb [59].

#### 1.3.6 KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN

In mehreren Studien wurde die Rolle von C1-Esterase-Inhibitor bei schwerer Sepsis untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass, obwohl C1-Esterase-Inhibitor als Akut-Phase-Protein um das 2-3-Fache ansteigen kann, Patienten mit septischem Schock eine um etwa 20 % verminderte C1-Esterase-Inhibitor-Aktivität aufweisen. Außerdem fanden sich im Plasma der untersuchten Patienten auch erhöhte Plasmaspiegel von inaktivem, proteolytisch abgebautem C1-Esterase-Inhibitor, wobei das Ausmaß des Abbaus von C1-Esterase-Inhibitor mit der Mortalität der Sepsis-Patienten korrelierte [60]. Gleichzeitig wurden im Plasma erhöhte Konzentrationen der Inhibitor Komplexe von C1-Esterase-Inhibitor und den Proteasen FXIIa, Kallikrein und FXIa gemessen [60, 61]. In Fallstudien wurden mechanisch beatmete Patienten mit septischem Schock und ausgedehnter Volumensubstitution sowie Vasopressorenbedarf mit C1-Esterase-Inhibitor behandelt. Es konnte eine Abschwächung der Komplement- und Kontaktphasenaktivierung gezeigt werden sowie eine Verminderung der Hypotension und des Vasopressorenbedarfs. Bei allen Patienten konnte ein Absinken der C3a- und

ein Ansteigen der FXII-Plasmaspiegel belegt werden. Außerdem verstarb kein Sepsis-Patient während der Verabreichungszeit des Präparats und es traten keine toxischen Nebenwirkungen des Präparats auf [62].

#### 1.4 FAKTOR XIII

Der Faktor XIII ist als letzter der Gerinnungsfaktoren von Laki et al. 1948 entdeckt und beschrieben worden [63]. Duckert et al. entdeckten 1960, dass Faktor XIII neben seiner hämostaseologischen Funktion ebenfalls Bedeutung im Wundheilungsprozess hat [64].

##### 1.4.1 STRUKTUR UND SYNTHESE

Faktor XIII ist eine Transglutaminase, die aus je zwei identischen A- und zwei identischen B-Untereinheiten aufgebaut ist und die Formel  $A_2B_2$  hat. Die A-Untereinheit wird in den hämatopoetischen Zellen synthetisiert, sie besteht aus 731 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 83.150 Da. Sie weist zwei Thrombinspaltungsstellen auf, wobei die Spaltung an der ersten Stelle zur Aktivierung des Faktors XIII im Blut unter physiologischen Bedingungen, die Spaltung an der zweiten Stelle zur Inaktivierung des Enzyms führt [65]. Die B-Untereinheit wird in der Leber synthetisiert, besteht aus 641 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 73.180 Da. Sie ist das Transportprotein der A-Untereinheit im Plasma und schützt vor enzymatischer Aufspaltung durch Proteasen [66].

##### 1.4.2 PHAMAKOKINETIK

Die normale Plasmakonzentration von Faktor XIII liegt bei 20mg/l, das entspricht einer Faktor-XIII-Aktivität von 70 - 130 %. Die Halbwertszeit nach intravenöser Applikation beträgt etwa 5 bis 8 Tage für die A-Untereinheit und 5 Stunden für die B-Untereinheit [65].

##### 1.4.3 PHARMAKODYNAMIK

Die Funktion von Faktor XIII beruht hauptsächlich auf der Stabilisierung von Fibrin durch kovalente Vernetzung des Fibringerinnsels, wodurch es unlöslich und elastisch wird. Darüber hinaus ist Faktor XIII an der Adhäsion, Migration und Proliferation von Fibroblasten, dem Aufbau der extrazellulären Matrix, der Gewebereparatur und Wundheilung beteiligt [67, 68]. Faktor XIII reduziert die kapilläre Permeabilität und besitzt damit eine antiödematöse Wirkung [69].

#### 1.4.4 THERAPEUTISCHE ANWENDUNG

Die Indikationen zur Faktor XIII-Substitution sind hauptsächlich bei einem Faktorenmangel und speziell bei akuten Blutungen bei Faktor XIII-Konzentrationen unter 50 %, Nahtdehiszenzen und Wundheilungsstörungen [70]. Faktor XIII wird ebenfalls zur Förderung der Knochenbruchheilung eingesetzt [71].

#### 1.4.5 EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN

Der positive Effekt von Faktor XIII auf die Wundheilung konnte in mehreren Studien gezeigt werden. Faktor XIII zeigte Wirkung auf die Mitoseraten von Fibroblasten und Osteoblasten, die Kollagensynthese sowie die Zelladhäsion und Zellmigration [67, 68, 72]. Faktor XIII führt in Verbindung mit Thrombin zu einer stabilen Fibrinvernetzung und einer Steigerung der Fibroblastenproliferation [73].

In mehreren In-vitro-Versuchen an Endothelzellkulturen konnte nachgewiesen werden, dass die Gabe von Faktor XIII die Endothelzellpermeabilität und damit das capillary leak vermindert und eine endothelabdichtende Funktion hat. In Versuchen an endothelialen Monolayern konnte gezeigt werden, dass die Vorinkubation der Endothelzellen mit FXIIIa die Endothelpermeabilität um 30 % senkt [74]. Darüber hinaus konnte eine artifiziell induzierte Hyperpermeabilität nahezu vollständig verhindert und der durch Ischämie und Reperfusion provozierten Ödementwicklung entgegengewirkt werden [75]. Die myokardiale Wassereinlagerung während der postischämischen Reperfusionsphase am Modell des isolierten, perfundierten Rattenherzens war signifikant niedriger, wenn dem Perfusat vor der Ischämie aktivierter Faktor XIII zugesetzt wurde [76, 77].

In einem Tiermodell mit um 50 % der Norm reduzierter Faktor-XIII Plasmakonzentration und gestörter Wundheilung konnte durch die Substitution von Faktor XIII eine Verbesserung der Reißfestigkeit von Hautwunden an Ratten nachgewiesen werden. Diese war am 4. und 5. postoperativen Tag statistisch signifikant [78].

Ebenfalls zeigten Untersuchungen an Schnittwundenmodellen bei Ratten und Meerschweinen mit normalem Faktor-XIII Plasmaspiegel, dass ein in Hefezellen rekombinant hergestelltes Faktor-XIII-Konzentrat dosisabhängig signifikant erhöhte Reißfestigkeiten bewirkte, wobei sich diese nach vier Tagen um 20 – 30 % im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte [79].

Außer Wundheilungsuntersuchungen mit Faktor XIII wurden zahlreiche Untersuchungen an Knochenheilungsmodellen durchgeführt. Hier konnte eine

signifikant verbesserte primäre Knochenbruchheilung am Schafsmetatarsus nachgewiesen werden. Faktor XIII hat einen positiven Effekt auf Knochenbruch- bzw. Kallusheilung. Dies ist auf fibrinvernetzende und die fibroblastenproliferationsfördernde Funktion zurückzuführen [80, 81].

In einem Rattenmodell konnte kein Einfluss des Faktors XIII auf die Leukozytenadhärenz und Plasmaextravasation in der intestinalen Submukosa während der Endotoxinämie gezeigt werden [82].

#### 1.4.6 KLINISCHE UNTERSUCHUNGEN

Patienten mit angeborenem Faktor XIII-Mangel leiden an einer hämorrhagischen Diathese. Bei einem Viertel der Patienten traten Wundheilungsstörungen auf [83].

Die Therapie mit Faktor XIII führte bei Patienten mit therapierefraktären Wundheilungsstörungen (Fistel bzw. Nahtdehiszenz) und Faktor XIII-Mangel zu einer signifikanten Besserung der Wundverhältnisse, zu einer Verkleinerung der Wundflächen bzw. zu einer Verringerung der Fisteldrainagevolumina. Der klinische Verlauf korrelierte dabei mit der Faktor XIII-Aktivität im Plasma [84].

Bei Patienten mit Defektpseudarthrosen der langen Röhrenknochen nach einem standardisierten operativen Vorgehen zeigte die mit Faktor XIII behandelte Gruppe eine frühere Vollbelastungsrate, eine schnellere knöcherne Konsolidierung und seltener Reoperationen gegenüber der Kontrollgruppe [85].

Bei der klinischen Anwendung von Faktor XIII zur lokalen Therapie wurden positive Effekte bei Wundheilungsstörungen wie Ulcus cruris oder bei therapieresistenter Colitis ulcerosa und Sklerodermie beschrieben [86-89].

Bei Patienten mit Ulzerationen der unteren Extremität unterschiedlicher Genese führte die lokale Applikation von Faktor XIII zu einer deutlichen Verbesserung der Wundheilung [90].

Ebenfalls unterstützen die klinischen Befunde der Therapie des diabetischen Malum perforans die Vermutung, dass der plasmatische Faktor XIII eine Rolle bei der Sekretionskontrolle hat, die auf einer Reduktion der Permeabilität der endothelialen Schranke beruht. Die erhöhte Granulationstendenz ist durch eine Vernetzung von verschiedenen lokalen Proteinen und als Folge einer verminderten Transsudation im endothelialen Bereich erklärbar [77].

In einer prospektiven Studie konnten Wozniak et al. zeigen, dass die präoperative Substitution von Faktor XIII bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern, zu einer deutlichen Inzidenzminderung von myokardialer Schwellung führte [91].

## 2 FRAGESTELLUNG

Im Rahmen von Endotoxinämie und Sepsis kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems und der Gerinnungskaskade. Im Zusammenhang damit stehen eine Aktivierung von Leukozyten und in der Folge eine erhöhte Leukozyten-Endothel-Interaktion. In der Studie soll untersucht werden, ob die Therapie mit C1-Esterase-Inhibitor und Faktor XIII als gerinnungsaktive Substanzen jeweils in Kombination eine Wirkung auf die Leukozytenaktivierung hat.

Wir untersuchen den Einfluss einer Kombination von C1-Esterase-Inhibitor und Faktor XIII auf die Leukozytenadhärenz am intestinalen Gefäßendothel bei experimenteller Endotoxinämie.

Folgende Fragestellungen sollen beantwortet werden:

1. In welchem Maß beeinflusst die Therapie mit der Medikamentenkombination von C1-Esterase-Inhibitor und Faktor XIII die funktionelle Kapillardichte und die Leukozytenadhärenz während der Endotoxinämie?
2. Wie verändert sich der Plasmaspiegel von Antithrombin III, C1-Esterase-Inhibitor und Faktor XIII durch die Gabe der Medikamentenkombination von C1-Esterase-Inhibitor und Faktor XIII?
3. Hat die Gabe der Medikamentenkombination von C1-Esterase-Inhibitor und Faktor XIII einen Einfluss auf die Leukozytenzahl im peripheren Blut?

### 3 MATERIAL UND METHODIK

#### 3.1 VERSUCHSTIERE

In dieser Studie wurden männliche 30 Wistar-Ratten (Gewicht  $200 \pm 50$ g) im Alter von 6-8 Wochen untersucht. Die Tierhaltung erfolgte im 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus, die Umgebungstemperatur betrug  $25^{\circ}\text{C}$ , die Luftfeuchtigkeit 55 - 60 %. Den Tieren war in ihren Käfigen ein freier Zugang zum Wasser und Standardnahrung (Altromin®, Lage, Deutschland) möglich. Zwölf Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren die feste Nahrung entzogen. Wasser wurde bis zum Beginn der Versuche gewährt. Die Versuchsreihen orientieren sich an den Richtlinien für die Durchführung von Tierversuchen nach § 2 sowie § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes und wurden am 8. Juli 2002 von der zuständigen Berliner Senatsverwaltung für Gesundheit genehmigt (G 0183/00). Die Versuche wurden von August bis Oktober 2002 durchgeführt.

#### 3.2 GRUPPENEINTEILUNG

Die Tiere wurden in drei Gruppen mit je zehn Tieren aufgeteilt:

Tabelle 2: Gruppeneinteilung: Medikationsgabe

Gruppe	LPS	C1-Esterase-Inhibitor	Faktor XIII
KONTROLLGRUPPE	-	-	-
ENDOTOXINGRUPPE	10 mg/kg KG	-	-
C1-INH+FXIII-GRUPPE	10 mg/kg KG	100 E/kg KG	50 E/kg KG

#### 3.3 VERSUCHSABLAUF

Für alle drei Gruppen war der allgemeine Versuchsablauf identisch. Die Tiere wurden mit 60 mg/kg KG Pentobarbital narkotisiert und instrumentiert. Dazu gehörte das Einlegen der intravasalen Katheter in die Vena jugularis dextra und die Arteria carotis commnis dextra sowie die Tracheotomie. Nach 15-minütiger Erholungsphase wurde den Tieren die Endotoxin- bzw. Placeboinfusion durch den venösen Katheter kontinuierlich zugeführt. Nach einer Zeit von 30 min bekamen die Tiere die Medikamentenkombination aus 100 E/kg KG C1-INH + 50 E/kg KG FXIII bzw. 10 mg/kg KG Placebo als Bolus. Es folgte die Laparotomie und nach einer Erholungsphase von

einer Stunde die Intravitalmikroskopie. Anschließend wurden Gewebeproben für die Histologie entnommen. Während des ganzen Versuchsablaufes erfolgten bei den Tieren ein kontinuierliches Monitoring der Vitalparameter und drei über den Versuchszeitraum verteilte Blutentnahmen (siehe Abb. 1).

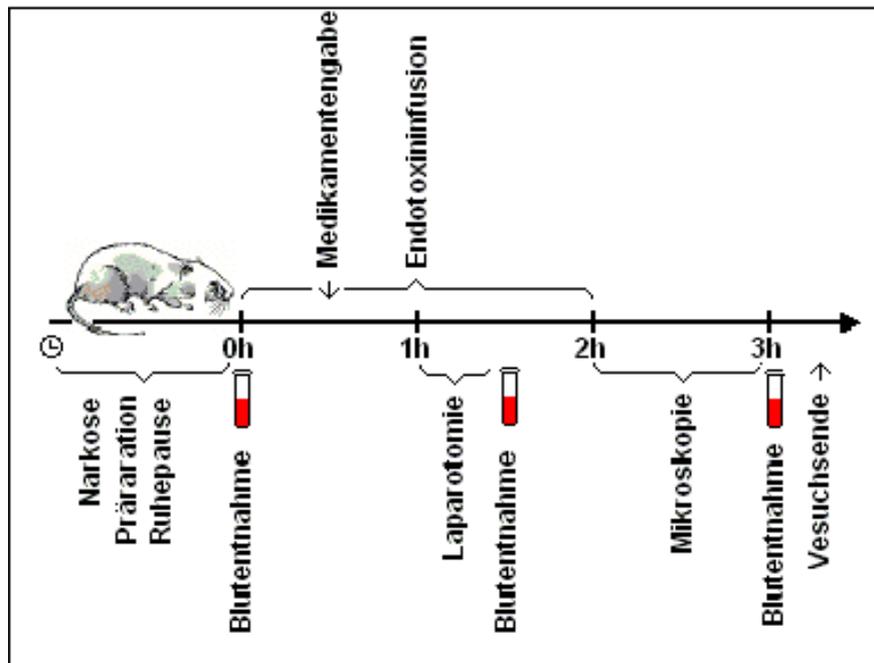


Abbildung 1: Versuchsablauf.

### 3.4 NARKOSEFÜHRUNG

Die Narkose wurde durch eine intraperitoneale Applikation von 60 mg/kg KG Pentobarbital (Synopharm GmbH, Barsbüttel) eingeleitet. Die Narkosetiefe wurde anhand der Atemfrequenz und der durch Kneifen in den Schwanz ausgelösten Beugerreflexe kontinuierlich überprüft. Bei positiven Beugerreflexen oder Atemfrequenz >90/min wurde eine Erhaltungsdosis des Pentobarbitals von 20 mg/kg KG als intravenöse Bolusgabe nachgegeben.

### 3.5 OPERATIVE TECHNIKEN

#### 3.5.1 TRACHEOTOMIE UND KATHETERIMPLANTATION

Die Fixierung der Tiere erfolgte in der Rückenlage. Nach Rasur und Desinfektion der rechten Halsseite wurde die Haut über 2 cm von kranial nach kaudal mittels eines Elektrokauters (BCH 50, TUR, Dresden, Deutschland) inzidiert und die proximale

Trachea dargestellt. Die Trachea wurde mittels Mikroschere quer unterhalb des 7. Ringknorpels eröffnet und mithilfe einer Venenverweilkanüle intubiert. Danach erfolgte die Darstellung der rechten Vena jugularis interna und der Arteria carotis communis. Nach distaler Ligatur und proximaler Abklemmung der Gefäße mittels Mikroclip wurden die Katheter in Venae-Sectio-Technik platziert, mit Haltefäden fixiert und schließlich die Mikroclips entfernt. Anschließend wurde den Tieren eine Erholungsphase von ca. 15 min bis zur Induktion der Endotoxinämie gewährt.

### 3.5.2 DARMPRÄPARATION

Zwei Stunden nach der LPS-Applikation wurden die intravitalmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde nach Rasur und Desinfektion der Bauchdecke eine Laparotomie vom Xyphoid bis zur Symphyse durchgeführt. Den Tieren wurde in der Seitenlage ein ca. 3 cm langes Segment des terminalen Ileums mittels einer no-touch-Technik auf eine spezielle Haltevorrichtung (Stage) ausgelagert.

Als transparente und plane Abdeckung der Mikroskopiekammer diente ein Deckgläschen (21x26 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland), was einen Zugang zu einem Darmabschnitt von ca. 1 cm<sup>2</sup> von der Serosa aus ermöglichte. Nicht untersuchte Darmabschnitte wurden gegen eine Austrocknung mit einer benetzten Gaze abgedeckt und kontinuierlich mit auf 37°C erwärmter Ringerlösung befeuchtet. Für die Untersuchung der Submukosa wurde der Darm antimesenterial mithilfe des Elektrokauters eröffnet und eventuell vorhandener Darminhalt vorsichtig mit körperwarmer Ringerlösung ausgespült.

### 3.6 MONITORING

Die Tiere atmeten spontan Raumluft via Trachealkanüle, die Atemfrequenz wurde mit einem Infrarotsensor aufgezeichnet. Es erfolgte ein kontinuierliches Monitoring (BMT Biomonitor 5231; Druckmesswandler W112; RFT, Staßfurt, Deutschland) von mittlerem arteriellen Blutdruck (MAP) und Herzfrequenz (HF). Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur von  $37 \pm 0,5$  °C wurden die Tiere auf einer Wärmematte gelagert. Das Monitoring der Temperatur erfolgte über eine rektale Thermistorsonde (W 233, RFT, Staßfurt, Deutschland).

### **3.7 VOLUMENSUBSTITUTION UND MEDIKAMENTENZUFUHR**

Über den arteriellen Zugang erfolgte eine kontinuierliche Spülung mit:

- Vollelektrolytlösung (Thomaejonin<sup>®</sup>, Thomea, Biberach, Deutschland)

Über den zentralvenösen Zugang erfolgten eine kontinuierliche Spülung, die Volumensubstitution und die Medikamentengabe von:

- Vollelektrolytlösung (Thomaejonin<sup>®</sup>, Thomea, Biberach, Deutschland)
- LPS von E. coli (Serotyp O55: B5; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Pentobarbital (Synopharm GmbH, Barsbüttel, Deutschland)
- Factor XIII (Fibrogammin<sup>®</sup> HS, Aventis, Marburg, Deutschland)
- C1-Esterase-Inhibitor (Berinert<sup>®</sup> P, Aventis, Marburg, Deutschland)
- FITC-Dextran (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Rhodamin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

### **3.8 ENDOTOXINMODEL**

Die Endotoxinämie wurde durch eine kontinuierliche Dauerinfusion des Lipopolysacharids (LPS) von E. coli (Serotyp O55: B5; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einer Dosis von 10 mg/kg KG den Tieren der Endotoxin- und C1-INH+FXII-Gruppe durch den venösen Katheter zugeführt.

### **3.9 INTRAVITALMIKROSKOPIE**

#### **3.9.1 TECHNIK**

Für die intravitale Fluoreszenz-Video-Mikroskopie (Intravitalmikroskopie, IVM) wurde folgende technische Ausrüstung verwendet, mit der eine 250- bzw. 500-fache Vergrößerung erreicht werden konnte:

- Epifluoreszenzmikroskop: AxioTech Vario (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Lichtquelle: HBO 50 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Okulare: 10x (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Objektiv für Übersichtsaufnahmen: 10x/0,5 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Objektiv für Detailaufnahmen: 20 x/0,5 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)

- Filtersatz Nr. 20, Anregung: BP 546/12; Frequenzteiler: 560; Emission: BP 575 – 640 für Beobachtungen mit Rhodamin 6G (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- Filtersatz Nr. 10, Anregung: BP 450 – 490; Frequenzteiler: 510; Emission: BP 515 – 565 für Beobachtungen mit FITC-Dextran (Carl Zeiss, Jena, Deutschland)
- 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, Tokyo, Japan)

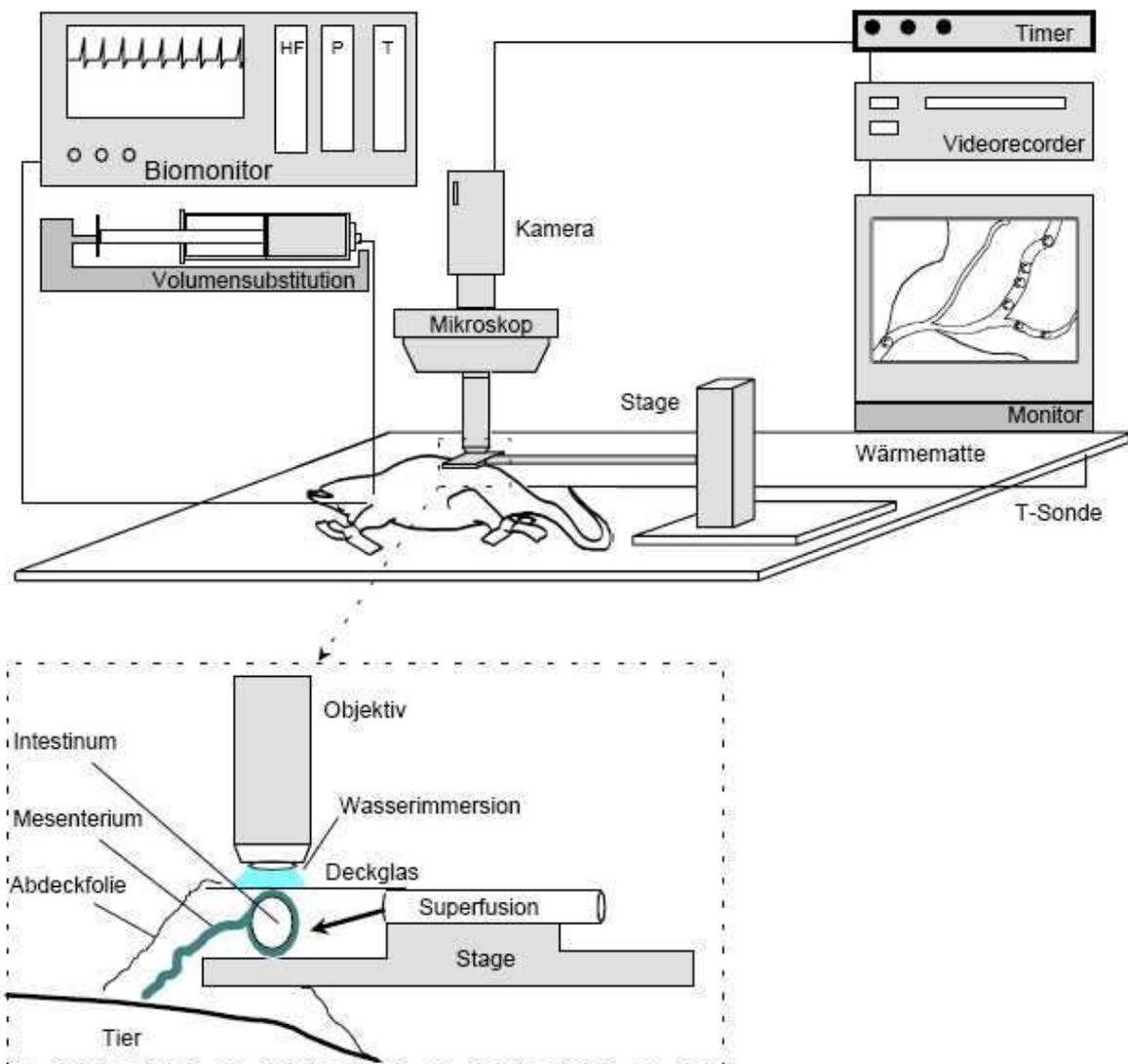


Abbildung 2: Versuchsaufbau

### 3.9.2 DURCHFÜHRUNG DER INTRAVITALMIKROSKOPIE

Zur Markierung und zur optimalen Darstellung der Leukozyten wurde 0,017%iges Rhodamin-6G (Sigma, Deisenhofen, Deutschland; Lösungsmittel: NaCl 0,9 %) in zwei Boli zu je 200 µl verabreicht. Die danach erfolgte Gabe von 200 µl einer 5%igen FITC-Dextran-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland; gelöst in NaCl 0,9 %) ermöglichte eine Kontrastanhebung des Plasmas und somit eine Darstellung des Kapillarstrombettes.

Die Submukosa des ausgelagerten Darmabschnittes wurde unter dem Mikroskop fokussiert. Es wurden fünf Gesichtsfelder mit unverzweigten, über mindestens 100 µm gestreckt verlaufenden Venolen 1. Grades und fünf Gesichtsfelder mit ebensolchen Venolen 3. Grades aufgesucht und für jeweils 30s aufgezeichnet. Außerdem wurden fünf Videosequenzen mit Kapillaren der longitudinalen Muskulatur und fünf Videosequenzen mit Kapillaren der zirkulären Muskulatur aufgezeichnet. Die Dauer der Mikroskopie betrug insgesamt etwa 20 Minuten.

Für die Aufzeichnung der Submukosa wurde das Darmlumen in einer Länge von 2 cm mit einem Elektrokauter eröffnet und nach Spülung mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung erneut auf einer Haltevorrichtung platziert. Bevorzugt wurden gefüllte Darmabschnitte gewählt, um eine Läsion der gegenüberliegenden, mesenterialen Darmwand bei der Inzision zu vermeiden. Es wurden diejenigen Abschnitte der Submukosa untersucht, die direkt den mesenterialen Gefäßarkaden anlagen. Somit war der größtmögliche Abstand zu den Schnitträndern gewählt und eine Alteration dieser Submukosaabschnitte durch die Mikrokauterisierung am geringsten. Es wurden fünf Videosequenzen von Kapillaren der longitudinalen und fünf der zirkulären Submukosaschicht 30s lang aufgezeichnet. Die Mikroskopiedauer betrug ca. 8-10 Minuten.

Die Gesamtmikroskopiezeit betrug ca. 45-60 min. Die Auswertung aller Videosequenzen erfolgte off-line am Videomonitor.

### 3.9.3 FUNKTIONELLE KAPILLARDICHTE

Die funktionelle Kapillardichte (FCD) errechnet sich aus der Länge der Kapillaren mit sichtbarer Erythrozytenperfusion (hell erscheinendes FITC-Dextran-markiertes Plasma und dunkel erscheinender Erythrozyten Kontrast) im Verhältnis zu einer umschriebenen Fläche.

Funktionslose Kapillaren sind Kapillaren ohne sichtbare Erythrozytenperfusion, d.h. Kapillaren mit sichtbar stehenden Erythrozyten über eine Beobachtungszeit von mindestens 30 Sekunden. Die Auswertung der FCD erfolgte in den Schichten Lamina muscularis longitudinalis, Lamina muscularis circularis und Lamina mucosae. Die Auswertung fand unter Nutzung einer quadratischen Gitterschablone am Bildschirm statt. Sie ermöglichte die Ermittlung der FCD über die Erhebung von Schnittpunkten perfundierter Kapillaren mit der Gitterschablone in einer „region of interest“. Die FCD wird als Kapillarlänge je Gitterkästchen LK ausgedrückt.

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

$L = 2 P_M d$  = Länge des Gittersystems

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

$P_M$  = Anzahl der Kästchen

$N$  = Anzahl der Kreuzungen von perfundierten Kapillaren mit den Gitterlinien

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

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

Ausgewertet wurden fünf Regionen der Muskularisschichten mit einer Ausdehnung von  $400 \times 500 \mu\text{m}$  sowie fünf submukosale Kapillargebiete in einer Ausdehnung von ca.  $100 \times 150 \mu\text{m}$  (zentraler Villusbereich). Für die Kapillaren der Muskularisschicht wurde ein Gitter der Kantenlänge von  $50 \mu\text{m}$  und für die Kapillaren der Submukosaschicht von  $12,5 \mu\text{m}$  gewählt.

#### 3.9.4 LEUKZYTENADHÄRENZ

Ausgewertet wurden fünf submuköse Venolen 1. Grades (V1) mit einem Durchmesser von  $70,8 \pm 7,1 \mu\text{m}$  und fünf Venolen 3. Grades (V3) mit einem Durchmesser von  $37,2 \pm 5,5 \mu\text{m}$  (V1 = Sammelvenolen  $41-75 \mu\text{m}$ , V3 = postkapilläre Venolen  $25-40 \mu\text{m}$ ) in der intestinalen Submukosa.

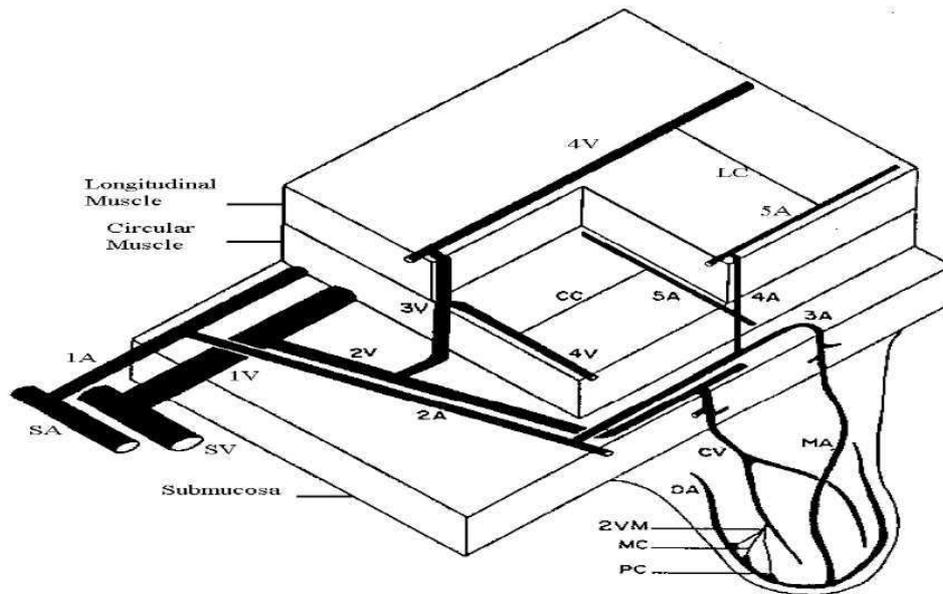


Abbildung 3: Schema des Darmwandaufbaus mit wesentlichen Aufzweigungen der Arteriolen (A1-A5) und Venolen (V1 – V4), Kapillaren der zirkulären (CC) und longitudinalen (LC) Muskulatur, MA: zentrale Villusarteriole mit Aufzweigung in zwei Verteilungsarteriolen (DA), PC: präkapilläre Sphinkteren, MC: Mukosakapillaren, 2VM: mukosale Venolen 2. Ordnung, CV: Villussammelvenole

#### 3.9.4.1 TEMPORÄR ADHÄRENTE LEUKOZYTEN (ROLLER)

Ausgezählt wurden Leukozyten, die in einem Beobachtungszeitraum von 30 Sekunden den ausgewählten Gefäßabschnitt mit einer Geschwindigkeit von ca. 50  $\mu\text{m/s}$  passierten. Ermittelt wurde die Leukozytenanzahl pro Minute:

$$\text{Roller-Flow} = [n/\text{min}]$$

#### 3.9.4.2 FEST ADHÄRENTE LEUKOZYTEN (STICKER)

Ausgezählt wurden Leukozyten, die im Beobachtungszeitraum von 30 Sekunden an einer umschriebenen Endotheloberfläche haften blieben. Für die Berechnung der Endotheloberfläche wird eine Zylinderstruktur des Gefäßes angenommen.

$$\text{Zylinderfläche: } F = l \times U$$

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

$d$  = Gefäßdurchmesser

$l$  = Länge des Gefäßes

$$\text{Sticker} = [n/\text{mm}^2]$$

### **3.10 LABORPARAMETER**

Die Blutentnahmen erfolgten über den arteriellen Katheter zu drei Zeitpunkten:

ZP 0, ZP 90, ZP 180 min (siehe Abb. 1)

#### **3.10.1 LEUKOZYTEN**

Für die Bestimmung der Leukozytenzahl wurden 50 µl Blut in eine EDTA-Kunststoffkapillare (Kabe Labortechnik, Deutschland) entnommen und am Zellcounter (Technikon, Bayer, Leverkusen, Deutschland) ausgewertet. Die Eichung unterliegt den Standards von Paratech (Steck Laboratories, Inc., Ohama, USA). Die Blutproben wurden im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und innerhalb von 12 Stunden nach Entnahme untersucht.

#### **3.10.2 GERINNUNGSFAKTOREN**

Für die Bestimmung der Gerinnungsfaktoren wurden 500 µl Blut in ein Eppendorfgefäß mit 50 µl Citrat (Verhältnis 10:1) abgenommen und über 5 min zentrifugiert. Ein Serumüberstand von 200 µl wurde abpipettiert und mit 200 µl NaCl 0,9 % (Verhältnis 1:2) verdünnt. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die abpipettierten Proben eingefroren und nach Beendigung der Versuchsreihe untersucht. Zur Analyse der Parameter wurden folgende Kits benutzt:

- Antithrombin III (Berichrom<sup>®</sup>, Dade Behring, Deutschland)
- C1-Esterase-Inhibitor (Berichrom<sup>®</sup>, Dade Behring, Deutschland)
- Factor XIII (Berichrom<sup>®</sup>, Dade Behring, Deutschland)

### **3.11 STATISTISCHE METHODEN**

Die statistische Auswertung sowie Darstellung der Ergebnisse erfolgte mithilfe des Statistikprogramms SPSS 14.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). Für die Untersuchung der Unterschiede zwischen den Gruppen und den Zeiteffekten wurde eine 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner mithilfe des Statistikprogramms SAS 8.2 durchgeführt.

Die Ergebnisse der Intravitalmikroskopie sowie der Laborparameter wurden in Form von Boxplots als Median mit der 25. und 75. Perzentile, Minimum und Maximum, Ausreißern (o) sowie Extremwerten (\*) dargestellt.

Aufgrund der kleinen Fallzahl, einer nicht anzunehmenden Normalverteilung und Ausreißern wurde eine nichtparametrische Multivarianzanalyse durchgeführt. Für die Unterschiede zwischen den Gruppen an bestimmten Zeitpunkten wurde der Kruskal-Wallis-Test angewandt. Die Unterschiede zwischen zwei Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test untersucht. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  angesetzt.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 INTRAVITALMIKROSKOPIE

#### 4.1.1 FUNKTIONELLE KAPILLARDICHTE

##### 4.1.1.1 FCD VILLI INTESTINALES

Zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion lag die  $FCD_{\text{villi}}$  bei den Tieren der Kontrollgruppe bei 688 (646-737)/cm. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der  $FCD_{\text{villi}}$  zwischen den untersuchten Gruppen.

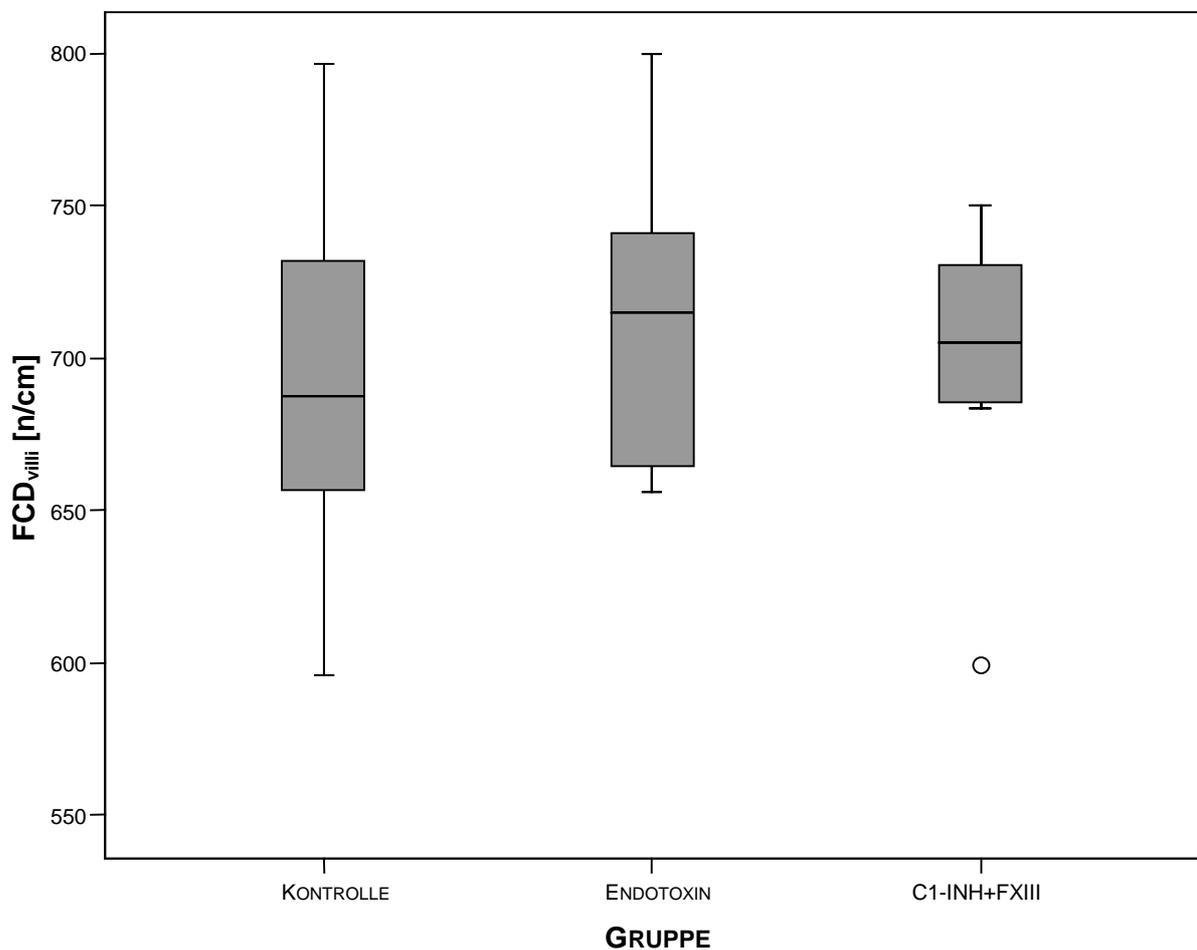


Abbildung 4: Funktionelle Kapillardichte der Villi Intestinales zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion; o: Ausreißer; KONTROLLE: Kontrollgruppe; ENDOTOXIN: Endotoxingruppe (nur LPS); C1-INH+FXIII: C1-INH+FXIII-Gruppe (LPS plus C1-INH plus FXIII); 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner über den gesamten Verlauf.

#### 4.1.2 FCD LONGITUDINALE MUSKULARISSCHICHT

Zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion lag die  $FCD_{\text{long}}$  bei den Tieren der Kontrollgruppe bei 173 (152-177)/cm. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied in der  $FCD_{\text{long}}$  zwischen den untersuchten Gruppen.

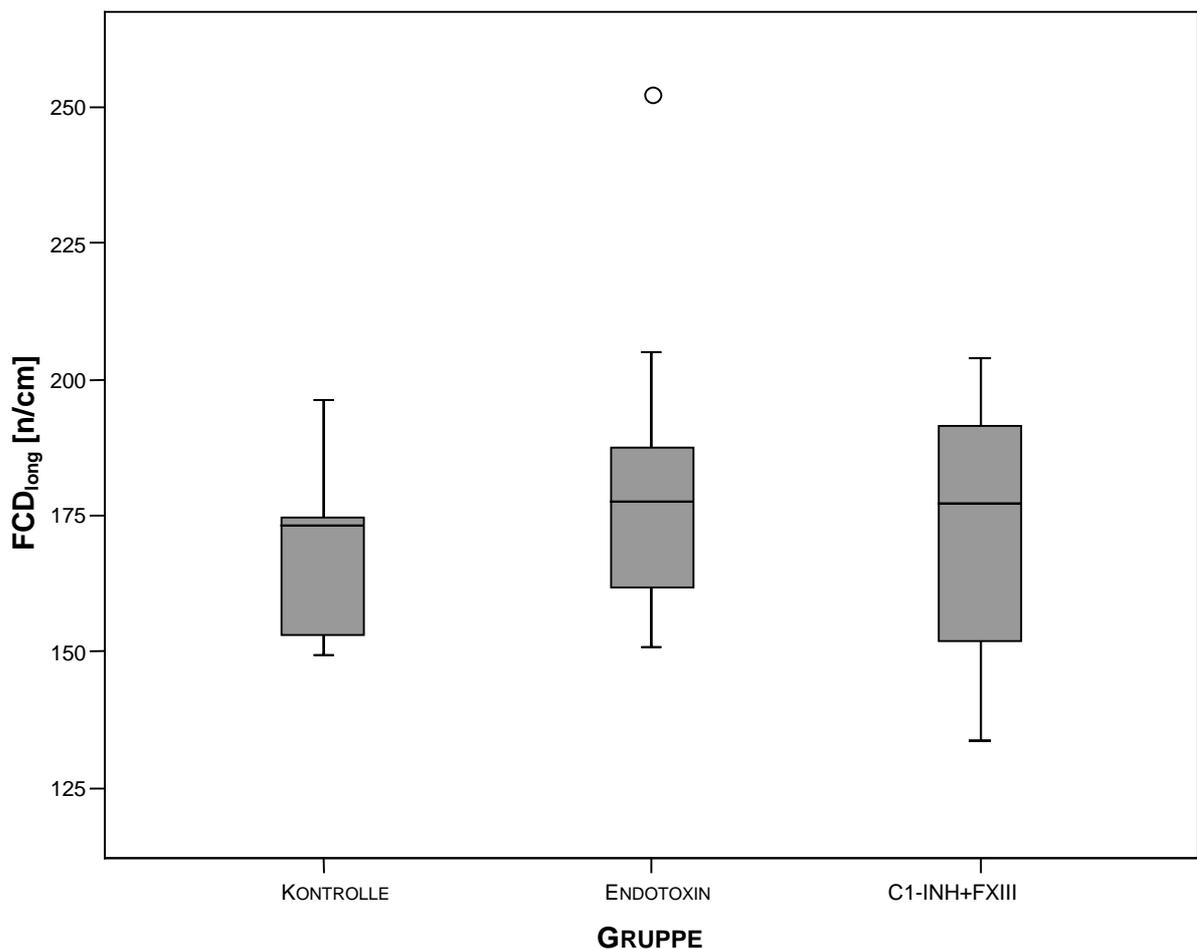


Abbildung 5: Funktionelle Kapillardichte der longitudinalen Muskularisschicht zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion; o: Ausreißer; KONTROLLE: Kontrollgruppe; ENDOTOXIN: Endotoxingruppe (nur LPS); C1-INH+FXIII: C1-INH+FXIII-Gruppe (LPS plus C1-INH plus FXIII); 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner über den gesamten Verlauf.

#### 4.1.2.1 FCD ZIRKULÄRE MUSKULARISCHICHT

Zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion lag die  $FCD_{\text{zirk}}$  bei den Tieren der Kontrollgruppe bei 203 (179-214)/cm. Die  $FCD_{\text{zirk}}$  in der Endotoxingruppe lag signifikant höher bei 226 (216-234)/cm. Die Werte der C1-INH+FXIII-Gruppe lagen auf dem Niveau der Endotoxingruppe bei 227 (206-253)/cm und waren ebenfalls signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Zwischen der Endotoxin- und der C1-INH+FXIII-Gruppe gab es keinen signifikanten Unterschied.

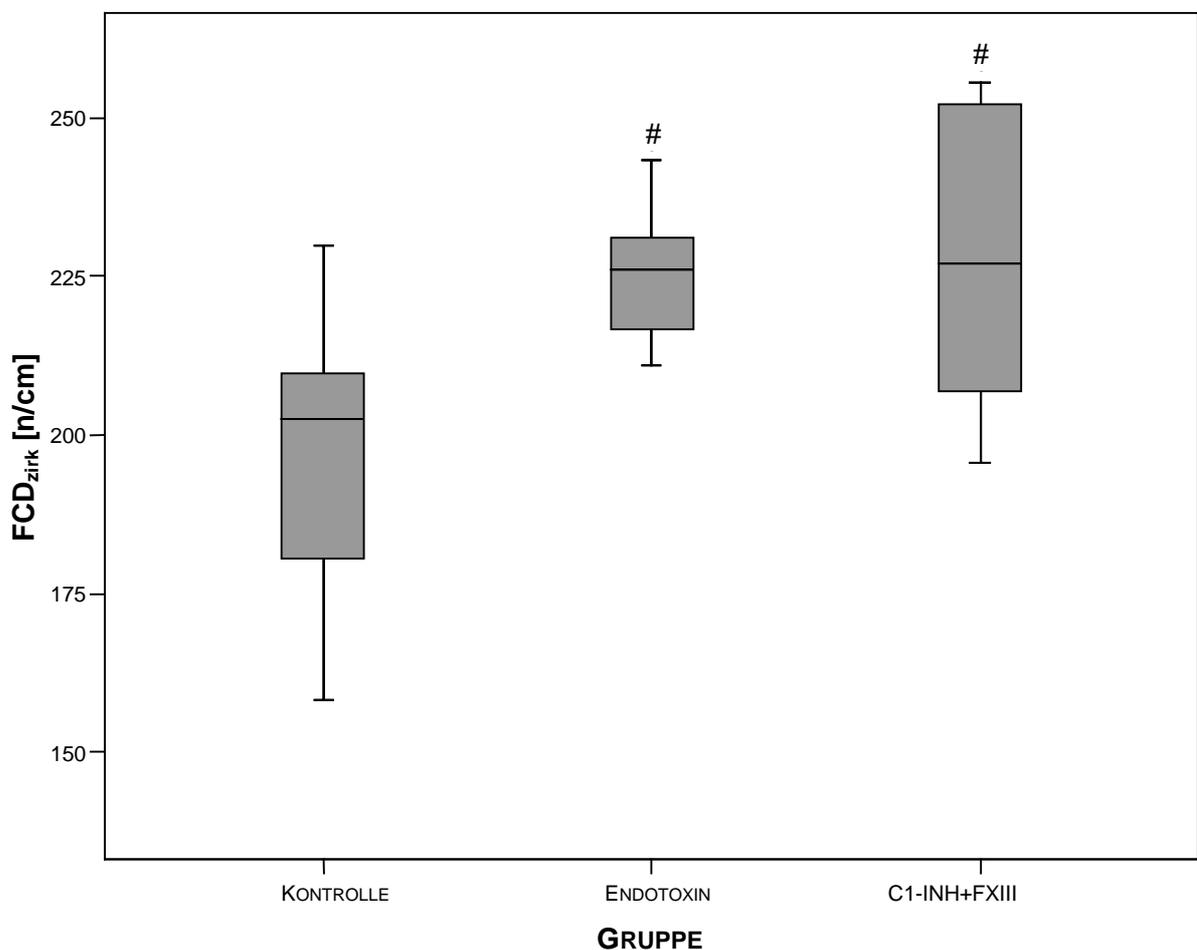


Abbildung 6: Funktionelle Kapillardichte der zirkulären Dünndarmmuskulatur zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion; # $p < 0,05$  vs. Kontrollgruppe; KONTROLLE: Kontrollgruppe; ENDOTOXIN: Endotoxingruppe (nur LPS); C1-INH+FXIII: C1-INH+FXIII-Gruppe (LPS plus C1-INH plus FXIII); 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner über den gesamten Verlauf.

#### 4.1.3 LEUKOZYTENADHÄRENZ

##### 4.1.3.1 TEMPORÄR ADHÄRENTE LEUKOZYTEN (ROLLER) IN VENOLEN 1. GRADES

Zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion lag die Anzahl der temporär adhärenen Leukozyten (Roller) in den Venolen 1. Grades der intestinalen Submukosa bei den Tieren der Kontrollgruppe bei 35 (7-66)/min. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Endotoxin- und der Kontrollgruppe. Die Werte der C1-INH+FXIII-Gruppe lagen mit 7 (3-9)/min signifikant niedriger im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Zwischen der Endotoxin- und der C1-INH+FXIII-Gruppe fand sich kein signifikanter Unterschied.

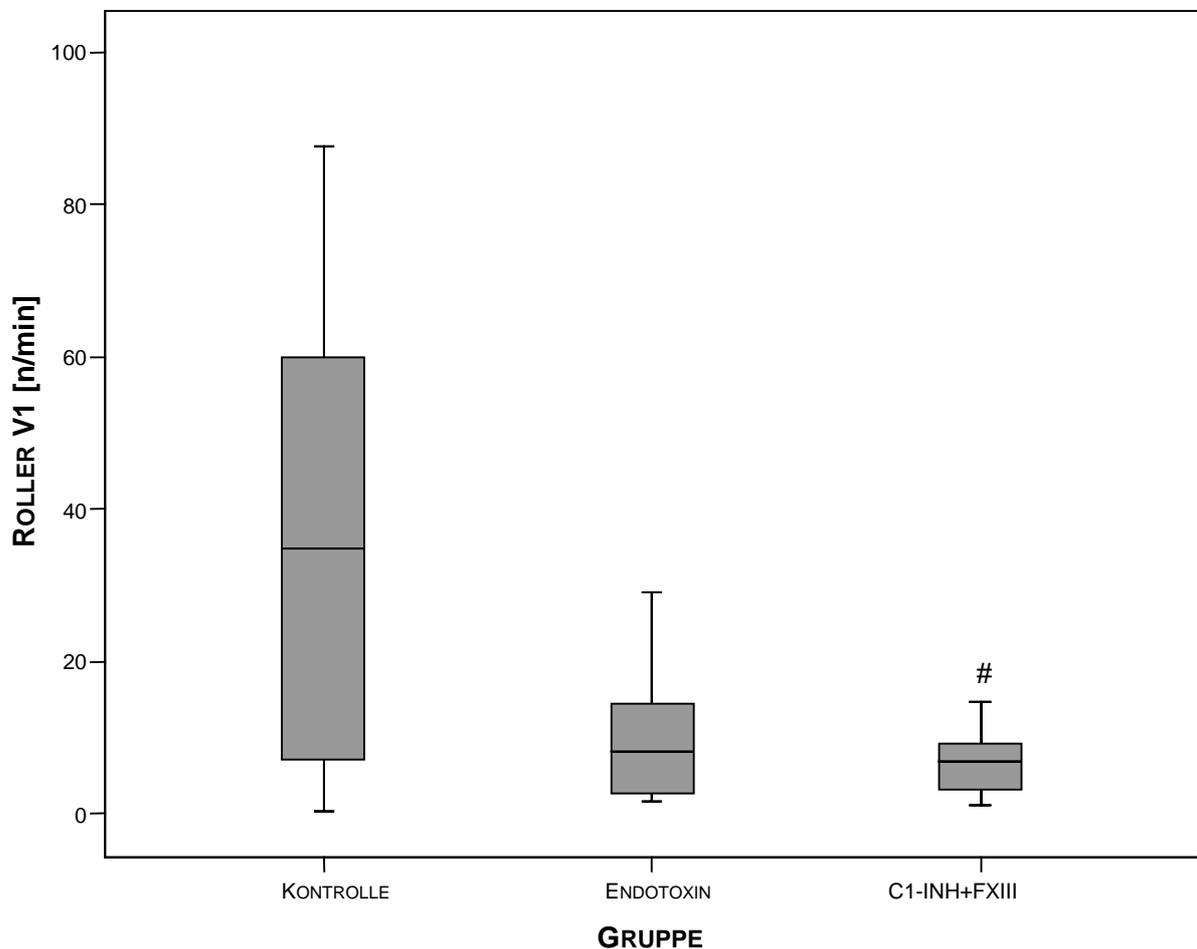


Abbildung 7: Anzahl der temporär adhärenen Leukozyten in den Venolen 1. Grades der intestinalen Submukosa zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion; # $p < 0,05$  vs. Kontrollgruppe; KONTROLLE: Kontrollgruppe; ENDOTOXIN: Endotoxingruppe (nur LPS); C1-INH+FXIII: C1-INH+FXIII-Gruppe (LPS plus C1-INH plus FXIII); 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner über den gesamten Verlauf.

#### 4.1.3.2 TEMPORÄR ADHÄRENTE LEUKOZYTEN (ROLLER) IN VENOLEN 3. GRADES

Zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion lag die Anzahl der temporär adhärenen Leukozyten (Roller) in den Venolen 3. Grades der intestinalen Submukosa bei den Tieren der Kontrollgruppe bei 27 (14-40)/min. Die Anzahl der Roller in der Endotoxingruppe lag signifikant niedriger bei 7 (3-10)/min. Die Werte der C1-INH+FXIII-Gruppe lagen auf dem Niveau der Endotoxingruppe mit 6 (4-13)/min ebenfalls signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Zwischen der Endotoxin- und der C1-INH+FXIII-Gruppe bestand kein signifikanter Unterschied.

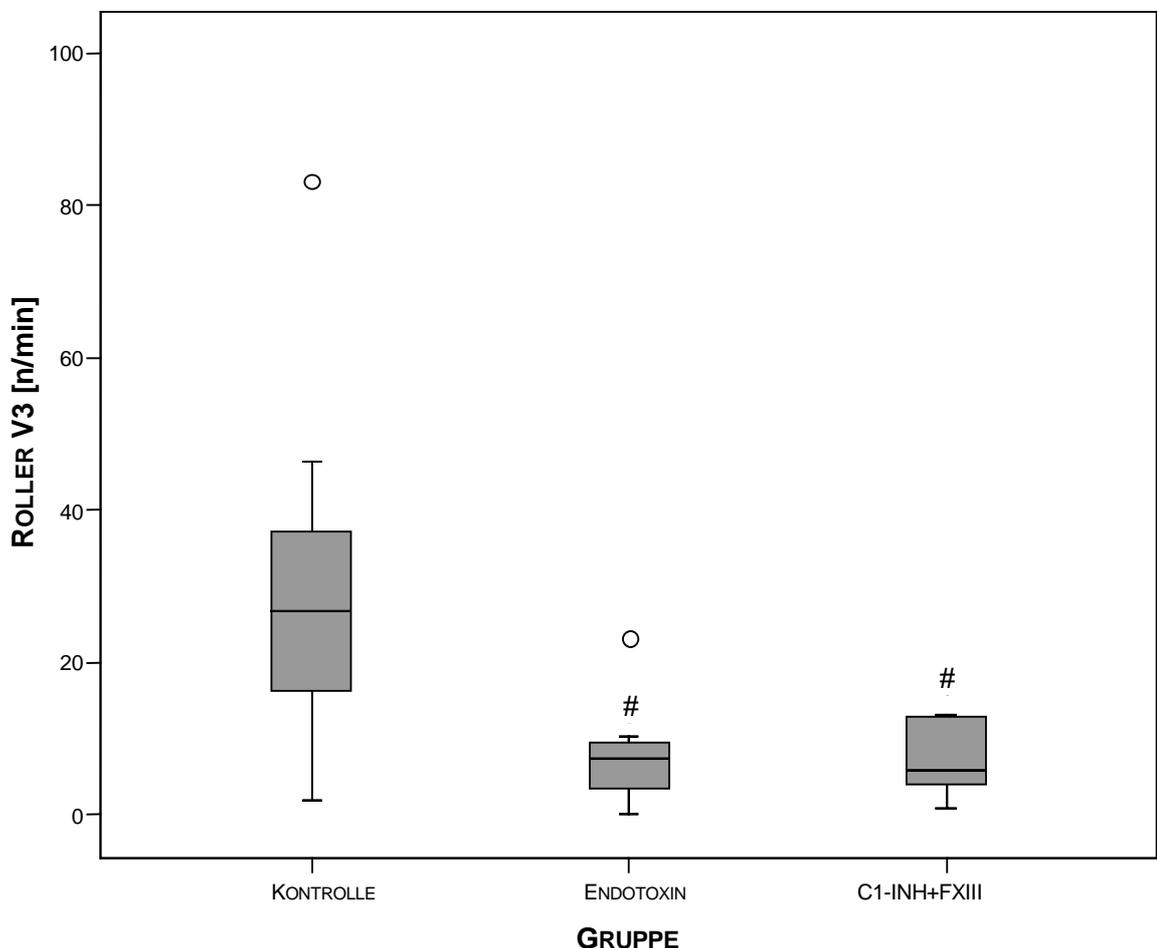


Abbildung 8: Anzahl der temporär adhärenen Leukozyten in den Venolen 3. Grades der intestinalen Submukosa zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion; o: Ausreißer; # $p < 0,05$  vs. Kontrolle; KONTROLLE: Kontrollgruppe; ENDOTOXIN: Endotoxingruppe (nur LPS); C1-INH+FXIII: C1-INH+FXIII-Gruppe (LPS plus C1-INH plus FXIII); 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner über den gesamten Verlauf.

#### 4.1.3.3 FEST ADHÄRENTE LEUKOZYTEN (STICKER) IN VENOLEN 1. GRADES

Zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion lag die Anzahl der fest adhärenen Leukozyten (Sticker) in den Venolen 1. Grades der intestinalen Submukosa bei den Tieren der Kontrollgruppe bei 55/mm<sup>2</sup> (16-131/mm<sup>2</sup>). Die Anzahl der Sticker in der Endotoxingruppe lag signifikant höher bei 368/mm<sup>2</sup> (306-475/mm<sup>2</sup>). Die Werte der C1-INH+FXIII-Gruppe lagen auf dem Niveau der Endotoxingruppe. Zwischen der Endotoxin- und der C1-INH+FXIII-Gruppe gab es keinen signifikanten Unterschied.

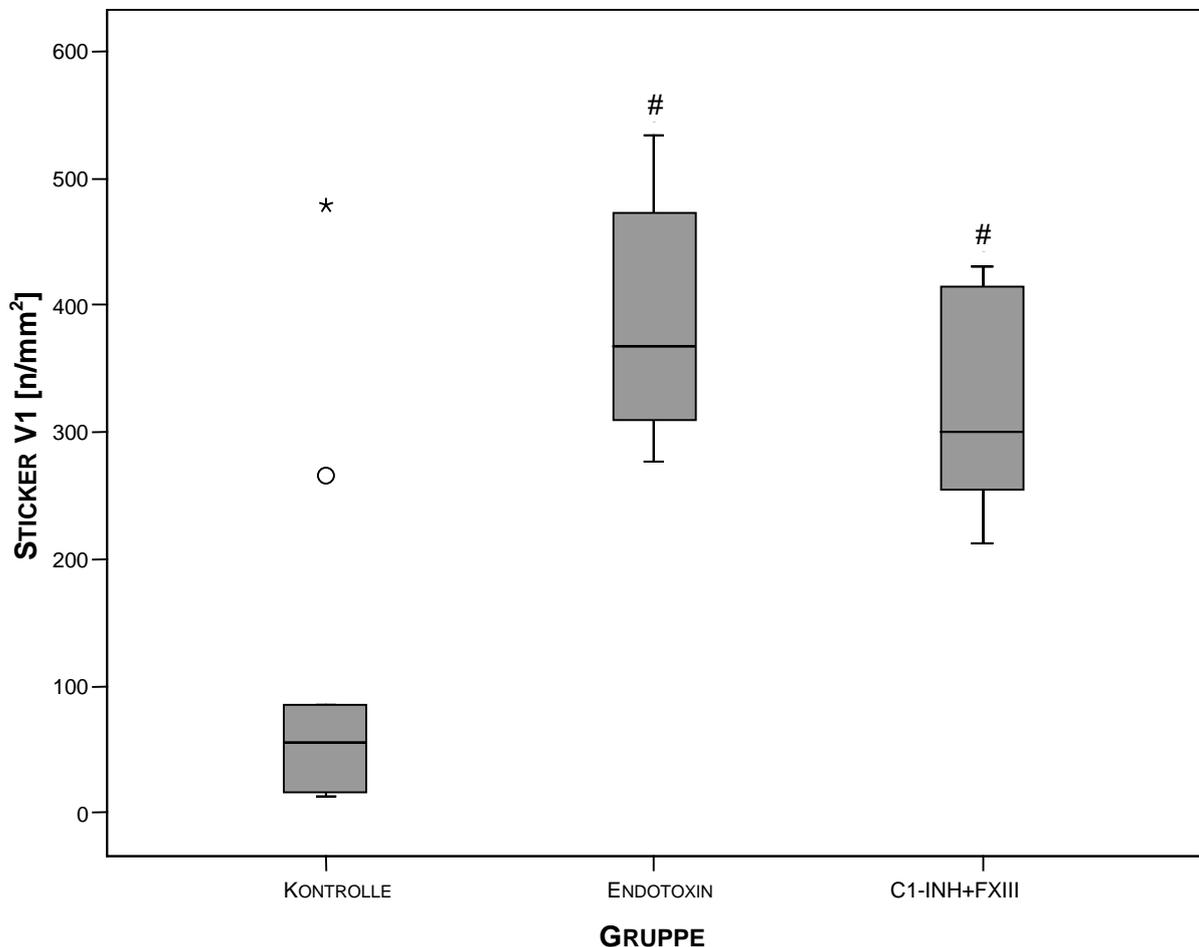


Abbildung 9: Anzahl der fest adhärenen Leukozyten in den Venolen 1. Grades der intestinalen Submukosa zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion; o und \*: Ausreißer; #p<0,05 vs. Kontrolle; KONTROLLE: Kontrollgruppe; ENDOTOXIN: Endotoxingruppe (nur LPS); C1-INH+FXIII: C1-INH+FXIII-Gruppe (LPS plus C1-INH plus FXIII); 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner über den gesamten Verlauf.

#### 4.1.3.4 FEST ADHÄRENTE LEUKOZYTEN (STICKER) IN VENOLEN 3. GRADES

Zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion lag die Anzahl der fest adhärenen Leukozyten (Sticker) in den Venolen 3. Grades der intestinalen Submukosa bei den Tieren der Kontrollgruppe bei 69/mm<sup>2</sup> (20-160/mm<sup>2</sup>). Die Anzahl der Sticker in der Endotoxingruppe lag signifikant höher bei 635/mm<sup>2</sup> (556-814/mm<sup>2</sup>). Die Werte der C1-INH+FXIII-Gruppe lagen signifikant niedriger bei 503/mm<sup>2</sup> (337-646/mm<sup>2</sup>) im Vergleich zur Endotoxingruppe.

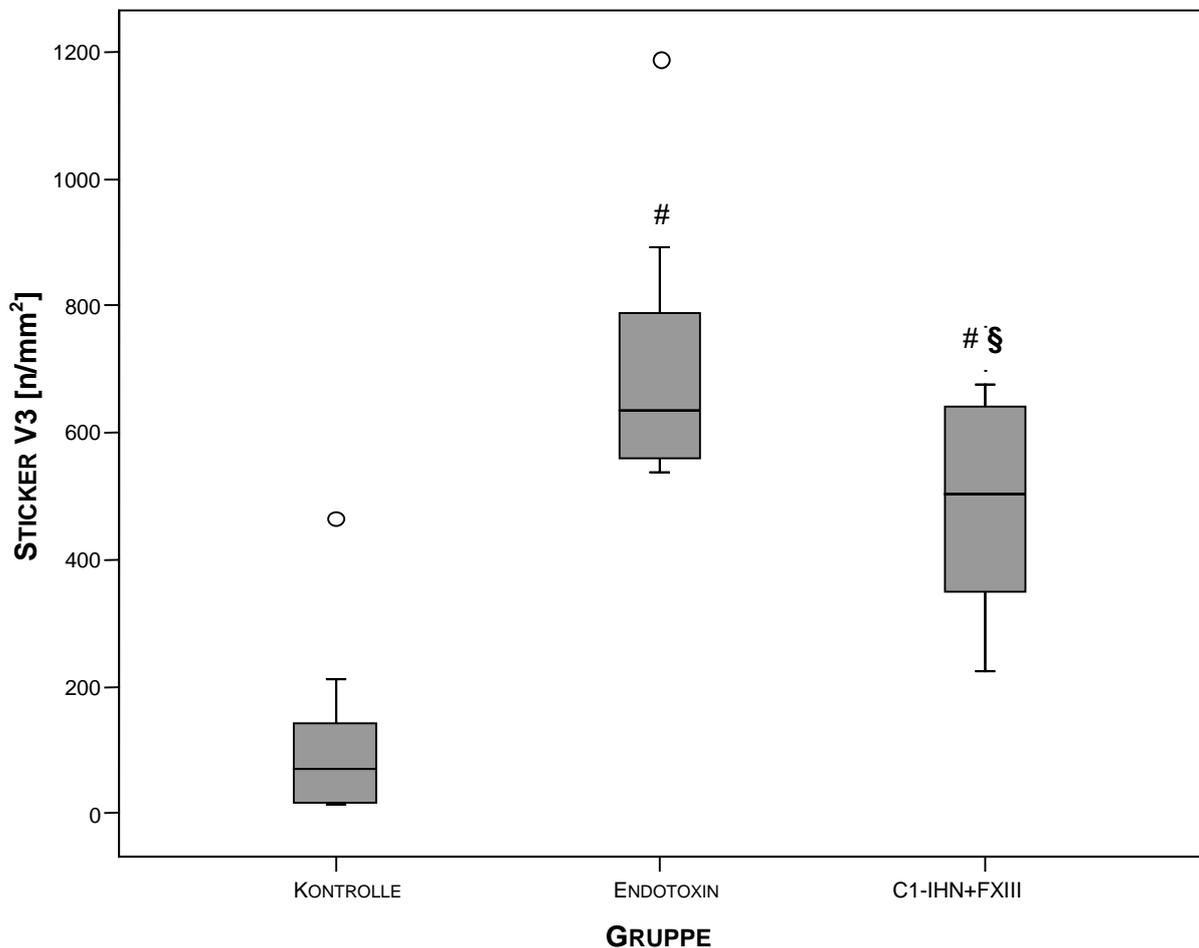


Abbildung 10: Anzahl der fest adhärenen Leukozyten in den Venolen 3. Grades der intestinalen Submukosa zum Zeitpunkt 120 min nach Beginn der Endotoxin- bzw. Placeboinfusion; o: Ausreißer; #p<0,05 vs. Kontrolle, §p<0,05 vs. Endotoxin; KONTROLLE: Kontrollgruppe; ENDOTOXIN: Endotoxingruppe (nur LPS); C1-INH+FXIII: C1-INH+FXIII-Gruppe (LPS plus C1-INH plus FXIII); 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner über den gesamten Verlauf.

## 4.2 LABORPARAMETER

### 4.2.1 LEUKOZYTEN

Die Werte der Leukozytenzahl sind in der Tabelle 3 beschrieben.

Tabelle 3: Leukozytenzahl im peripheren Blut.

GRUPPE / ZEITPUNKT	0h	1,5h	3h	p
KONTROLLE	6,03 (4,78-6,66)	7,02 (4,94-8,18)	6,90 (5,42-11,59)	
ENDOTOXIN	5,48 (4,76-6,96)	4,32 (3,47-6,18)	3,23 (2,93-4,34)	P<0.05 vs. Kontrolle
C1-INH+FXIII	5,19 (4,94-5,55)	2,97 (2,16-4,20)	3,09 (2,09-3,81)	P<0.05 vs. Kontrolle

KONTROLLE: Kontrollgruppe; ENDOTOXIN: Endotoxingruppe (nur LPS); C1-INH+FXIII: C1-INH+FXIII-Gruppe (LPS plus C1-INH plus FXIII); 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner über den gesamten Verlauf.

### 4.2.2 C1-ESTERASE-INHIBITOR-AKTIVITÄT

Die Werte der C1-Esterase-Inhibitor-Aktivität sind in der Tabelle 4 beschrieben.

Tabelle 4: C1-Esterase-Inhibitor-Aktivität im peripheren Blut.

GRUPPE / ZEITPUNKT	0h	1,5h	3h	p
KONTROLLE	37 (30-59)	35 (28-38)	33 (28-38)	
ENDOTOXIN	30 (28-41)	26 (23-35)	30 (22-30)	P<0.05 vs. Kontrolle
C1-INH+FXIII	29 (28-45)	196 (179-218)	162 (145-178)	P<0.05 vs. Kontrolle P<0.05 vs. Endotoxin

KONTROLLE: Kontrollgruppe; ENDOTOXIN: Endotoxingruppe (nur LPS); C1-INH+FXIII: C1-INH+FXIII-Gruppe (LPS plus C1-INH plus FXIII); 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner über den gesamten Verlauf.

#### 4.2.3 FAKTOR-XIII-AKTIVITÄT

Die Werte der Faktor-XIII-Aktivität sind in der Tabelle 5 beschrieben.

Tabelle 5: Faktor-XIII-Aktivität im peripheren Blut.

GRUPPE / ZEITPUNKT	0h	1,5h	3h	p
KONTROLLE	101 (86-120)	90 (87-97)	78 (65-84)	
ENDOTOXIN	109 (97-117)	82 (74-87)	56 (48-67)	P<0.05 vs. Kontrolle
C1-INH+FXIII	91 (80-102)	73 (70-77)	46 (36-54)	P<0.05 vs. Kontrolle

KONTROLLE: Kontrollgruppe; ENDOTOXIN: Endotoxingruppe (nur LPS); C1-INH+FXIII: C1-INH+FXIII-Gruppe (LPS plus C1-INH plus FXIII); 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner über den gesamten Verlauf.

#### 4.2.4 ANTITHROMBIN-III-AKTIVITÄT

Die Werte der Antithrombin-III-Aktivität sind in der Tabelle 6 beschrieben.

Tabelle 6: Antithrombin-III-Aktivität im peripheren Blut.

GRUPPE / ZEITPUNKT	0h	1,5h	3h	p
KONTROLLE	109 (105-124)	111 (98-119)	106 (98-113)	
ENDOTOXIN	118 (110-124)	100 (93-107)	79 (75-86)	P<0.05 vs. Kontrolle
C1-INH+FXIII	92 (65-114)	74 (56-98)	62 (55-78)	P<0.05 vs. Kontrolle

KONTROLLE: Kontrollgruppe; ENDOTOXIN: Endotoxingruppe (nur LPS); C1-INH+FXIII: C1-INH+FXIII-Gruppe (LPS plus C1-INH plus FXIII); 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner über den gesamten Verlauf.

## 4.3 HÄMODYNAMIK

### 4.3.1 HERZFREQUENZ

Die Herzfrequenz lag in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 0 bei 377 (343-394)/min und blieb im Verlauf weitgehend stabil. Die HF der Endotoxingruppe war im Verlauf signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die C1-INH+FXIII-Gruppe unterschieden sich bezüglich der Herzfrequenz nicht signifikant von der Kontrollgruppe.

Tabelle 7: Herzfrequenz

GRUPPE / ZEITPUNKT	0h	1h	2h	3h	p
KONTROLLE	377 (343-394)	343 (334-347)	360 (339-369)	394 (356-398)	
ENDOTOXIN	360 (347-386)	360 (343-377)	394 (369-411)	394 (389-411)	P<0.05 vs. Kontrolle
C1-INH+FXIII	377 (356-381)	360 (339-377)	377 (373-394)	369 (356-394)	

KONTROLLE: Kontrollgruppe; ENDOTOXIN: Endotoxingruppe (nur LPS); C1-INH+FXIII: C1-INH+FXIII-Gruppe (LPS plus C1-INH plus FXIII); 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner über den gesamten Verlauf.

### 4.3.2 MITTLERER ARTERIELLER BLUTDRUCK

Der mittlere arterielle Blutdruck lag in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 0 bei 111 (99-133)/mmHg und blieb im Verlauf weitgehend stabil. Die Endotoxingruppe unterschied sich bezüglich des MAP nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Die C1-INH+FXIII-Gruppe unterschied sich im Verlauf signifikant von der Kontrollgruppe bezüglich des MAP.

Tabelle 8: Mittlerer arterieller Blutdruck

GRUPPE / ZEITPUNKT	0h	1h	2h	3h	p
KONTROLLE	111 (99-133)	105 (89-121)	118 (96-145)	116 (111-132)	
ENDOTOXIN	130 (118-136)	97 (80-114)	102 (90-115)	113 (99-122)	
C1-INH+FXIII	132 (123-135)	96 (80-112)	97 (87-102)	111 (105-117)	P<0.05 vs. Kontrolle

KONTROLLE: Kontrollgruppe; ENDOTOXIN: Endotoxingruppe (nur LPS); C1-INH+FXIII: C1-INH+FXIII-Gruppe (LPS plus C1-INH plus FXIII); 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner über den gesamten Verlauf.

## 5 DISKUSSION

In der Pathogenese der Sepsis spielen die Störung der Mikrozirkulation mit gesteigerter Mediatorenfreisetzung, Leukozytenadhärenz und -migration sowie die Aktivierung des Gerinnungs- und Komplementsystems eine entscheidende Rolle.

Ziel unserer Arbeit war es, den Einfluss von C1-Esterase-Inhibitor in Kombination mit Faktor XIII auf die intestinale Mikrozirkulation in einem Ratten-Sepsismodell mithilfe der Intravitalmikroskopie zu untersuchen.

In unserer Studie beobachteten wir nach Endotoxingabe eine Verminderung der temporär adhärenenten Leukozyten (Roller) und eine Erhöhung von fest adhärenenten Leukozyten (Sticker) der intestinalen Submukosa von Ratten. Die Zahl der fest adhärenenten Leukozyten in Venolen 3. Grades der intestinalen Submukosa konnte durch die Gabe der Medikamentenkombination von C1-Esterase-Inhibitor und Faktor XIII gesenkt werden. Wir konnten keinen Einfluss der Medikamentenkombination auf die funktionelle Kapillardichte zeigen.

### 5.1 METHODIK

#### 5.1.1 SEPSISMODELL

In der Literatur werden hauptsächlich zwei Verfahren beschrieben, um tierexperimentell pathophysiologische Veränderungen zu erzielen. Bei dem ersten Verfahren handelt es sich um ein **Sepsismodell**, bei dem vitale Infektionserreger entweder von außen in den Organismus eingebracht oder innerhalb des Organismus freigesetzt werden. Bei diesem Modell gibt es unterschiedliche Wege zur Sepsisinduktion mit vitalen Infektionserregern:

- Erzeugung von Weichteilinfektionen durch Einbringen von Fremdmaterial
- Implantation von Faeces oder lebenden Erregern in die Peritonealhöhle
- Parenterale Applikation von lebenden Mikroorganismen
- Chirurgische Prozeduren zur Zerstörung der normalen intestinalen Barrieren mit Bakterientranslokation mit der Folge einer Peritonitis wie das CLP-Modell (cecal ligation and puncture) [92].

Bei dem zweiten Verfahren handelt es sich um ein **Endotoxinmodell**, indem ein Zellmembranbestandteil gramnegativer Bakterien, das Endotoxin, verabreicht wird. Hier können unterschiedliche Toxine verabreicht werden. Die Applikation kann sowohl intraperitoneal als auch intravenös als Bolus oder über eine kontinuierliche Gabe erfolgen.

Bei der Wahl des passenden Verfahrens werden unterschiedliche Kriterien analysiert. Während bei den Sepsismodellen ein längerer Zeitraum zur Induktion der Sepsis benötigt wird, was mit längerer Wartezeit verbunden ist, können bei dem Endotoxinmodell physiologische und laborchemische Veränderungen bereits 30-45min nach Toxinapplikation beobachtet werden [93].

Ebenso ist das Endotoxinmodell durch die genaue Quantifizierbarkeit der „challenge“-Dosis und dem damit verbundenen Symptom-Zeit-Verlauf sowie der Reproduzierbarkeit dem Sepsismodell überlegen. Beim Sepsismodell ist die Ermittlung der Dosis, die Art der Erreger und des Zeitpunktes der Translokation schwer zu bestimmen. Außerdem sind die Handhabung des LPS und der kleinere operative Aufwand beim Endotoxinmodell von Vorteil. Deswegen entschieden wir uns in unserer Studie für das Endotoxinmodell.

Die Leukozyten-Endothel-Interaktion hängt auch von den Blutdruckveränderungen ab. Diese haben Einfluss auf die Flussgeschwindigkeit der Blutzellen sowie auf die Scherkräfte zwischen Blutzellen und Endothel. Deswegen war es wichtig, ein Studiendesign zu wählen, bei dem die Applikationsart und Dosierung von Endotoxin den geringsten Einfluss auf den Blutdruck haben.

Während eine Bolusgabe von Endotoxin zu Blutdruckabfall führt, ist eine kontinuierliche Gabe mit eher stabilen Blutdruckwerten verbunden. Die kontinuierliche Applikation des Endotoxins scheint einerseits einen kleineren Einfluss auf die hämodynamische Situation zu haben als die Bolusinjektion, andererseits simuliert sie besser die Endotoxinfreisetzung beim septischen Patienten [94].

Hinsichtlich der Dosis zeigten unterschiedliche Studien, dass bei Applikation einer niedrigen Bolusdosis des Endotoxins eine hyperdynamische Kreislaufreaktion zu beobachten ist [95]. Bei hohen Bolusdosen von 40 mg/kg KG kommt es dagegen zu hypodynamen Kreislaufsituationen mit erhöhten peripheren Widerständen und erniedrigtem Herzzeitvolumen [96]. In der Studie von Xu et al. wurde ein Endotoxinmodell (Tierspezies Ratte) mit der Dosis von 5 mg/kg KG Endotoxin von E.

coli O55:B5 gewählt. Es konnte ein unveränderter MAP bei Anstieg der Herzfrequenz beobachtet werden. Eine Stunde nach Induktion der Endotoxämie wurde ein erhöhtes Herzminutenvolumen registriert. Somit lag ein hyperdynamisches Modell der Endotoxämie vor [97]. Um den geringsten Einfluss auf die Kreislaufsituation zu erreichen, wählten wir die Dosis von 10 mg/kg KG, die wir über eine kontinuierliche Gabe appliziert haben.

Schmidt et al. verglichen in ihrem Rattenmodell eine Kontrollgruppe mit zwei Endotoxingruppen, wobei die eine 1,5 mg/kg KG LPS und die andere 15 mg/kg KG Endotoxin kontinuierlich appliziert bekam. Der MAP blieb in der Kontroll- und der 1,5 mg/kg KG LPS-Gruppe über die ganze Versuchszeit stabil. In der mit 15 mg/kg KG LPS behandelten Gruppe kam es zwar zu einem leichten Abfall des MAP, dieser war aber nicht statistisch signifikant [98]. Keine signifikanten MAP-Veränderungen nach einer kontinuierlichen Applikation von 5 mg/kg KG LPS beschrieben ebenfalls Birnbaum et al. [99]. Weitere Autoren nannten keine signifikante MAP-Veränderungen weder nach einer Applikation von 2 mg/kg KG Endotoxin noch nach 2,5 mg/kg KG LPS per Continuum [26, 100].

Ebenfalls können zwischen den einzelnen Chargen desselben Endotoxin-Serotyps Wirkunterschiede auftreten [101]. Für alle Versuche verwendeten wir deshalb dieselbe Endotoxin Charge (Lipopolysaccharid von E. coli, Serotyp O55:B5).

Anästhetika haben nach unterschiedlichen Studien Einfluss auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion. So beschrieben Schmidt et al. eine Verringerung der Leukozytenadhärenz bei Einsatz von Ketamin [102]. Janssen et al. berichteten, dass der Einsatz von Pentobarbital im Gegensatz zu Fentanyl keinen Einfluss auf Leukozytenadhärenz zeigte. Daher entschieden wir uns für Pentobarbital als Narkotikum [103].

Im Hinblick auf den Einsatz von Rhodamin-6G, das als Markersubstanz für die Darstellung der Leukozyten während der Intravitalmikroskopie diente, werden in der Literatur keine signifikanten Veränderungen der Leukozyten-Endothel-Interaktion angegeben [104, 105].

Zwischen dem tierexperimentellen Modell und der klinischen Sepsis gibt es wesentliche Unterschiede, sei es im zeitlichen Verlauf oder in der Art der Erreger. Da das Endotoxinmodell jedoch in der Lage ist, für die Sepsis wichtige pathophysiologische und laborbiochemische Veränderungen hervorzurufen, erschien das Modell für die Studie am besten geeignet.

## 5.2 INTRAVITALMIKROSKOPIE

Statische Methoden wie Evaluierung der Laborparameter oder der histologischen Schnitte können Aussagen zur Momentaufnahme der mikrohämodynamischen Situation machen. Die Intravitalmikroskopie dagegen ist für die Beobachtung der Mikrozirkulation in vivo mit der Beurteilung der dynamischen Prozesse, wie der Leukozyten-Endothel-Interaktion oder der Kapillarperfusion von wichtiger Bedeutung [106, 107].

In unsere Studie konnte anhand der hämodynamischen und laborchemischen Veränderungen gezeigt werden, dass das etablierte Versuchsmodell charakteristische klinische Konstellationen bei der Sepsis widerspiegelt. Die ersten Effekte der Medikamentenkombination von C1-INH+FXIII auf die Mikrozirkulation konnten gezeigt werden.

### 5.2.1 FUNKTIONELLE KAPILLARDICHTE

Die funktionelle Kapillardichte in den Villi intestinales der Kontrollgruppe lag mit durchschnittlich 688/cm etwa auf dem gleichen Niveau wie die unbehandelten Endotoxingruppe mit 715/cm sowie der C1-INH+FXIII-Gruppe mit 705/cm. Hier fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen.

In der longitudinalen Muskularis lag die funktionelle Kapillardichte der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 173/cm etwa auf dem gleichen Niveau wie der unbehandelten Endotoxingruppe mit 178/cm sowie der C1-INH+FXIII mit 177/cm. Wir beobachteten keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen.

Die funktionelle Kapillardichte in der zirkulären Muskularis der unbehandelten Endotoxingruppe lag mit durchschnittlich 226/cm signifikant höher als bei den Tieren der Kontrollgruppe mit 203/cm. Die Werte der C1-INH+FXIII-Gruppe lagen mit 227/cm auf dem Niveau der Endotoxingruppe. Hier fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

In der Literatur findet man widersprüchliche Untersuchungen zur Kapillarperfusion in der Darmwand bei Endotoxinämie.

Die Minderperfusion bei der Endotoxinämie konnte in mehreren Studien gezeigt werden. So bestätigten Drazenovic et al. mittels Carbon-Injektionstechnik eine verminderte funktionelle Kapillardichte nach Endotoxingabe. Theuer et al. zeigten bei einer normotensiven Bakteriämie eine 30%ige Vasokonstriktion in intestinalen A1- und

A3-Arteriolen, wobei die Mukosaperfusion um ca. 40 % (Messung mittels Laser-Doppler-Flowmetrie) zurückging [108, 109]. Schmidt et al. zeigten intravitalmikroskopisch eine 35%ige Reduktion des villösen Blutflusses bei Endotoxinämie [98]. Ebenfalls Farquhar et al. fanden in einem CLP-Modell an der Ratte vergrößerte interkapilläre Areale als Ausdruck einer verminderten Kapillardichte [110]. Einige Autoren konnten keine Minderperfusion bei der Endotoxinämie bestätigen. So fanden VanderMeer et al. keine mukosale Hypoperfusion bei Endotoxinämie [111]. Nevière et al. konnten ebenfalls keine verminderte Kapillardichte in der Mukosa in einem Pseudomonas-Sepsis-Modell bestätigen [112].

Revelly et al. dagegen zeigten mit der Mikrosphärentechnik, dass es bei Endotoxinämie zu einer Umverteilung der Durchblutung in der Darmwand zu Gunsten der Mukosa und zum Nachteil der Muskularis kommt, wobei der Gesamtblutfluss zum Darm in dieser Studie konstant blieb [113].

Die Hypothese, dass eine mukosale Perfusionsverminderung von pathogenetischer Relevanz für die Entwicklung einer intestinalen Hyperpermeabilität ist, wird durch tierexperimentelle Studien zwar gestützt, ist aber offensichtlich von dem Versuchsmodell und der Methodik abhängig. Navaratnam et al. konnten zeigen, dass eine gestörte Darmpermeabilität vor allem in minderperfundierten Darmabschnitten auftritt [114]. Fink et al. zeigten dagegen keine Störung der intestinalen Permeabilität bei einer mechanischen Verminderung der mesenterialen Perfusion auf Werte, wie sie bei der Endotoxinämie beobachtet werden [115]. Somit kann die These einer Störung der intestinalen Permeabilität durch eine alleinige, mukosale Hypoperfusion nicht bestätigt werden.

In unserer Studie konnten wir keinen Einfluss der Medikamentenkombination von C1-Esterase-Inhibitor und Faktor XIII auf die funktionelle Kapillardichte zeigen. Wir fanden außerdem keine Beeinträchtigung der Mikrozirkulation in den Villi intestinales der Dünndarmmukosa sowie der longitudinalen und zirkulären Dünndarmmuskulatur nach der Endotoxinämie. Wir entdeckten eine leicht erhöhte FCD in der zirkulären Dünndarmmuskulatur zwei Stunden nach der Endotoxinämie als Ausdruck einer Umverteilung des Blutflusses. Das steht allerdings im Widerspruch zu den Ergebnissen früherer Studien mit kleineren LPS-Dosen von 2,5 mg/kg/h sowie mit 20mg/kg in 15 min. In dieser Zeit kam es zu einer Abnahme der funktionellen Kapillardichte [100, 104, 116].

In unserem Modell konnten wir im Gegensatz zu den früheren Studien keinen Einfluss der Medikamentenkombination auf die FCD zeigen. Eine Ursache dafür ist vermutlich, dass wir keine Beeinträchtigung der FCD während der Endotoxinämie induzieren konnten.

#### 5.2.2 LEUKOZYTENADHÄRENZ

Der Prozess der Leukozyten-Endothel-Interaktion beginnt mit der Migration der Leukozyten aus der Blutstrommitte zum Endothel hin. Hier kommt es zum Rollen von Leukozyten über das Endothel, dann zur festen Adhärenz und schließlich zur Migration ins Gewebe [117]. Die aktivierten Leukozyten setzen Mediatoren frei (z.B. Sauerstoffradikale, Elastase, Kollagenase, Myeloperoxidase), die das Endothel schädigen, die Gefäßpermeabilität erhöhen und weitere Kaskadensysteme aktivieren können [118]. Im Rahmen der Sepsis kommt es zu einer überschießenden Aktivierung der Leukozyten. Ein wichtiger Ansatz zur Sepsistherapie ist somit die Verminderung der Leukozytenadhärenz und der schädigenden Folgereaktionen. Unter physiologischen Bedingungen beobachtet man ein spontanes Leukozytenrolling. Da jedes operative Trauma eine Leukozytenaktivierung bewirken kann, lassen sich Aussagen zum spontanen Leukozytenrollen nur an noninvasiv zugänglichen Geweben (Nagelbett, Haut, Auge) zuverlässig treffen.

In unserer Studie war es deshalb wichtig, die Auslagerung der Darmabschnitte in No-Touch-Technik durchzuführen, um die Aktivierung der Leukozyten möglichst zu vermeiden. Der Anteil rollender Leukozyten kann bis zu 45 % der Gesamtleukozyten („rolling pool“) betragen [119]. Der Vorgang wird als Bereitschaft der Leukozyten für eine jederzeitige Aktivierung im Rahmen der Immunabwehr angesehen und hängt von der Art des untersuchten Gewebes ab [120]. Fest adhärenente Leukozyten werden unter physiologischen Bedingungen (Wachheit, Stressfreiheit, Abwesenheit von Pathogenen oder Testsubstanzen) in der Regel nicht beobachtet [121].

##### 5.2.2.1 TEMPORÄR ADHÄRENTE LEUKOZYTEN (ROLLER)

Unter unseren Versuchsbedingungen wurde in der Kontrollgruppe ein deutliches Rollen der Leukozyten beobachtet. Wir fanden in den Venolen 1. Grades der intestinalen Submukosa bei den Tieren der Kontrollgruppe durchschnittlich 35 Leukozyten pro Minute und den Venolen 3. Grades 27 Leukozyten pro Minute. Die Gewebeauslagerung könnte die verstärkte Ursache für dieses Leukozytenrolling sein.

Fiebig et al. beschrieben bereits fünf Minuten nach Auslagerung des Gewebes eine signifikante Zunahme des spontanen Leukozytenrollens in den mesenterialen Venolen, wobei dies auch nach 30 Minuten nachweisbar war [122]. Massberg und Boros untersuchten das Rollen der Leukozyten in der intestinalen Submukosa unter Intravitalmikroskopie nach einer 20-minütigen Stabilisierungsperiode und gaben den normalen Anteil rollender Leukozyten an der Gesamtzahl der freifließenden Leukozyten mit bis zu 10 % in den größeren V1-Venolen und bis 25 % in den kleineren V3-Venolen an [119, 123]. Gaboury et al. fanden bei Ratten in einem Intravitalmikroskopiemodell am Mesenterium einen Roller-Flow von 20/min [124]. Ley registrierte bei etwa gleichen Ausgangswerten nach 40 Minuten einen Maximalwert von 80/min im Mesenterium der Ratten [125]. In der Folge ging der Roller-Flow in dieser Studie wieder zurück. Scalia et al. fanden am Darm Baseline-Werte von 15-20 rollenden Leukozyten pro Minute [126]. Trotz supportiver Maßnahmen wie einer Ruhephase von 60 min vor dem Mikroskopieren, Superfusion mit erwärmter Perfusionslösung und Vermeidung von Manipulation am präparierten Darm interpretieren wir die hohe Anzahl rollender Leukozyten der Kontrollgruppe als Veränderung des physiologischen Milieus.

In den Venolen 1. Grades der unbehandelten Endotoxingruppe lag die Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten mit durchschnittlich 8 Leukozyten pro min tendenziell niedriger als bei den Tieren der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 35 Leukozyten pro min. Hier fand sich jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. In den Venolen 3. Grades der unbehandelten Endotoxingruppe lag die Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten mit durchschnittlich 7 Leukozyten pro min signifikant niedriger als bei den Tieren der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 27 Leukozyten pro min.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Baatz et al. beschrieben, die zwei Stunden nach LPS-Applikation eine Verminderung des Leukozytenrolling in Gefäßen der Uvea beobachten konnten. Es kam zu einem bis zu 30 % verminderten Leukozytenrolling sowie zu einem Abfall der Leukozytenzahl im peripheren Blutbild [127]. Baatz wie auch Traber et al. beobachteten bei längerer Beobachtungszeit einen Wiederanstieg der Leukozytenzahl im peripheren Blutbild [128].

Diesen zeitlichen Ablauf kann man durch die verzögerte Freisetzung aus dem Knochenmark in Verbindung mit einer weiteren Entwicklung des Entzündungsgeschehens erklären. Baatz zeigte ein zunehmendes Leukozyten-Rolling

bei konstant erhöhter fester Leukozytenadhärenz vier bis sechs Stunden nach LPS-Applikation, wobei der Anstieg der Anzahl rollender Leukozyten nicht durch ein Ablösen schon adhärenter Leukozyten, sondern durch ein Nachliefern von Leukozyten verursacht wurde [127]. Traber konnte in einem Schafmodell ebenfalls einen Wiederanstieg der Leukozytenzahl im peripheren Blutbild acht bis zehn Stunden nach LPS-Bolusapplikation beobachten. Er zeigte, dass dieser Wiederanstieg der Leukozytenzahl vor allem durch Granulozyten verursacht war. Dabei wurde die Nachlieferung der Leukozyten vordergründig durch eine aktivierte Granulopoese verursacht [128]. In unserer Studie kam es zu einem signifikanten Abfall der Leukozyten im peripheren Blut in der unbehandelten Endotoxingruppe sowie der C1-INH+FXIII-Gruppe. Die Werte der Kontrollgruppe blieben im Verlauf stabil. Einen Wiederanstieg der Leukozyten konnten wir aufgrund eines kürzeren Versuchsablaufs nicht beobachten.

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten Birnbaum et al. ebenfalls eine signifikante Reduktion der temporär adhärenter Leukozyten in den Venolen 1. und 3. Grades während der Endotoxinämie [82].

Die in unserer Studie beobachtete Verminderung der temporär adhärenter Leukozyten (Roller) und Erhöhung von fest adhärenter Leukozyten (Sticker) nach Endotoxingabe ist eine typische Folge einer Entzündungsreaktion in einem Sepsismodell [82, 100].

In den Venolen 1. Grades der C1-INH+FXIII-Gruppe lag die Anzahl der temporär adhärenter Leukozyten mit durchschnittlich 7 Leukozyten pro min auf dem gleichen Niveau wie bei den Tieren der Endotoxingruppe mit durchschnittlich 8 Leukozyten pro min. In den Venolen 3. Grades der C1-INH+FXIII-Gruppe lag die Anzahl der temporär adhärenter Leukozyten mit durchschnittlich 6 Leukozyten pro min ebenfalls auf dem gleichen Niveau wie bei den Tieren der Endotoxingruppe mit durchschnittlich 7 Leukozyten pro min. Die Medikamentenkombination des C1-Esterase-Inhibitors mit Faktor XIII bewirkte keine signifikante Reduktion der temporär adhärenter Leukozyten in Venolen 1. und 3. Grades gegenüber der Endotoxingruppe.

Birnbaum et al. konnten keine signifikante Reduktion der temporär adhärenter Leukozyten in der mit Faktor XIII behandelten Gruppe gegenüber der Endotoxingruppe zeigen [82]. In einer späteren Studie konnte ebenfalls kein Einfluss der Medikamentenkombination des C1-Esterase-Inhibitors mit Faktor XIII auf die temporär adhärenter Leukozyten beobachtet werden [99].

### 5.2.2.2 *FEST ADHÄRENTE LEUKOZYTEN (STICKER)*

In den Venolen 1. Grades der unbehandelten Endotoxingruppe lag die Anzahl der fest adhärenen Leukozyten mit durchschnittlich 368 Leukozyten pro min signifikant höher als bei den Tieren der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 55 Leukozyten pro min. In den Venolen 3. Grades der unbehandelten Endotoxingruppe lag die Anzahl der fest adhärenen Leukozyten mit durchschnittlich 635 Leukozyten pro min signifikant höher als bei den Tieren der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 69 Leukozyten pro min. Dies entspricht der typischen Folge der Leukozytenaktivierung während der Endotoxinämie. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnten Birnbaum et al. ebenfalls eine signifikante Erhöhung der fest adhärenen Leukozyten in den Venolen 1. und 3. Grades während der Endotoxinämie beobachteten [82].

Gonzalez und Massberg beobachteten, dass sich nach Gabe von 5 mg/kg KG LPS die Anzahl fest adhärenen Leukozyten in den V1- und V3-Venolen vervierfachte [123]. Fukumura et al. beschrieben nach Gabe von 2 mg/kg KG LPS in den V1-Venolen eine Zunahme der fest adhärenen Leukozyten um den Faktor 8 und in den V3-Venolen um den Faktor 17 [129].

In unserer Studie war die Zahl der fest adhärenen Leukozyten nach Gabe von 10 mg/kg KG LPS in den Venolen 1. Grades bei der Endotoxingruppe siebenmal höher, in den Venolen 3. Grades neunmal höher als in der Kontrollgruppe. Da es zum Mikroskopiezeitpunkt keinen signifikanten Unterschied im mittleren arteriellen Blutdruck zwischen der Kontroll- und Endotoxingruppe gab, ist die vermehrte Leukozytenadhärenz nicht auf hämodynamische Veränderungen zurückzuführen.

Die Medikamentenkombination des C1-Esterase-Inhibitors mit Faktor XIII bewirkte eine signifikante Reduktion der fest adhärenen Leukozyten in den Venolen 3. Grades gegenüber der Endotoxingruppe, während die Anzahl der Sticker in den Venolen 1. Grades keinen signifikanten Unterschied ergab. Schmidt et al. zeigten in ihrer Studie eine unveränderte Leukozytenadhärenz während der Mikroskopiedauer in der Kontroll- und den mit C1- INH behandelten Gruppen (eine mit 7,5 U/kg KG, andere mit 15 U/kg KG). In der Endotoxingruppe kam es zu einem signifikanten Anstieg der adhärenen Leukozyten [26]. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass C1-Esterase-Inhibitor ebenfalls zu einer Reduktion der Leukozytenadhärenz führt, während Faktor XIII keinen Einfluss auf die Leukozytenadhärenz gezeigt hatte [82, 100]. Möglicherweise kann man die Reduktion der fest adhärenen Leukozyten in

Venolen 3. Grades der intestinalen Submukosa nach Gabe der Medikamentenkombination des C1-INH mit FXIII ganz dem Effekt des C1-INH zuschreiben.

### **5.3 LABORPARAMETER**

#### **5.3.1 LEUKOZYTEN**

In unserer Studie war die Leukozytenzahl im peripheren Blut zum Zeitpunkt null in allen drei Gruppen auf dem gleichen Niveau. Während die Werte der Kontrollgruppe im Verlauf stabil blieben, kam es nach Endotoxingabe in der unbehandelten Endotoxingruppe sowie der C1-INH+FXIII-Gruppe zu einem signifikantem Abfall der Leukozyten im peripheren Blut.

Per Definition kann es während der Sepsis sowohl zu einer Leukozytose ( $>12000/\text{mm}^3$ ) als auch zu einer Leukopenie ( $<4000/\text{mm}^3$ ) kommen [130]. In der Regel kommt es bei experimentellen Modellen nach Endotoxingabe initial zu einer ausgeprägten Leukozytopenie, wobei diese als Indikator für die Sepsis-Induktion gilt [26, 131]. Als Ursache für die Leukozytopenie wird die endotoxininduzierte Leukozytenadhärenz und Migration der Zellen aus der Blutstrombahn verbunden mit Änderungen in der Mikrohämodynamik angesehen [132]. In unserer Studie korrelierte der Abfall der Leukozyten im peripheren Blut mit der Zunahme der fest adhärennten Leukozyten in den mit Endotoxin behandelten Gruppen. Bei längerer Beobachtungszeit kann sich dem initialen Leukozytensturz eine reaktive Leukozytose anschließen. Diese ist eine Folge der verzögerten Leukozytenfreisetzung aus dem Knochenmark. Wegen des kurzen Versuchsaufbaus haben wir keinen Wiederanstieg der Leukozyten beobachten können. Die Medikamentenkombination von C1-Esterase-Inhibitor und Faktor XIII hatte keinen signifikanten Einfluss auf die periphere Leukozytenzahl im Vergleich zur Endotoxingruppe.

Schmidt et al. zeigten, dass die Leukozytenzahl im peripheren Blut in der Kontrollgruppe sowie in den beiden mit C1-INH behandelten Gruppen während der Versuchszeit stabil blieb. In der Endotoxingruppe kam es zu einem signifikanten Abfall der Leukozyten [26].

Lehmann et al. beschrieben neben einer Zunahme der fest adhärennten Leukozyten, einen signifikanten Abfall der Leukozyten im peripheren Blut in der Endotoxin- und der

C1-INH-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Endotoxin- und der C1-INH-Gruppe [100].

Birnbaum et al. berichteten ebenfalls von einem signifikanten Abfall der Leukozyten im peripheren Blut in der Endotoxin- und der C1-INH+FXIII-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Endotoxin- und der C1-INH+FXIII-Gruppe. Auch hier korrelierte der Abfall der Leukozyten im peripheren Blut mit der Zunahme der Leukozytenadhärenz [99].

### 5.3.2 C1-INH-, FXIII- UND ATIII-AKTIVITÄT

Weiterhin konnten wir einige Veränderungen zeigen, die für dieses Sepsismodell typisch sind. Die Ausgangswerte der C1-Esterase-Inhibitor-Aktivität waren in der Kontroll-, Endotoxin- und der C1-INH+FXIII-Gruppe gleich. Die Werte der Kontroll- und der Endotoxingruppe blieben über die Versuchszeit stabil. In der C1-INH+III-Gruppe kam es - wie erwartet - durch Zufuhr des C1-INH zu einer signifikanten Erhöhung der C1-Esterase-Inhibitor-Aktivität.

Die Ausgangswerte der Faktor-XIII-Aktivität in der Kontroll-, Endotoxin- und der C1-INH+FXIII-Gruppe waren auf dem gleichen Niveau. Wir konnten einen signifikanten Abfall der Faktor-XIII-Aktivität in den mit Endotoxin behandelten Gruppen beobachten. Nach der Applikation von C1-INH+FXIII kam es zu keiner Erhöhung des Faktors XIII im Vergleich zu Endotoxingruppe. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen einer früheren Studie, in der Faktor XIII Plasmaspiegel durch Gabe des Faktors XIII wieder erhöht werden konnte [82]. Da in beiden Studien die gleiche Substanz, Dosis und Auswertungsmethode benutzt wurden, bleibt die Ursache unklar.

Zum Zeitpunkt null lagen die Werte der Antithrombin-III-Aktivität in der Kontroll-, Endotoxin- und der C1-INH+FXIII-Gruppe auf dem gleichen Niveau. Die Werte der Kontrollgruppe blieben im Verlauf stabil. In der Endotoxin- und der C1-INH+FXIII-Gruppe kam es wie erwartet zu einer signifikanten Reduktion der Antithrombin-III-Aktivität. Während der Sepsis wird ATIII verbraucht beziehungsweise durch Elastase abgebaut.

#### 5.4 HÄMODYNAMIK

In unserer Studie waren die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Blutdruck in der Kontroll- und der Endotoxingruppe über den Versuchsverlauf stabil. Eine Stunde nach Versuchsbeginn kam es zu einem leichten Abfall des MAP. In der Endotoxingruppe war die HF im Vergleich zu der Kontrollgruppe erhöht. In der C1-INH+FXIII-Gruppe war die HF vergleichbar mit der Kontrollgruppe, allerdings gab es keinen signifikanten Unterschied zu der Endotoxingruppe. Ein Einfluss der eingesetzten Medikamentenkombination auf HF und MAP war - wie erwartet - nicht zu beobachten. Zum Zeitpunkt der Mikroskopie haben sich die Gruppen in Bezug auf HF sowie MAP nicht signifikant voneinander unterschieden. Somit kann man davon ausgehen, dass die Ergebnisse der FCD sowie der Leukozyten-Endothel-Interaktion durch die Hämodynamik nicht beeinflusst wurden.

Aufgrund des Einflusses von Blutdruck auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion werden besondere Anforderungen an das hämodynamische Profil eines Studiendesigns gestellt. Der Blutdruck hat einen Einfluss auf die Blutflussgeschwindigkeit. Die Blutflussgeschwindigkeit bestimmt nach der Newtonschen Formel die Scherkräfte, die maßgeblich die Leukozytenadhärenz modulieren [133]. Deswegen ist es wichtig eine klare Abgrenzung zum Einfluss makrohämodynamischer Veränderungen (systemische Hypotension) auf die Mikrozirkulation zu schaffen [127]. In unserer Studie stand die Untersuchung der Endotoxin-spezifischer Veränderungen der intestinalen Mikrozirkulation im Vordergrund. Wir wählten deshalb ein Studiendesign mit limitierter, kontinuierlicher Endotoxingabe und einer adäquaten Volumensubstitution zur Aufrechterhaltung normotensiver Blutdruckverhältnisse.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Sepsis ist eine der Haupttodesursachen auf der operativen Intensivstation und eine gefürchtete Bedrohung für den Patienten. Trotz des Fortschritts in der Medizin bleibt die Letalität der Sepsis sehr hoch.

In der Sepsis steht eine generalisierte Entzündungsreaktion im Mittelpunkt. Es kommt zur Freisetzung humoraler Entzündungsmediatoren und zur Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen.

Die Folge sind Mikrozirkulationsstörungen, Endothelschädigung und Erhöhung der Gefäßpermeabilität mit Ödembildung. Die Störung der intestinalen Mikrozirkulation spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des Multiorganversagens. Weiterhin kommt es zur überschießenden Aktivierung des Komplement- und Gerinnungssystems. Im Rahmen der Gerinnungsstörung kommt es zum Verbrauch der Gerinnungsfaktoren (Verbrauchskoagulopathie: „disseminierte intravasale Gerinnung“) und somit zu schweren Komplikationen in der Behandlung von Patienten mit Sepsis. Ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Behandlung einer überschießenden Gerinnung mit Verbrauchskoagulopathie besteht in medikamentösen Beeinflussung dieser Kaskaden.

C1-Esterase-Inhibitor ist der wichtigste Inhibitor des klassischen Aktivierungswegs des Komplementsystems, des Kallikrein-Kinin-Systems und der intrinsischen Gerinnung. Faktor XIII hat neben seiner gerinnungsaktiven Wirkung einen Einfluss auf die Zelladhäsion und -migration. Er stabilisiert außerdem die Endothelbarriere und vermindert dadurch die Ödembildung.

Ziel unserer Arbeit war es, den Einfluss einer Medikamentenkombination von C1-Esterase-Inhibitor und Gerinnungsfaktor XIII auf während der Sepsis pathologisch veränderte Parameter der Inflammation und intestinalen Mikrozirkulation in einem Sepsismodell an Ratten mittels Intravitalmikroskopie zu untersuchen. Die funktionelle Kapillardichte wurde als Parameter für die Integrität der Kapillarperfusion und das Ausmaß der Leukozytenadhärenz am Endothel der submukösen Venolen als Maß für die Leukozytenaktivierung gewertet.

In unserer Studie konnte die nach Endotoxinbelastung erhöhte Zahl der fest adhärennten Leukozyten in Venolen 3. Grades der intestinalen Submukosa durch die Gabe der Medikamentenkombination von C1-Esterase-Inhibitor mit dem Faktor XIII gesenkt

werden. Die beobachtete Verminderung der temporär adhärenen Leukozyten (Roller) und Erhöhung von fest adhärenen Leukozyten (Sticker) nach Endotoxingabe kann als Folge einer Entzündungsreaktion in einem Sepsismodell gesehen werden. Wir konnten keinen Einfluss der Medikamentenkombination auf die funktionelle Kapillardichte zeigen.

Weitere Untersuchungen der Medikamentenkombination von C1-Esterase-Inhibitor mit dem Faktor XIII in anderen Dosierungen erscheinen sinnvoll.

Schlüsselwörter:

Sepsis, Intravitalmikroskopie, Funktionelle Kapillardichte, Leukozytenaktivierung, Leukozyten-Endothel-Interaktion, C1-Esterase-Inhibitor, Faktor XIII

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Engel, C., et al., *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Med, 2007. **33**(4): p. 606-18.
2. Brunkhorst F. M, E.C., Reinhart K, Bone H.-G, Brunkhorst R, Burchardi H, Eckhardt K.-U, Forst H, Gerlach H, Grond S, Gründling M, Huhle G, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seeger W, Stüber F, Weiler N, Welte T, and Loeffler M., *Epidemiology of severe sepsis and septic shock in Germany - results from the German "Prevalence" Study*. Critical Care, 2005. **9 (Suppl 1)**(German Competence Network Sepsis (SepNet)): p. 83.
3. Angus, D.C., et al., *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. Crit Care Med, 2001. **29**(7): p. 1303-10.
4. Schottmüller, H., *Wesen und Behandlung der Sepsis. Verhandl dt Kongress InnNotes*. 1914. **Med 31:257-280**.
5. Werdan K., S.H.-P., Müller-Werdan U., *Sepsis und MODS*, ed. Springer. Vol. 4. 2005, Heidelberg: Springer-Verlag GmbH.
6. Levy, M.M., et al., *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. Crit Care Med, 2003. **31**(4): p. 1250-6.
7. Audebert, F.X., et al., *Epidemiologie der schweren Sepsis an einem deutschen Universitätsklinikum*. Med Klin (Munich), 2007. **102**(3): p. 195-202.
8. van Deventer, S.J. and D. Pajkr, *Neutrophil adhesion molecules and MOF*. Intensive Care Med, 1997. **23**(5): p. 487-8.
9. Calandra, T., P.Y. Bochud, and D. Heumann, *Cytokines in septic shock*. Curr Clin Top Infect Dis, 2002. **22**: p. 1-23.
10. Bochud, P.Y. and T. Calandra, *Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment*. Bmj, 2003. **326**(7383): p. 262-6.
11. Parrillo, J.E., *Pathogenetic mechanisms of septic shock*. N Engl J Med, 1993. **328**(20): p. 1471-7.
12. Raetz, C.R. and C. Whitfield, *Lipopolysaccharide endotoxins*. Annu Rev Biochem, 2002. **71**: p. 635-700.
13. Raetz, C.R., et al., *Lipid A modification systems in gram-negative bacteria*. Annu

- Rev Biochem, 2007. **76**: p. 295-329.
14. McAleer, J.P. and A.T. Vella, *Understanding how lipopolysaccharide impacts CD4 T-cell immunity*. Crit Rev Immunol, 2008. **28**(4): p. 281-99.
  15. Tobias, P.S., et al., *Cross-linking of lipopolysaccharide (LPS) to CD14 on THP-1 cells mediated by LPS-binding protein*. J Immunol, 1993. **150**(7): p. 3011-21.
  16. Schumann, R.R., et al., *Structure and function of lipopolysaccharide binding protein*. Science, 1990. **249**(4975): p. 1429-31.
  17. Goyert, S.M., et al., *The CD14 monocyte differentiation antigen maps to a region encoding growth factors and receptors*. Science, 1988. **239**(4839): p. 497-500.
  18. Haziot, A., et al., *The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage*. J Immunol, 1988. **141**(2): p. 547-52.
  19. Senftleben, U. and M. Karin, *The IKK/NF-kappa B pathway*. Crit Care Med, 2002. **30**(1 Suppl): p. S18-26.
  20. Durieux, J.J., et al., *The two soluble forms of the lipopolysaccharide receptor, CD14: characterization and release by normal human monocytes*. Eur J Immunol, 1994. **24**(9): p. 2006-12.
  21. Loppnow, H., *Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen*. Internist (Berl), 2001. **42**(1): p. 13-4, 17-27.
  22. Makrides, S.C., *Therapeutic inhibition of the complement system*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(1): p. 59-87.
  23. Ghebrehiwet, B., et al., *Mechanisms of activation of the classical pathway of complement by Hageman factor fragment*. J Clin Invest, 1983. **71**(5): p. 1450-6.
  24. Gerard, C., *Complement C5a in the sepsis syndrome - too much of a good thing?* N Engl J Med, 2003. **348**(2): p. 167-9.
  25. Fourrier, F., et al., *Coagulation inhibitor substitution during sepsis*. Intensive Care Med, 1995. **21 Suppl 2**: p. S264-8.
  26. Schmidt, W., et al., *C1-esterase inhibitor and its effects on endotoxin-induced leukocyte adherence and plasma extravasation in postcapillary venules*. Surgery, 1999. **125**(3): p. 280-7.
  27. Cicala, C. and G. Cirino, *Linkage between inflammation and coagulation: an*

- update on the molecular basis of the crosstalk.* Life Sci, 1998. **62**(20): p. 1817-24.
28. Roberts, H.R., et al., *Newer concepts of blood coagulation.* Haemophilia, 1998. **4**(4): p. 331-4.
  29. Hesselvik, J.F., et al., *Protein C, protein S and C4b-binding protein in severe infection and septic shock.* Thromb Haemost, 1991. **65**(2): p. 126-9.
  30. Tonnesen, M.G., *Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium.* J Invest Dermatol, 1989. **93**(2 Suppl): p. 53S-58S.
  31. Harlan, J.M., *Leukocyte-endothelial interactions.* Blood, 1985. **65**(3): p. 513-25.
  32. Ley, K., *Leukocyte adhesion to vascular endothelium.* J Reconstr Microsurg, 1992. **8**(6): p. 495-503.
  33. Moore, K.L., et al., *Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells.* J Cell Biol, 1992. **118**(2): p. 445-56.
  34. Bevilacqua, M.P., et al., *Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins.* Science, 1989. **243**(4895): p. 1160-5.
  35. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion.* J Leukoc Biol, 1994. **55**(5): p. 662-75.
  36. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm.* Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
  37. Lobo, S.M., et al., *Gut mucosal damage during endotoxic shock is due to mechanisms other than gut ischemia.* J Appl Physiol, 2003. **95**(5): p. 2047-54.
  38. Swank, G. and E. Deitch, *Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes.* World J Surg, 1996. **20**(4): p. 411-7.
  39. Taylor, D.E., *Revving the motor of multiple organ dysfunction syndrome. Gut dysfunction in ARDS and multiorgan failure.* Respir Care Clin N Am, 1998. **4**(4): p. 611-31, vii-viii.
  40. Aird, W.C., *The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome.* Blood, 2003. **101**(10): p. 3765-77.
  41. Hack, C.E. and S. Zeerleder, *The endothelium in sepsis: source of and a target*

- for inflammation*. Crit Care Med, 2001. **29**(7 Suppl): p. S21-7.
42. Buwalda, M. and C. Ince, *Opening the microcirculation: can vasodilators be useful in sepsis?* Intensive Care Med, 2002. **28**(9): p. 1208-17.
  43. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-91.
  44. Reinhart K, B.F., Bone H, Gerlach H, Grundling M, Kreymann G et al., *Diagnose und Therapie der Sepsis S-2-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)*. Anaesthesist 2006, 2006. **55 Suppl 1:43-56**.
  45. Bloos, F., Reinhart, K., *Antiinfektöse Strategien mit supportiven und adjunktiven Maßnahmen kombinieren*. Klinikarzt, 2004. **33**: p. 173-176.
  46. Rivers, E., et al., *Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1368-77.
  47. *Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1301-8.
  48. van den Berghe, G., et al., *Intensive insulin therapy in the critically ill patients*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1359-67.
  49. Annane, D., et al., *Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock*. Jama, 2002. **288**(7): p. 862-71.
  50. Bernard, G.R., et al., *Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis*. N Engl J Med, 2001. **344**(10): p. 699-709.
  51. Bensa, J.C., A. Reboul, and M.G. Colomb, *Biosynthesis in vitro of complement subcomponents C1q, C1s and C1 inhibitor by resting and stimulated human monocytes*. Biochem J, 1983. **216**(2): p. 385-92.
  52. Heda, G.D., et al., *Interferon gamma increases in vitro and in vivo expression of C1 inhibitor*. Blood, 1990. **75**(12): p. 2401-7.
  53. Zuraw, B.L. and M. Lotz, *Regulation of the hepatic synthesis of C1 inhibitor by the hepatocyte stimulating factors interleukin 6 and interferon gamma*. J Biol Chem, 1990. **265**(21): p. 12664-70.

54. Behring, *Fachinformation Berinert P 500 E*. Behring GmbH, 2007.
55. Chan, J.Y., et al., *The inhibition of activated factor XII (Hageman factor) by antithrombin III: the effect of other plasma proteinase inhibitors*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977. **74**(1): p. 150-8.
56. Guerrero, R., et al., *Endotoxin-induced pulmonary dysfunction is prevented by C1-esterase inhibitor*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(6): p. 2754-60.
57. Scherer, R.U., et al., *The influence of C1-esterase inhibitor substitution on coagulation and cardiorespiratory parameters in an endotoxin-induced rabbit model of hypercoagulability*. *Semin Thromb Hemost*, 1996. **22**(4): p. 357-66.
58. Fischer, M.B., et al., *Increased susceptibility to endotoxin shock in complement C3- and C4-deficient mice is corrected by C1 inhibitor replacement*. *J Immunol*, 1997. **159**(2): p. 976-82.
59. Jansen, P.M., et al., *Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock*. *J Immunol*, 1998. **160**(1): p. 475-84.
60. Nuijens, J.H., et al., *Proteolytic inactivation of plasma C1- inhibitor in sepsis*. *J Clin Invest*, 1989. **84**(2): p. 443-50.
61. Wuillemin, W.A., et al., *Activation of the intrinsic pathway of coagulation in children with meningococcal septic shock*. *Thromb Haemost*, 1995. **74**(6): p. 1436-41.
62. Hack, C.E., et al., *C1-inhibitor substitution therapy in septic shock and in the vascular leak syndrome induced by high doses of interleukin-2*. *Intensive Care Med*, 1993. **19 Suppl 1**: p. S19-28.
63. Laki, K. and L. Lorand, *On the Solubility of Fibrin Clots*. *Science*, 1948. **108**(2802): p. 280.
64. Duckert, F., E. Jung, and D.H. Shmerling, *A hitherto undescribed congenital haemorrhagic diathesis probably due to fibrin stabilizing factor deficiency*. *Thromb Diath Haemorrh*, 1960. **5**: p. 179-86.
65. Ostermann, H., *Biochemie und Funktion des Faktor XIII*. *Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels*. 1999, Basel: Karger: Egbring R, Seitz R, Wozniak G. 1-6.
66. Nagy, J.A., P. Henriksson, and J. McDonagh, *Biosynthesis of factor XIII B subunit by human hepatoma cell lines*. *Blood*, 1986. **68**(6): p. 1272-9.

67. Ueki, S., J. Takagi, and Y. Saito, *Dual functions of transglutaminase in novel cell adhesion*. J Cell Sci, 1996. **109 (Pt 11)**: p. 2727-35.
68. Knox, P., S. Crooks, and C.S. Rimmer, *Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots*. J Cell Biol, 1986. **102(6)**: p. 2318-23.
69. Kamitsuji, H., et al., *Activity of blood coagulation factor XIII as a prognostic indicator in patients with Henoch-Schonlein purpura. Efficacy of factor XIII substitution*. Eur J Pediatr, 1987. **146(5)**: p. 519-23.
70. Bundesärztekammer, V.u.W.B.d., *Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten: Therapie mit FXIII-Konzentraten*. Deutscher Ärzte-Verlag Köln 2003, 2003.
71. Behring, *Fachinformation Fibrogammin® HS*. Behring GmbH, 2004.
72. Beck, E., F. Duckert, and M. Ernst, *The influence of fibrin stabilizing factor on the growth of fibroblasts in vitro and wound healing*. Thromb Diath Haemorrh, 1961. **6**: p. 485-91.
73. Miyachi N, T.H., MATSUIISHI T, *Effect of plasmafactor XIII (BI 71.023) on the growth and the morphological changes of human fibroblasts on plasma clots*. Jpn Pharmacol Ther, 1993. **21**: **1721-1727**.
74. Wozniak G, N.T., Dapper F, Piper HM, Hehrlein FW, *Experimental approach to improve endothelial barrier function in myocardium*. Int J Ang, 1999. **8**: p. 119-123.
75. Noll, T., et al., *Effect of factor XIII on endothelial barrier function*. J Exp Med, 1999. **189(9)**: p. 1373-82.
76. Wozniak G, N.T., Schleifer H, Schindler E, Bauer J, Dapper F, Hehrlein FW, *Loss of endothelial barrier function during congenital heart surgery in children and newborns: factors causing edema formation*. Cardiovasc Surg, 1997. **5(Suppl 1:48)**.
77. Wozniak G, N.T., Hehrlein FW, *Einfluss von Faktor XIII auf die endotheliale Barriere- Klinik und Experiment*. Klinische Aspekte des Faktor XIII Mangels, 1999: p. 16-25.
78. Blümel J, K.H., Krieg G, Kutschera H, *Faktor-XIII-Substitution und Wundreißfestigkeit*. Langenbecks Arch Chir, 1974. **Suppl: 245-248**.
79. Metzner HJ, D.G., DIEHL K-H, *Faktor XIII und Wundheilung -präklinische*

- Untersuchungen. Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung.*, 1999(111-118).
80. Claes L, B.W., Wilke HJ, Laule A, Gerngroß H, *Beschleunigung der Kallusbildung und Kallusreifung durch Faktor-XIII-Gaben.* Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. 1999, Basel: Karger: Egbring R, Seitz R, Wozniak G. 173-183.
  81. Schwab R, C.L., Gerngross H, *Faktor XIII und Knochenbruchheilung - experimentelle und klinische Daten.* Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. Diagnostik, klinische Relevanz, klinische Forschung., 1999: p. 166-172.
  82. Birnbaum, J., et al., *Effects of coagulation factor XIII on intestinal functional capillary density, leukocyte adherence and mesenteric plasma extravasation in experimental endotoxemia.* Crit Care, 2006. **10**(1): p. R29.
  83. Rasche, H., *Blutgerinnungsfaktor XIII und Fibrinstabilisierung.* Klin Wochenschr, 1975. **53**(24): p. 1137-45.
  84. Mishima, Y., et al., *Factor XIII in der Behandlung postoperativer therapierefraktärer Wundheilungsstörungen. Ergebnisse einer kontrollierten Studie.* Chirurg, 1984. **55**(12): p. 803-8.
  85. Gerngross H, S.R., Graf K, *Faktor XIII und Knochenheilung.* Med Welt, 1987. **38**: p. 1533-1539.
  86. Jullien, D., et al., *Coagulation factor XIII in scleroderma.* Eur J Dermatol, 1998. **8**(4): p. 231-4.
  87. Muto T, I.K., Nakamura N, Matsuda M, Sirai Y, Ogawa N, *Factor supplement therapy- effects or disturbances of wound healing.* Biom Progress, 1997. **10**:**16**.
  88. Päge S, S.E., *Substitution mit FXIII Konzentrat - eine adjuvante Behandlung bei therapieresistenter aktiver Colitis ulcerosa?* Klinische Aspekte des Faktor-XIII-Mangels. 1999, Basel: Karger: Egbring R, Seitz R, Wozniak G. 202-206.
  89. Wozniak G, N.T., Dapper F, Piper HM, Hehrlein FW, *The fibrin-stabilizing factor as a topical means for leg ulcer healing: biochemical and experimental properties and clinical results.* Int J Angiology, 1998. **7**: p. 109-114.
  90. Wozniak G, L.H., NOLL T, ALEMANY J, *Behandlung stark sekretierender, chronischer Wunden mit Faktor XIII.* III Klinische Modalitäten und Ergebnisse Zeitschrift für Wundheilung, 2001. **20**: p. 11-14.

91. Wozniak, G., et al., *Factor XIII prevents development of myocardial edema in children undergoing surgery for congenital heart disease*. Ann N Y Acad Sci, 2001. **936**: p. 617-20.
92. Wichterman, K.A., A.E. Baue, and I.H. Chaudry, *Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal*. J Surg Res, 1980. **29**(2): p. 189-201.
93. Yoshikawa, T., et al., *Changes in tissue antioxidant enzyme activities and lipid peroxides in endotoxin-induced multiple organ failure*. Circ Shock, 1994. **42**(1): p. 53-8.
94. Fink, M.P. and S.O. Heard, *Laboratory models of sepsis and septic shock*. J Surg Res, 1990. **49**(2): p. 186-96.
95. Johnston, T.D., W.W. Hampton, and D.E. Fry, *Septic hemodynamics produced by infusion of endotoxin*. Curr Surg, 1989. **46**(2): p. 101-3.
96. Brackett, D.J., et al., *Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia*. Circ Shock, 1985. **17**(4): p. 273-84.
97. Xu, D., et al., *Mechanisms of endotoxin-induced intestinal injury in a hyperdynamic model of sepsis*. J Trauma, 1993. **34**(5): p. 676-82; discussion 682-3.
98. Schmidt, H., et al., *Effect of endotoxemia on intestinal villus microcirculation in rats*. J Surg Res, 1996. **61**(2): p. 521-6.
99. Birnbaum, J., et al., *Impact of combined C1 esterase inhibitor/coagulation factor XIII or N-acetylcysteine/tirilazad mesylate administration on leukocyte adherence and cytokine release in experimental endotoxaemia*. J Int Med Res, 2008. **36**(4): p. 748-59.
100. Lehmann, C., et al., *Effects of C1 esterase inhibitor administration on intestinal functional capillary density, leukocyte adherence and mesenteric plasma extravasation during experimental endotoxemia*. Intensive Care Med, 2004. **30**(2): p. 309-14.
101. de Carvalho, H., et al., *Vascular permeability increase and plasma volume loss induced by endotoxin was attenuated by hypertonic saline with or without dextran*. Shock, 1999. **12**(1): p. 75-80.
102. Schmidt, H., et al., *Ketamine attenuates endotoxin-induced leukocyte adherence*

- in rat mesenteric venules. Crit Care Med, 1995. 23(12): p. 2008-14.*
103. Janssen, G.H., et al., *Different effects of anesthetics on spontaneous leukocyte rolling in rat skin. Int J Microcirc Clin Exp, 1997. 17(6): p. 305-13.*
  104. Lehmann, C., et al., *Reduction in intestinal leukocyte adherence in rat experimental endotoxemia by treatment with the 21-aminosteroid U-74389G. Intensive Care Med, 2001. 27(1): p. 258-63.*
  105. Nolte, D., et al., *Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice. Am J Physiol, 1994. 267(4 Pt 2): p. H1320-8.*
  106. Menger, M.D. and H.A. Lehr, *Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge over from in vitro to in vivo. Immunol Today, 1993. 14(11): p. 519-22.*
  107. Wayland, H., *Intravital observatories. Dream or necessity. Int J Microcirc Clin Exp, 1990. 9(1): p. 1-19.*
  108. Drazenovic, R., et al., *Regulation of perfused capillary density in canine intestinal mucosa during endotoxemia. J Appl Physiol, 1992. 72(1): p. 259-65.*
  109. Theuer, C.J., et al., *Microvascular vasoconstriction and mucosal hypoperfusion of the rat small intestine during bacteremia. Circ Shock, 1993. 40(1): p. 61-8.*
  110. Farquhar, I., et al., *Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis. J Surg Res, 1996. 61(1): p. 190-6.*
  111. VanderMeer, T.J., 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, 1995. 23(7): p. 1217-26.*
  112. Neviere, R.R., et al., *Microvascular perfusion deficits are not a prerequisite for mucosal injury in septic rats. Am J Physiol, 1999. 276(4 Pt 1): p. G933-40.*
  113. Revelly, J.P., et al., *Endotoxic shock alters distribution of blood flow within the intestinal wall. Crit Care Med, 1996. 24(8): p. 1345-51.*
  114. Navaratnam, R.L., et al., *Endotoxin (LPS) increases mesenteric vascular resistance (MVR) and bacterial translocation (BT). J Trauma, 1990. 30(9): p. 1104-13; discussion 1113-5.*
  115. Fink, M.P., et al., *Increased intestinal permeability in endotoxic pigs. Mesenteric hypoperfusion as an etiologic factor. Arch Surg, 1991. 126(2): p. 211-8.*

116. Birnbaum, J., et al., *Effects of dopexamine on the intestinal microvascular blood flow and leukocyte activation in a sepsis model in rats*. Crit Care, 2006. **10**(4): p. R117.
117. Ley, K. and T.F. Tedder, *Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling*. J Immunol, 1995. **155**(2): p. 525-8.
118. Volk, T. and W.J. Kox, *Endothelium function in sepsis*. Inflamm Res, 2000. **49**(5): p. 185-98.
119. Boros, M., et al., *Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine*. Gastroenterology, 1998. **114**(1): p. 103-14.
120. Janssen, G.H., et al., *Spontaneous leukocyte rolling in venules in untraumatized skin of conscious and anesthetized animals*. Am J Physiol, 1994. **267**(3 Pt 2): p. H1199-204.
121. Mayrovitz, H.N., *Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice*. Am J Physiol, 1992. **262**(1 Pt 2): p. H157-61.
122. Fiebig, E., K. Ley, and K.E. Arfors, *Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery*. Int J Microcirc Clin Exp, 1991. **10**(2): p. 127-44.
123. Massberg, S., et al., *In vivo assessment of the influence of cold preservation time on microvascular reperfusion injury after experimental small bowel transplantation*. Br J Surg, 1998. **85**(1): p. 127-33.
124. Gaboury, J., et al., *Nitric oxide prevents leukocyte adherence: role of superoxide*. Am J Physiol, 1993. **265**(3 Pt 2): p. H862-7.
125. Ley, K., *Histamine can induce leukocyte rolling in rat mesenteric venules*. Am J Physiol, 1994. **267**(3 Pt 2): p. H1017-23.
126. Scalia, R., et al., *Essential role of P-selectin in the initiation of the inflammatory response induced by hemorrhage and reinfusion*. J Exp Med, 1999. **189**(6): p. 931-8.
127. Baatz, H., et al., *In vivo study of leukocyte-endothelium interaction in endotoxin-induced uveitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(10): p. 1960-7.
128. Traber, D.L., et al., *Comparison of the cardiopulmonary responses to single bolus and continuous infusion of endotoxin in an ovine model*. Circ Shock, 1989.

- 27(2):** p. 123-38.
129. Fukumura, D., et al., *IL-1 is an important mediator for microcirculatory changes in endotoxin-induced intestinal mucosal damage*. Dig Dis Sci, 1996. **41(12):** p. 2482-92.
  130. Bone RC, B.R., Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, and S. WJ, *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis*. 1992: p. Chest 101:1644-1655.
  131. Arvidsson, S., et al., *Role of free oxygen radicals in the development of gastrointestinal mucosal damage in Escherichia coli sepsis*. Circ Shock, 1985. **16(4):** p. 383-93.
  132. Kurose, I., et al., *Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage*. Circ Res, 1994. **74(2):** p. 336-43.
  133. Fukuda, S., et al., *Mechanisms for regulation of fluid shear stress response in circulating leukocytes*. Circ Res, 2000. **86(1):** p. E13-8.

## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACCP	American College of Chest Physicians
AT III	Antithrombin III
BPI	Bactericidal permeability-increasing Protein
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
CD	Cluster of Differentiation
CLP-Modell	Cecal Ligation and Puncture-Modell
CSF	Colony-Stimulating Factor
DIVI	Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin
DSG	Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.
E. coli	Escherichia coli
FCD	Funktionelle Kapillardichte
FiO <sub>2</sub>	Fraction of Inspired Oxygen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FXIII	Faktor XIII
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimmuierender Faktor
GPI	Glycophosphatidylinositol
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HDL	High Density Lipoprotein
HF	Herzfrequenz

HZV	Herzzeitvolumen
ICAM-1	Interzellulare Adhäsionsmoleküle
ICD	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin
IVM	Intravitalmikroskopie
KG	Körpergewicht
LBP	Lipopolysaccharid Binding Protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
LEI	Leukozyten-Endothel-Interaktion
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LPS	Lipopolysaccharid (Syn.: Endotoxin)
MAC	Membran attack complex
MAP	Mean arterial blood pressure
MBL	Mannosebindendes Lectin
mCD	Molecular Cluster of Differentiation
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrom
MOV	Multiorganversagen

MPO	Myeloperoxidase
MW	Mittelwert
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-*</sup>	Superoxidradikal
OH <sup>*</sup>	Hydroxylradikal
PaCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PAF	Plättchenaktivierungsfaktor
PaO <sub>2</sub>	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck im Vollblut
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
pH	pH-Wert
pHi	Intramukosaler pH-Wert
pHi-Wert	Intramuköser instestinaler ph-Wert
PMN	Polymorphonukleäre Zellen
PO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck im Vollblut
ROS	Reactive oxygen species
s	Sekunde
SCCM	Society of Critical Care Medicine
sCD	Soluble Cluster of Differentiation
ScvO <sub>2</sub>	Zentralvenöse Sauerstoffsättigung

SD	Standard deviation (Standardabweichung)
SEM	Standard error of mean (Standardfehler)
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
S <sub>Lex</sub>	Sialyl-Lewisx-Antigen
TF	Tissue Factor
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
V1 bzw. V3	Venolen ersten bzw. dritten Grades
V <sub>t</sub>	Atemzugvolumina
ZVD	Zentraler Venendruck

## **9 DANKSAGUNG**

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Claudia Spies und PD Dr. Jürgen Birnbaum für die Überlassung des Themas und die Förderung der wissenschaftlichen Arbeit. Mein ganz besonderer Dank geht an Oberarzt PD Dr. Jürgen Birnbaum für seine hervorragende Betreuung, konstruktive Kritik sowie Hilfestellung bei der Abfassung dieser Arbeit.

Meinen Kollegen Frau Dr. Julia Müller, Herr Matthias Hommel und Frau Edda Klotz danke ich für die exzellente Unterstützung in der Korrekturphase meiner Arbeit.

Des Weiteren geht ein großer Dank an Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Klaus-Dieter Wernecke, Frau Tania Schink sowie Herrn Dr. rer. nat. Konrad Neumann, die mir mit sehr viel Elan bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse zur Seite standen. Besten Dank an Frau Barbara Egerer und Frau Pia Quoll für ihre Hilfe bei der biochemischen Bestimmung der Laborparameter sowie Frau Oberärztin Dr. Sabine Zimmer für die Unterstützung und das großartige Fachwissen bei der Planung und Durchführung der laborchemischen Untersuchungen.

Ebenso danke ich recht herzlich meiner Kollegin Katja Mallin, mit der die Durchführung des tierexperimentellen Teiles in dieser Qualität, kurzen Zeit und mit so viel Begeisterung möglich war. Im Weiteren gilt mein Dank Alexander Blume und Florian Jubin für die ausgezeichnete Einarbeitung in die Methodik und in die operativen Techniken. Darüber hinaus danke ich dem Team der Tierpfleger für die sorgsame Betreuung der Versuchstiere.

## **10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich, Renata Kawka, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung des Einflusses von C1-Esterase-Inhibitor in Kombination mit Faktor XIII auf die funktionelle Kapillardichte und die Leukozytenadhärenz in der intestinalen Mikrozirkulation bei experimenteller Endotoxinämie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 20. Mai 2009

Renata Kawka

## **11 LEBENSLAUF**

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