

Aus dem Institut/der Klinik für Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt  
operative Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Der Einfluss von Tempol auf die  
funktionelle Kapillardichte und die  
Leukozyten-Endothel-Interaktion bei  
experimenteller Endotoxinämie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Vera Christoph

aus Teterow

Gutachter/in:     1. PD Dr. med. J. Birnbaum  
                          2. PD Dr. med. H. Kern  
                          3. PD Dr. med. vet. J. Unger

Datum der Promotion 30.11.2012

Meinen Eltern

# I Inhaltsverzeichnis

|       |   |    |
|-------|---|----|
| I     | Inhaltsverzeichnis .....                          | 4  |
| II    | Abbildungsverzeichnis .....                       | 6  |
| III   | Tabellenverzeichnis.....                          | 6  |
| IV    | Abkürzungsverzeichnis .....                       | 8  |
| 1     | Einleitung.....                                   | 10 |
| 1.1   | Definition der Sepsis.....                        | 11 |
| 1.2   | Inzidenz und Mortalität.....                      | 14 |
| 1.3   | Ätiopathogenese der Sepsis .....                  | 16 |
| 1.4   | Mediatoren der Sepsis .....                       | 19 |
| 1.4.1 | Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....                | 19 |
| 1.4.2 | Reaktive Sauerstoffspezies.....                   | 19 |
| 1.5   | Leukozyten-Endothel-Interaktion.....              | 23 |
| 1.6   | Funktionelle Kapillardichte .....                 | 28 |
| 1.7   | Sepsismodelle .....                               | 29 |
| 1.8   | Bedeutung des Intestinums .....                   | 32 |
| 1.9   | Tempol.....                                       | 34 |
| 1.9.1 | Allgemeines.....                                  | 34 |
| 1.9.2 | Pharmakodynamik von Tempol .....                  | 34 |
| 1.9.3 | Experimentelle Untersuchungen mit Tempol.....     | 35 |
| 1.9.4 | Klinische Anwendungen von Tempol.....             | 36 |
| 2     | Herleitung der Aufgabenstellung .....             | 37 |
| 2.1   | Allgemeines .....                                 | 37 |
| 2.2   | Ziele der Untersuchung .....                      | 39 |
| 3     | Methodik.....                                     | 40 |
| 3.1   | Versuchstiere.....                                | 40 |
| 3.1.1 | Tiermaterial .....                                | 40 |
| 3.1.2 | Gruppeneinteilung.....                            | 40 |
| 3.2   | Versuchsmodell.....                               | 42 |
| 3.2.1 | Versuchsablauf.....                               | 42 |
| 3.2.2 | Anästhesie und Monitoring.....                    | 43 |
| 3.2.3 | Operative Technik .....                           | 43 |
| 3.3   | Labor .....                                       | 45 |
| 3.3.1 | Leukozyten.....                                   | 45 |
| 3.3.2 | Malondialdehyd .....                              | 45 |
| 3.3.3 | Oxidierte low density Lipoprotein (oxLDL).....    | 45 |
| 3.3.4 | Advancend oxidation protein products (AOPP) ..... | 46 |
| 3.3.5 | Antioxidative Kapazität (ANOX) .....              | 46 |
| 3.3.6 | Peroxidbestimmung .....                           | 46 |
| 3.4   | Intravitalmikroskopie .....                       | 47 |
| 3.4.1 | Technik.....                                      | 47 |
| 3.4.2 | Leukozytenadhärenz.....                           | 49 |
| 3.4.3 | Funktionelle Kapillardichte .....                 | 49 |
| 3.5   | Statistik .....                                   | 51 |
| 4     | Ergebnisse .....                                  | 52 |
| 4.1   | Klinische Parameter.....                          | 52 |
| 4.1.1 | Herzfrequenz.....                                 | 52 |
| 4.1.2 | Atemfrequenz.....                                 | 54 |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 4.1.3      | Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) .....        | 55        |
| 4.1.4      | Leukozyten.....                                    | 56        |
| 4.1.5      | Malondialdehyd.....                                | 57        |
| 4.1.6      | Oxidierter low density Lipoprotein (oxLDL).....    | 58        |
| 4.1.7      | Advanced oxidation protein product (AOPP).....     | 59        |
| 4.1.8      | Antioxidative Kapazität.....                       | 60        |
| 4.1.9      | Peroxidbestimmung .....                            | 61        |
| <b>4.2</b> | <b>Intravitalmikroskopie .....</b>                 | <b>62</b> |
| 4.2.1      | Temporär adhärenente Leukozyten.....               | 62        |
| 4.2.2      | Adhärenente Leukozyten .....                       | 63        |
| 4.2.3      | Funktionelle Kapillardichte .....                  | 64        |
| <b>5</b>   | <b>Diskussion .....</b>                            | <b>65</b> |
| <b>5.1</b> | <b>Hämodynamik.....</b>                            | <b>65</b> |
| 5.1.1      | Mittlerer arterieller Blutdruck .....              | 65        |
| 5.1.2      | Herzfrequenz.....                                  | 66        |
| 5.1.3      | Atemfrequenz.....                                  | 67        |
| 5.1.4      | Einfluss von Tempol .....                          | 67        |
| <b>5.2</b> | <b>Laborparameter .....</b>                        | <b>68</b> |
| 5.2.1      | Leukozytenzahl .....                               | 68        |
| 5.2.2      | Malondialdehyd.....                                | 69        |
| 5.2.3      | Oxidierter low- density- Lipoproteine(oxLDL) ..... | 70        |
| 5.2.4      | Advanced oxidation protein products(AOPP) .....    | 71        |
| 5.2.5      | Antioxidative Kapazität (ANOX) .....               | 72        |
| 5.2.6      | Peroxidbestimmung .....                            | 72        |
| <b>5.3</b> | <b>Intravitalmikroskopie .....</b>                 | <b>74</b> |
| 5.3.1      | Leukozytenadhärenenz.....                          | 74        |
| 5.3.2      | Funktionelle Kapillardichte .....                  | 76        |
| <b>6</b>   | <b>Zusammenfassung.....</b>                        | <b>78</b> |
| <b>7</b>   | <b>Abstract.....</b>                               | <b>80</b> |
| <b>8</b>   | <b>Literaturverzeichnis .....</b>                  | <b>82</b> |
| <b>9</b>   | <b>Anhang.....</b>                                 | <b>97</b> |
|            | Danksagung .....                                   | 97        |
|            | Lebenslauf.....                                    | 98        |
|            | Eidesstattliche Erklärung .....                    | 99        |

## II **Abbildungsverzeichnis**

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1 <b>Schema zum Leukozyten- Rolling (87)</b> .....  | 25 |
| Abbildung 2 <b>Schema zum Leukozyten-Sticking (87)</b> .....  | 26 |
| Abbildung 3 <b>Molekülstruktur von Tempol</b> .....   | 34 |
| Abbildung 4 <b>Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs ( BE- Blutentnahme).</b>  | 42 |
| Abbildung 5 <b>Darstellung der Intravitalmikroskopie (87)</b> .....   | 48 |
| Abbildung 6 <b>Temporär adhärente Leukozyten (Roller) in den submucösen<br/>Venolen in n/min eine Stunde nach Beginn der Endotoxininfusion</b> .....          | 62 |
| Abbildung 7 <b>Fest adhärente Leukozyten (Sticker) in den submucösen Venolen in<br/>n/mm<sup>2</sup> eine Stunde nach Beginn der Endotoxininfusion</b> .....  | 63 |
| Abbildung 8 <b>Funktionelle Kapillardichte in x mm<sup>-1</sup> gemessen in der Lamina<br/>muscularis eine Stunde nach Beginn der Endotoxininfusion</b> ..... | 64 |

### III Tabellenverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Tabelle 1 <b>Gruppeneinteilung</b> .....  | 41 |
| Tabelle 2 <b>Herzfrequenz n/min</b> .....   | 53 |
| Tabelle 3 <b>Atemfrequenz n/min</b> .....   | 54 |
| Tabelle 4 <b>mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) in mmHg</b> .....                              | 55 |
| Tabelle 5 <b>Leukozytenzahl in Gpt/l</b> .....  | 56 |
| Tabelle 6 <b>Malondialdehyd (MDA) in <math>\mu\text{mol/l}</math></b> .....                       | 57 |
| Tabelle 7 <b>Oxidierete low- density- Lipoproteine (oxLDL) in ng/ml</b> .....                     | 58 |
| Tabelle 8 <b>Advanced oxidation protein products (AOPP) in <math>\mu\text{mol/l}</math></b> ..... | 59 |
| Tabelle 9 <b>Antioxidativen Kapazität in <math>\mu\text{mol/l}</math></b> .....                   | 60 |
| Tabelle 10 <b>Kontrollen zur Peroxidbestimmung in <math>\mu\text{mol/l}</math></b> .....          | 61 |

## IV Abkürzungsverzeichnis

|        |  |
|--------|--|
| AF     | Atemfrequenz   |
| ANOX   | antioxidative Kapazität                              |
| AOPP   | advanced oxidation protein products                  |
| ARDS   | Acute Respiratory Distress Syndrom                   |
| BGA    | Blutgasanalyse                                       |
| BPI    | Bactericidal Permeability- Increasing Protein        |
| CARS   | kompensiertes antiinflammatorisches Reaktionssyndrom |
| CLP    | cecal ligation and puncture                          |
| CRP    | C-reaktives Protein                                  |
| DMSO   | Dimethylsulfoxid                                     |
| DNS    | Desoxyribonukleinsäure                               |
| E.coli | Escherichia coli                                     |
| EDTA   | Ethylendiamintetraessigsäure                         |
| Fc     | Fragment constant                                    |
| FITC   | Fluoresceinisothiocyanate                            |
| GALT   | Gut Associated Lymphatic Tissue                      |
| h      | Stunde   |
| HDL    | High Density Lipoprotein                             |
| HF     | Herzfrequenz   |
| IL     | Interleukin  |
| IVM    | Intravitalmikroskopie                                |
| KG     | Körpergewicht  |
| LDL    | Low Density Lipoprotein                              |
| LPB    | Lipopolysaccharide Binding Protein                   |
| LPS    | Lipopolysaccharid                                    |
| Leuko  | Leukozyten   |
| Mac- 1 | Integrin $\alpha M/\beta 2$                          |



|                   |  |
|-------------------|--|
| MAP               | Mean arterial Blood Pressure                           |
| Min               | Minute   |
| mmHg              | Millimeter Quecksilbersäule                            |
| MMDS              | mikrozirkulatorisches mitochondriales Distress Syndrom |
| MODS              | Multiple Organ Dysfunction Syndrom                     |
| MOF               | Multiple Organ Failurec (multiples Organversagen)      |
| MDA               | Malondialdehyd   |
| NaCl              | Natriumchlorid   |
| NO                | Stickstoffmonoxid                                      |
| NF-kb             | Nukleärer Faktor kappa B                               |
| oxLDL             | oxidated low density lipoprotein                       |
| paCO <sub>2</sub> | arterieller Kohlendioxidpartialdruck                   |
| Perox             | Peroxid  |
| PMNL              | Polymorphkernige Neutrophile Lymphozyten               |
| ROS               | Reaktive Oxygen Species ( reaktive Sauerstoffspezies)  |
| s                 | Sekunde  |
| SIRS              | Systemic Inflammatory Response Syndrome                |
| SOD               | Superoxiddismutase                                     |
| SOFA              | Sequential Organ Failure Assessment                    |
| TBA               | Thiobarbitursäure                                      |
| TNF- $\alpha$     | Tumornekrosefaktor $\alpha$                            |

# 1 Einleitung

Aufgrund der Zunahme des Lebensalters und der Multimorbidität hat das Krankheitsbild der Sepsis in der Vergangenheit an Bedeutung gewonnen. Der hohe personelle und materielle Aufwand bei der Behandlung septischer Patienten macht die gesellschaftliche Relevanz deutlich. Anzeichen einer Sepsis werden jährlich bei 18 Millionen Menschen weltweit beobachtet. Es werden jeweils Kosten von etwa 22000 US-Dollar pro Patient verursacht. Im Rahmen der European Society of Intensive Care Medicine machte man sich in der Barcelona Deklaration zur Aufgabe die relative Mortalität um 25% in den nächsten 5 Jahren zu senken (1).

Historisch ist das Krankheitsbild der Sepsis schon sehr lange bekannt und wurde bereits von Hippokrates ca. 400 v. Christus als eine Krankheit die etwa 7-10 Tage nach einer Verletzung auftritt, mit Fieber einhergeht und sehr oft zum Tode führt beschrieben (2). Dabei wurde erstmals die Frage aufgeworfen wie es von einer Verletzung ausgehend zu einer systemischen Reaktion kommen kann.

Durch die Entdeckung der Bakterien durch Robert Koch und Luis Pasteur gab es erste pathophysiologische Ansätze zur Erklärung dieses Krankheitsbildes. Schottmüller definierte bereits 1914 die Sepsis als Erkrankung bei der sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat von dem aus konstant oder periodisch Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und Krankheitserscheinungen auslösen (3).

Potente Therapien standen zu dieser Zeit allerdings nicht zur Verfügung. Dies änderte sich erst mit Entdeckung des Penicillins 1928 durch Fleming (4).

## 1.1 Definition der Sepsis

Die immer besser werdende Diagnostik, einschließlich des Monitorings der Erkrankung erfordert auch zur Festlegung von therapeutischen Maßnahmen eine genaue Definition des Krankheitsbildes. Auf der Grundlage einer systemischen Reaktion auf eine Infektion wurden von Bone vier Schweregrade definiert- Sepsis, Sepsis-Syndrom, septischer Schock und therapierefraktärer septischer Schock (5).

Aber auch nichtinfektiöse Erkrankungen können zu einem septischen Krankheitsbild führen. Daher wurde im Rahmen der Consensus Conference der amerikanischen Society of Critical Medicine und des American College of Chest Physicians (ACCP) 1991 eine Krankheitsdefinition festgelegt (6).

Demnach kommt es bei Vorliegen von mindestens zwei von den folgenden Symptomen zu einer systemischen Entzündungsreaktion,

- SIRS- systemic inflammatory response syndrome.
  - Körpertemperatur  $>38^{\circ}\text{C}$  oder  $<36^{\circ}\text{C}$ ,
  - Herzfrequenz  $> 90/\text{min}$ ,
  - Atemfrequenz  $> 20/\text{min}$  oder  $\text{paCO}_2 < 32 \text{ mm Hg}$ ,
  - Leukozyten  $> 12.000/\text{mm}^3$  oder  $< 4.000/\text{mm}^3$  oder  $> 10\%$  unreife Neutrophile.
  
- Sepsis

Eine Sepsis liegt vor, wenn eine mikrobiologisch oder klinisch nachgewiesene Infektion die Ursache eines SIRS ist.

- Schwere Sepsis

Die schwere Sepsis ist eine Sepsis mit Zeichen der Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotension. Zeichen der Hypoperfusion sind:

- Laktatazidose,

- Oligurie < 30 ml/h,
- Akute Verwirrtheit und Bewusstseinsstörungen ohne andere Ursache

➤ Septischer Schock

Der septische Schock ist eine schwere Sepsis mit einer Hypotension trotz ausreichender Volumensubstitution definiert als:

- ein systolischer Blutdruck < 90 mm Hg,
- ein Blutdruckabfall von > 40 mm Hg vom Ausgangswert ohne andere Ursache,
- der Einsatz von Vasopressoren (7).

In Deutschland und Europa folgt man den Ergebnissen dieser Konsensuskonferenz nicht in allen Punkten. Die Definition eines SIRS anhand der oben genannten Kriterien gilt als klinisch wenig hilfreich, da mehr als 80% aller Intensivpatienten mindestens 2 SIRS-Kriterien erfüllen. Dabei liegt die Sterblichkeit dieser Patienten deutlich unter 10% liegt. Das SIRS definiert kein bezüglich einer Organdysfunktion oder der Ausbildung eines Schocks besonders gefährdetes Krankengut. Auch die Anwendung des Begriffes Sepsis auf Patienten ohne infektionsortferne Organdysfunktion oder Schock allein auf der Basis des Vorliegens einer lokal begrenzten Infektion und von 2 SIRS-Kriterien trägt eher zur Verwirrung bei, da auch hiermit keine Krankheitsentität beschrieben wird, die sich bezüglich der Prognose bzw. Letalität von Infektionen wie Pneumonie, Pyelonephritis etc. abgrenzen lässt. Erst mit dem Auftreten einer oder mehrerer Organdysfunktionen bzw. eines Schocks kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Letalität auf 20 bzw. 50-80% (8). Dies sind Krankheitszustände, die im deutschen und europäischen Sprachgebrauch als Sepsis bzw. septischer Schock bezeichnet werden (9).

Eine weitere Differenzierung aufgrund der Aktivität des Immunsystems ist eine systemische Inflammationsreaktion (SIRS) oder kompensiertes antiinflammatorisches Reaktionssyndrom (CARS) möglich. Jedoch sind auch phasenhaftes Auftreten oder das Ineinanderübergehen der verschiedenen definierten Zustände ineinander möglich. Es wird definiert als mixed antagonistic respons syndrome (MARS) (10). Ausgehend von einer Organdysfunktion von zwei oder mehreren beteiligten Organen kommt es bei weiterem Fortschreiten der entzündlichen Veränderungen zum einem Multiorganversagen. Von dem primären Multiorganversagen lässt sich das Auftreten eines sekundären Versagens

differenzieren, welches erst durch ein zweites entzündliches Ereignis ausgelöst wird - auch bezeichnet als „two hit Modell“ (11).

Wegen der eingeschränkten Spezifität ist die Definition nach der ACCP/SCCM-Consensus-Conference recht wenig verbreitet und die Beschreibung des Begriffes der Sepsis durch eine rein mikrobiologische Definition nur unzureichend für den klinischen Alltag tauglich. Eine Weiterentwicklung in Bezug auf begleitende Umstände, Prädisposition und Einbindung von spezifischen Laborparametern scheint nötig. Dieses Bemühen der ACCP und SCCM findet in dem „PIRO“-Konzept seinen Anfang. Analog der TNM-Klassifikation der Tumore wurde ein Klassifikationssystem vorgeschlagen, nach dem die Patienten entsprechend einer Prädisposition („P“), einer Infektion („I“), einer inflammatorischen Reaktion („R“) und einer Organdysfunktion („O“) einem unterschiedlichen Risiko unterliegen. Im „PIRO“-Konzept werden Vorerkrankungen im Sinne einer Prädisposition betrachtet, die Infektion durch positive mikrobiologische Ergebnisse bewertet, die inflammatorische Reaktion entsprechend den SIRS Kriterien und der Konzentration des C-reaktiven Proteins (CRP) beurteilt und die Organdysfunktion nach verschiedenen Scores zwischen dem „Sequential Organ Failure Assessment“-SOFA und dem Multiple Organ Dysfunction Syndrom (MODS) unterschieden. Während verschiedene mikrobiologische und genomische Parameter noch nach ihrer Plausibilität in klinischen Studien überprüft werden, fließen Marker wie Procalcitonin und Interleukin-6 bereits in die Bewertung des Risikoprofils mit ein (12).

## 1.2 Inzidenz und Mortalität

Für Deutschland gibt schwankende Angaben zur Inzidenz mit jährlichen Patientenzahlen zwischen 125000 und 300000 (13). Laut Aussage des Kompetenznetzes war die Sepsis in Deutschland 2004 mit 59344 Verstorbenen pro Jahr die dritthäufigste Todesursache nach der koronaren Herzerkrankung und dem Herzinfarkt. Ausgehend von einer Inzidenz von 11% in Deutschland mit 150000 Patienten jährlich, werden immense Kosten von schätzungsweise 1,7 Milliarden Euro verursacht. Dies entspricht etwa einem Drittel der Kosten einer Intensivtherapiestation und zählt deshalb mit zum wichtigsten Kostenfaktor (14).

Die Hospitalsterblichkeit bei septischen Patienten auf Intensivstationen betrug in einer retrospektiven Studie in Deutschland 42,6%. Mittlere Kosten für die Behandlung von septischen Patienten auf Intensivstationen lagen zwischen 1200 und 1.318 Euro/Tag (15, 16). In einer neueren Studie wurden die Krankenhauskosten von Januar bis Oktober 2003 betrachtet. Grundsätzlich geht man von etwa 20% der gesamten Krankenhauskosten für die Betreuung schwerkranker Patienten aus. Die Kosten für die Behandlung stiegen mit zunehmender Spezialisierung. Am teuersten waren septische Patienten mit etwa 1090,00 Euro pro Tag (7, 17).

Trotz des Versuches das Krankheitsbild der Sepsis genau zu definieren, lassen deutlich schwankende Angaben bezüglich der stark schwankenden Inzidenz den Schluss zu, dass die Einordnung immer noch problematisch ist (18).

In den vergangenen Jahren wird eine Zunahme der Inzidenz der Sepsis beobachtet. Eine amerikanische Studie zeigt im Verlauf einen Anstieg von 7,5% (1992) auf 10,4% (1999). Unter allen Krankenhauspatienten liegt die Inzidenz etwa bei 2%. Sie erhöht sich deutlich mit zunehmendem Alter. Von 0,2/1000 bei Kindern bis zu 26,2/1000 bei über 85-jährigen nimmt sie mehr als 100-fach zu (19). Eine deutlich höhere Inzidenz ist unter Betrachtung der intensivmedizinisch betreuten Patienten zu finden die zwischen 2% und 21% angegeben wird. Im Bereich der interdisziplinären Intensivtherapie liegt die Inzidenz zwischen 10% und 14 % (20, 21).

In einer französischen prospektiven Studie von 1997 bis 2001 wurde eine Inzidenz von 27,7% gefunden, die jedoch einer Gruppe mit höherem Risiko (Beteiligung mehrere Organe, aggressivere Keime und höheres Lebensalter auf über 40% ansteigt (22).

Angaben zur Mortalität, entsprechend einer Metaanalyse, liegen zwischen 40% und 80%, im Mittel von 49,7% (23-26). Die Inzidenz eines SIRS wird bei chirurgischen

Patienten, die in einer kontrollierten Studie über 2 Jahre untersucht wurden, angegeben mit 51,1% und einer Mortalität von 53% (27).

### 1.3 Ätiopathogenese der Sepsis

Nach den Kriterien der ACCP/SCCM Consensus Conference 2001 kommt es bei einer Sepsis zu einer systemischen Reaktion auf Grundlage einer Infektion, die mit den entsprechenden klinischen Symptomen verbunden ist (21). Man unterscheidet infektiöse und nichtinfektiöse Auslöser der Sepsis. Bei mehr als 90% der Sepsisfälle ist diese verursacht durch Bakterien, gram-negative und gram-positive gleichermaßen häufig (28). Als Auslöser handelt es sich im Wesentlichen um das Lipopolysaccharid der äußeren Membran gramnegativer Bakterien sowie Exotoxine grampositiver Bakterien. Weiterhin sind Infektionen durch Viren, Pilze und Parasiten möglich. Als nichtinfektiöse Auslöser gelten Faktoren die letztlich eine inflammatorische Reaktion nichtinfektiöser Genese auslösen, z.B. Trauma, Reperfusion, hypovolämischer/hämorrhagischer Schock, Pankreatitis. Man geht jedoch davon aus, dass freie Sauerstoffradikale ebenso wie Prostaglandine und durch Gewebs- bzw. Leukozytenproteinasen degradierte bzw. als fremd erkannte Proteine beteiligt sind (29, 30). Besondere Bedeutung hat eine Minderperfusion des Gewebes im Rahmen einer Sepsis welche zu einem mikrozirkulatorischen mitochondrialem Distress Syndrom führen kann (MMSD) (31).

Infolge des primären Auslösers kommt es zu einer Aktivierung des Immunsystems. Es wird ein zelluläres System mit Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Lymphozyten und ein Kaskadensysteme (Komplementsystem, Gerinnungssystem, Kininsystem) unterschieden. Diese führen zu einer Produktion von verschiedenen Mediatoren (Zytokine, Lipidmetabolite, Protease, Sauerstoffradikale und vasoaktiven Substanzen durch die schließlich eine Zell- und Gewebsschädigung entsteht. Im Einzelnen kommt es durch Zell- und Organfunktionsstörungen sowie Permeabilitätsstörungen, Mikrozirkulationsstörungen und letztlich durch einen Schock bzw. eine Multiorgandysfunktion durch Gewebehypoxie mit septischen Schock, respiratorischer Insuffizienz, Nierenfunktionsstörungen, Verbrauchskoagulopathie, metabolischen Störungen (Laktatazidose, Katabolie) und Enzephalopathie.

Um tierexperimentell pathophysiologische Erscheinungen ähnlich einer Sepsis zu erreichen, bietet sich die Möglichkeit, vitale Infektionserreger von außen in den Organismus einzubringen oder die Freisetzung innerhalb des Organismus. Eine weitere tierexperimentell bedeutsame Form ist die Einbringung von Endotoxin in den Organismus. Dazu wird Lipopolysaccharid als Zellmembranbestandteil der gram-negativen Bakterien verwendet. (32).



Grundlage dieser Arbeit ist ein Sepsismodell basierend auf der Reaktion auf Endotoxin (Lipopolysaccharid) gramnegativer Bakterien.

Endotoxine finden sich in der Außenmembran gramnegativer Bakterien. Sie bestehen aus einem Polysaccharid und einem daran kovalent gebundenem Lipidanteil (Lipopolysaccharid, Lipid , welches in der Membran fest verankert ist (33).

Eine Typisierung verschiedener Bakterienstämme ist über den so genannten "fingerprint" möglich. Das auf der Oberfläche der Bakterien repräsentierte O-Antigen bestimmt die Variabilität der Spezies. Das O-Antigen allein hat nur eine geringe Toxizität im Gegensatz zum A-Lipid, welches Reaktionen hervorruft, die auch im Zusammenhang einer Sepsis beim Menschen beobachtet werden können (34, 35). Zu einer Freisetzung von Endotoxin kommt es bei schnellem Wachstum oder bei der Zerstörung von der Bakterienmembran (36). Nach Freisetzung von Endotoxin bindet es sich relativ schnell an verschiedene Serumproteine.

Bei der Bindung an Serumproteine wie high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL) oder bactericidal permeability- increasing protein (BPI) kommt es zu einer Abschwächung der Toxizität des Endotoxins (37). Zwei Proteine mit sehr ähnlicher Struktur sind das Lipopolysaccharid binding protein (LBP) und das bactericidal permeability- increasing protein (BPI). Beide sind Proteine mit etwa 60 kD. Ihre Erbinformation ist auf Chromosom 20 kodiert (38). Auf der Oberfläche sowie in den Granula der neutrophilen Granulozyten befindet sich hauptsächlich das BPI, in nur geringer Konzentration im Serum. Bei Vorhandensein von großen Mengen LPS, wie zum Beispiel bei einer Sepsis, kommt es zu einer Freisetzung von BPI. BPI bindet nicht serotypisch und kann folglich verschiedene LPS Formen inhibieren (39).

Weitere membranständige Rezeptoren sind die CD 14 Rezeptoren (mCD14) und der Toll-like Rezeptor (40). Über den CD-14-Rezeptor kommt es zur Bindung des LPS-LBP-Komplexes an der Zelloberfläche und damit zur Zellaktivierung und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine. Eine Ablösung des membranständigen LPS-LBP-CD-14 Komplexes durch Enzyme wie Phospholipase C und D ist möglich und wird als so genanntes „shedding“ bezeichnet und stellt die lösliche Form des LPS- Rezeptors dar (41). Dieser Komplex kann zu einer Aktivierung von Zellen führen, die nicht über diese Rezeptoren verfügen. Durch die Bindung von LPS an s CD 14 erfolgt andererseits eine Neutralisation, es wird die Aktivierung m CD 14 exprimierender Zellen, wie Monozyten, Makrophagen und Granulozyten reduziert (42). Mit einer sehr niedrig dosierten LPS- Konzentration (10pg/ml) konnte in einer Arbeit eine up-Regulation der monozytären CD 14 gezeigt werden, welche für die Pathogenese der Sepsis durchaus bedeutend sein könnte (43).

Weitere Glykoproteine, die als LPS Rezeptoren fungieren, sind CD 11 und CD 18, das  $\beta$  2-Integrin, das MAC-1 Antigen oder der „Scavenger-Rezeptor“. Eine nachfolgende Aktivierung von Makrophagen findet jedoch nicht statt (44, 45). Der LBP/LPS Komplex mit der Bindung an Monozyten und Makrophagen bestimmt die Induktion des Tumornekrosefaktors im Wesentlichen (46).

## **1.4 Mediatoren der Sepsis**

Mediatorengruppen des zellulären System stellen die Zytokine als sezernierte Signalproteine, die mit spezifischen Rezeptoren reagieren (Tumornekrosefaktor-  $\alpha$ , Interleukine, Interferone und verschiedene koloniestimulierende Faktoren), die Eicosanoide (Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane) und die reaktiven Sauerstoffspezies ( Reactive oxygen species- ROS) dar (39).

### **1.4.1 Tumornekrosefaktor- $\alpha$**

TNF- $\alpha$ , dessen Hauptproduzenten die Monozyten und Makrophagen sind, spielt im Verlauf der Sepsis eine herausragende Rolle.

Es wurde ein messbarer Anstieg der Konzentration nach experimenteller Endotoxinapplikation bereits nach 30 min messbar und eine maximale Konzentration nach 90 min erreicht (47). Barroso-Aranda et al. konnte ebenfalls einen Anstieg des Tumornekrosefaktors- $\alpha$  nach Sepsisinduktion nachweisen (48). Nach Freisetzung aus der Zellmembran erfolgt die Bindung auf fast allen Zelloberflächen über zwei verschiedenen Rezeptortypen.

Der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  sorgt als Mittlersubstanz für eine Aktivierung sekundärer Entzündungsmediatoren (Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene, PAF, Stickstoffmonoxid, ROS) sowie für eine Erhöhung der prokoagulatorischen Endothelaktivität. Außerdem fördert er die Granulozytenadhärenz an und Diapedese durch Endothelien. Die hierbei beteiligten Granulozyten werden als „Polymorph nuclear Neutrophile“ (PMN) bezeichnet. Durch Bindung an bestimmte Adaptermoleküle ist sogar die Auslösung einer Apoptose möglich. Ein Ansteigen von TNF- $\alpha$  nach Endotoxinapplikation konnte beobachtet werden (49). Kultivierte Mesangialzellen von Ratten, die eine Rolle bei der Entstehung einer Glomerulonephritis spielen, weisen eine TNF- $\alpha$  und Interleukin-1alpha-vermittelte Apoptose unter dem Einfluss von Hydrogenperoxiden und der Lipidoxidation als sekundärer Messenger auf (50).

### **1.4.2 Reaktive Sauerstoffspezies**

Als sekundäre Mediatoren der Sepsis spielen die reaktiven Sauerstoffspezies eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung der inflammatorischen Reaktion. Die Hauptquelle der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) sind die Leukozyten (neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen). Zu den ROS zählen die freien Sauerstoffradikale, wie Superoxidradikale und Hydroxylradikale sowie

reaktive Sauerstoffverbindungen ohne Radikalcharakter, wie beispielsweise Wasserstoffperoxyd, Singulett Sauerstoff, hyperchlorige Säure, Ozon und Stickstoffmonoxid (51).

Freie Radikale sind Atome oder Moleküle mit einem oder mehreren unpaaren Elektronen. Bei vielen Leistungen aerober Reaktionen, beispielsweise der Atmung, kommt es zu einer Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxidanionen. Sie entstehen durch katalytische Reaktion von Sauerstoff durch Stimulation der NADPH-Oxidase. Meist erfolgt eine Abgabe an Phagozytenvakuolen zur Zerstörung eingeschlossener Bakterien, jedoch ist auch eine Freisetzung in den Extrazellulärraum möglich. Dort erfolgt größtenteils eine Umwandlung Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid, die beide selbst nur eine geringe bakterizide Wirkung aufweisen. Durch Reaktion beider Moleküle entsteht das hochreaktive Hydroxylradikal (51).

Als Radikal mit wesentlich bakterizider Wirkung entsteht durch Vermittlung der Myeloperoxidase aus Wasserstoffperoxid und Chloridionen die unterchlorige Säure (52).

Ein weiterer Reaktionsweg der Superoxidanionen ist der mit den von Endothel und Leukozyten gebildeten Stickoxiden zu Peroxynitriden, die zu Hydroxylradikalen zerfallen (53).

Ein besonders im Gefäßendothel lokalisiertes Enzymsystem stellt das Xanthinoxidase-Xanthindehydrogenasesystem als Quelle der reaktiven Sauerstoffspezies dar. Das Enzym vermittelt die Reaktion von Hypoxanthin zu Xanthin, welches in den Endothelzellen vermehrt bei Ischämie anfällt und letztendlich zu Harnsäure. Es kann in zwei Zuständen vorkommen. Die Oxidaseform, unter normalen Bedingungen nur in geringer Form vorliegend, benötigt als Elektronenakzeptor molekularen Sauerstoff.

Zu einem Wechsel des Verhältnisses der zwei Enzymzustände kommt es unter ischämischen Bedingungen. Bei Vorgängen bei denen Ischämie und Reperfusion im Gewebe auftreten, wie zum Beispiel im Rahmen einer LPS induzierten Sepsis, gelangt molekularer Sauerstoff in ein ischämisches Gebiet, so dass damit ein Ansteigen reaktiver Sauerstoffspezies zu beobachten ist (54).

Sauerstoffradikale haben durch ihr natürliches Vorkommen eine bedeutende Funktion in der körpereigenen Abwehr. Bei Ansteigen der  $O_2$  - Radikalkonzentrationen kommt es durch Aktivierung von Kinasekaskaden, einer Inaktivierung von Protein- Thyrosinphosphatasen oder Aktivierung des nukleären Faktors ( NF- $\kappa$ B) zur Synthese und Freisetzung von Zytokinen, Antioxidantien, die unter physiologischen Bedingungen die ROS inhibieren, und Sauerstoffradikal abbauenden Enzymen (55).

Vorrangige „Ziele“ des oxidativen Stresses sind vor allem Lipide, Proteine und Nukleinsäuren. Aus Lipiden, ubiquitär als Phospholipide in Zellmembranen vorkommend, entstehen unter Einfluss vom Hydroxylradikal, Lipidradikale, die mit Sauerstoff zu einem Hydroxyperoxyradikal reagieren. Dieses stabilisiert sich mit einem Lipidmolekül zu einem Hydroxylipid, wobei ein neues Lipidradikal entsteht. Daraus resultiert ein Zerfall der Strukturen, deren Bestandteil sie sind und kann in Folge z. B. eine veränderte Membranpermeabilität erzeugen, bis hin zur Zerstörung der Zellstruktur („capillary-leak-Syndrom“). Die oxidative Schädigung von Nukleinsäuren durch Hydroxylierung des basischen Anteils führt zur Verbindung mit anderen Desoxyribonukleinsäuren oder zur Aufspaltung, welches Chromosomenabbrüche oder Nukleinsäurestrukturänderungen zur Folge hat. Damit ist der Reparatursmechanismus gestört und im Zusammenhang mit weiterer Mediatorfreisetzung und Leukozytenaktivierung wird ein „circulus vitiosus“ initiiert.

Stabilere Reaktionsprodukte wie zum Beispiel Malondialdehyd, welches durch Störung der Proteinfunktion aufgrund einer fehlerhaften DNA-Transkription entsteht, vermitteln Toxizität fern vom Ort ihres Entstehens (56). Ein Ansteigen des Plasmaspiegels von Malondialdehyd im Blut konnte im Rahmen einer Sepsis nachgewiesen werden (57, 58).

In den Endothelzellen konnte als Hauptquelle der ROS-Bildung die NAD(P)H-Oxidase identifiziert werden. Das in die Intima eingewanderte LDL wird zu oxLDL modifiziert, welches die Expression der endothelialen NO-Synthetase (eNOS) vermindert und damit wieder die Bildung von ROS induziert. Damit kommt es zu einer Stimulation der Produktion von Adhäsionsmolekülen und chemotaktischen Faktoren im Hinblick auf eine Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel und einer Penetration in den subendothelialen Raum sowie der Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen und letztlich als Folge die Apoptose (59-61). Die chemotaktische Wirkung des oxLDL auf zirkulierende Monozyten bewirkt eine Umwandlung in LDL-Cholesterin-Partikel aufnehmende Makrophagen. Als Folge bilden sich mit LDL übersättigte Schaumzellen, die in das Endothel abwandern und eine Plaquebildung initiieren (59, 62, 63).

Einen Einfluss der oxLDL auf die Blutdruckregulation über Bindung an lectinähnliche oxLDL-Rezeptoren konnte nachgewiesen werden. Auf der Grundlage einer gesteigerten Superoxidproduktion und dem damit verbundenen NO-Abfalls entsteht eine vasospastische Wirkung (63-65).

Durch eine Oxidation von Proteinen kommt es zur Entstehung der advanced oxidation protein products (AOPP). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass ein quantitativer Zusammenhang zwischen der Serummenge der AOPP und dem Ausmaß des oxidativen Stresses besteht (66). Vorrangig erfolgt der Abbau der

AOPP über die Leber und die Milz (67). Aufgrund einer Aktivierung der NA(P)DH-oxidase konnten eine AOPP-induzierte TNF- $\alpha$ -Sekretion bei Monozyten und ein damit verbundenes Ansteigen der reaktiven Sauerstoffspezies nachgewiesen werden (68). Eine endothelschädigende Wirkung der AOPP im Rahmen inflammatorischer Reaktionen durch den Nachweis erhöhter Plasmaspiegel ist auch im Rahmen der Entstehung einer chronischen Nierenerkrankung insbesondere auch der diabetischen Nephropathie und diabetischen Retinopathie anzunehmen (69-71).

## 1.5 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Durch die Wirkung primärer und sekundärer Mediatoren kommt es zur Leukozytenaktivierung, die eine Interaktion mit dem Gefäßendothel eingehen, welches selbst durch die Mediatoren stimuliert wird. Im Rahmen der Leukozyten-Endothel-Interaktion kommt es durch Störung der Mikrozirkulation multipler Organe ausgelöst durch eine Perfusionsstörung zu schweren Funktionsstörungen, die sich klinisch als MODS oder MOF darstellen. Im Hinblick auf die Leukozytenzahl geben sowohl eine Leukozytose als auch eine Leukopenie einen Hinweis im Zusammenhang mit weiteren Kriterien, wie Erhöhung der Körpertemperatur, Herzfrequenz oder Atemfrequenz auf ein mögliches septisches Geschehen. Als Leukozyten-Endothel-Interaktion versteht man Vorgänge, resultierend aus einer Leukozytenansammlung in der Strommitte, die als temporäre oder adhärenente Verbindung, sowie als Migration ins Gewebe verstanden werden. Vermittelt werden diese durch Adhäsivmoleküle, vorrangig durch Immunglobuline. Die Zunahme der Leukozytenzahl kann resultieren aus der Freisetzung wandständiger ruhender Leukozyten oder einer vermehrten Freisetzung auch unreifer Formen von Granulozyten aus dem Knochenmark unter dem Einfluss verschiedener Mediatoren, wie Interleukinen. Ebenso nimmt man eine verzögerte Apoptose unter dem Einfluss von LPS und proinflammatorischen Zytokinen an. Eine Leukopenie kann einerseits ausgelöst werden durch eine vermehrte Adhäsion am Endothel und folgende Migration in das umliegende Gewebe oder durch eine verminderte Expression aus dem Knochenmark bei verminderter Stammzellreifung (26, 72).

Die Leukozyten-Endothel-Interaktion selbst versteht sich durchaus als physiologischer Vorgang im Rahmen einer lokalen Infektionsbekämpfung. Bei überschießender Leukozytenaktivierung kann diese eine verheerende Wirkung entfalten. Induziert durch eine systemische NO-Freisetzung wird die Migration und Adhäsion vor allem von polymorphkerniger Granulozyten chemotaktisch durch zirkulierende inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder Interleukin-8 vermittelt (73, 74). Eine Aktivierung der Gelatinase B und Integrininteraktionen führen nachweislich ebenfalls zu einer Stammzellaktivierung und Induktion einer Leukozytose (75).

Der verminderte Blutfluss infolge einer verstärkten Leukozytenadhärenz impliziert durch die Verlegung der terminalen Strombahn eine weitere Schädigung der Mikrozirkulation und Aktivierung der Gerinnungskaskade im Sinne einer dissiminierten intravasalen Koagulopathie.

Das temporäre Interagieren der Leukozyten mit dem Endothel (Leukozyten-Rolling), welches durch das Entlangrollen der Leukozyten am Gefäßendothel mit 50µm/s in einer postkapillären Venole (Durchmesser etwa 30µm) gekennzeichnet ist, wird über Adhäsivmoleküle mit gleicher extrazellulärer terminaler NH<sub>2</sub> Domäne, die so genannten Selectine (P-, L-, E-Selectin), ermöglicht.

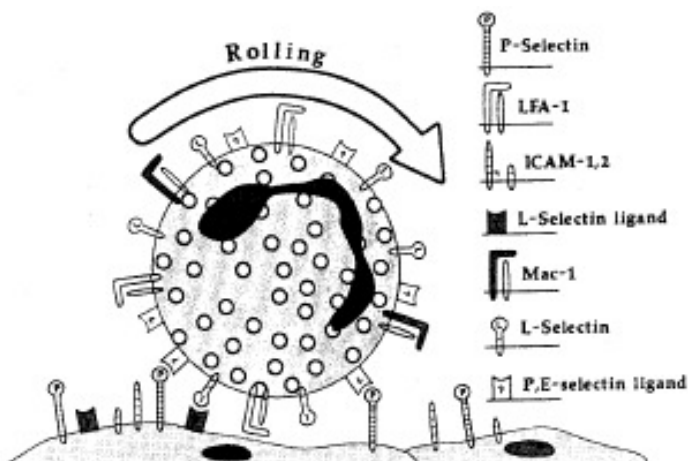
- L-Selectin ( Syn.: LECAM-1, LAM-1, Mel-14 Antigen, gp90<sup>mel</sup>, Leu8/TQ-1 Antigen, CD62L) ist als kleinstes Selectin, welches auch ohne äußere Stimuli oder auch Entzündungsreaktionen auf der Oberfläche zirkulierender Lymphozyten, Granulozyten, und Monozyten zu finden ist. Es wird auch als physiologischer Prozess im lymphatischen Gewebe betrachtet, als so genanntes „homing“ der Leukozyten an „ high endothelial venules“. In seiner Funktion als Ligand und Rezeptor werden komplexe Strukturen (Glykoproteine und Glykolipide) erkannt und über das Sialyl-Lewis<sup>x</sup>-Antigen ein primäres Andocken der Granulozyten am Endothel ermöglicht, da die Endothelzellen an der Oberfläche E-Selectin und P- Selectin exprimieren (76, 77). Durch NO wird eine Bindung am Endothel vermindert, so dass bei einer schweren entzündlichen Reaktion die Leukozytenmigration und Leukozytenadhärenz vermindert wird (78).
- P-Selectin ( Syn. GMP-140, PADGEM, CD62P) ist das größte der Selectine und ragt etwa 40 nm über die Endothelzelloberfläche hinaus. Es wird von vaskulären Endothelzellen, aus den Weibel-Palade-Körperchen der Granula der Thrombozyten exprimiert, kurzfristig nach Stimulation mit LPS, TNF-α oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (79, 80). Ley et al. zeigten, dass P- Selectin vornehmlich in der Frühphase des Leukozytenrollings eine Rolle spielt. Es führt zu einer Adhäsion von Th1- und Th2 Lymphozyten am Gefäßendothel (76, 81-83).
- E-Selectin (Syn. ELAM-1, CD62E, Endothelial- Leukozyte Adhäsion Molecule 1) wird ausschließlich auf Zytokin-und/ oder LPS aktivierten Endothelzellen exprimiert. Eine wichtige Funktion hat E-Selectin bei der Granulozytenmigration zytokinaktivierter Endothelzellen (80). Alternative Wege werden vermutet, da der Migrationsprozess die Expressionszeit überdauert (76). Eine maximale Expression findet man in humanen kultivierten Endothelzellen nach 4 Stunden, die aber über 24 Stunden hinaus anhält (83). Bei Versuchen an intakter Haut von Versuchstieren finden sich im Median 89



% Granulozyten in den postkapillaren Venolen, die mit einem E-Selektin blockierendem Peptid um bis zu 50 % reduziert werden können (84).

Der Prozess des Rollings wird durch Bindung an „Haftvermittler“ eingeleitet. Die rollende Bewegung der Leukozyten resultiert aus einer Drehbewegung um die eigene Achse. Sie wird vermittelt durch eine Vielzahl von transienten aber repetitiven Bindungen an Gefäßendothelliganden und der daraufhin wirkenden Scherkräfte. Der Verlauf ist leicht ruckartig, aufgrund der Fortsetzung der Bewegung von Endothelzelle zu Endothelzelle (85, 86).

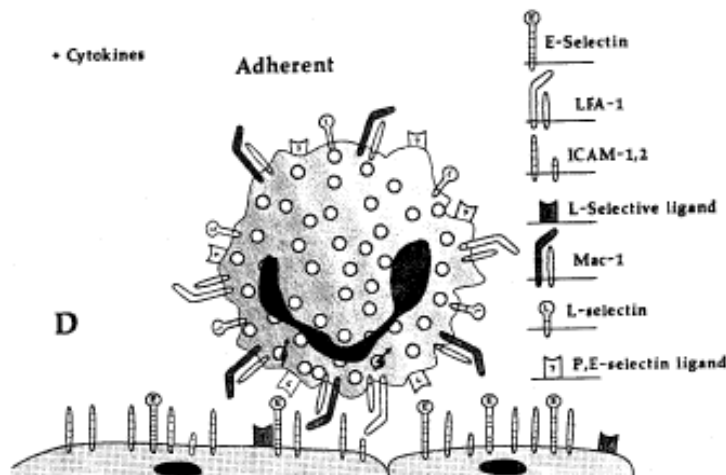
Abbildung 1 **Schema zum Leukozyten-Rolling (87)**



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

Aus dieser temporären Bindung kann durch Überwindung der Scherkräfte und permanenten Bindung an Integrine ein so genanntes Sticking erfolgen. Als „Sticker“ wird ein Leukozyt bezeichnet, wenn er mindestens für 30 Sekunden am Gefäßendothel haften bleibt (88).

Abbildung 2 Schema zum Leukozyten-Sticking (87)



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

Die beim Sticking auftretende feste Wandverbindung wird durch Integrine vermittelt. Integrine sind Heterodimere und bestehen aus zwei Untereinheiten, den größeren  $\alpha$ -Untereinheiten (120-170kD) und den kleineren  $\beta$ -Untereinheiten (90-100kD), die als Transportproteine auf der Zelloberfläche mit ihrem Hauptteil extrazellulär repräsentiert werden. Die ausschließlich auf Leukozyten exprimierten Subfamilie der  $\beta_2$ -Integrine bestehen aus einer variablen  $\alpha$ -Untereinheit(CD 11a-c) und einer gemeinsamen  $\beta$ -Kette(CD18). Verschiedene  $\beta$ -Integrine sind  $\beta_1$ -(CD 29),  $\beta_2$ -(CD 18) und  $\beta_3$ (CD 61) (89). Obwohl eine ständige Expression von  $\beta_2$ -Integrinen auf der Oberfläche von Leukozyten stattfindet, führt erst eine chemotaktische Aktivierung, möglicherweise aufgrund einer inflammatorischen Reaktion, zur Ausbildung einer Adhäsion an der Gefäßwand (88). Eine besondere Bedeutung im Hinblick auf das „Sticking“ haben die auf den Leukozyten vorkommenden  $\beta_2$ -Integrine, beispielsweise „Lymphocyte Function Associated Antigen“-LFA-1( CD 11a/CD 18), Granulozyten- und Monozytenintegrine Mac-Rezeptor( CD 11b/CD18) und das p150.95-Antigen (90). Ein Mangel dieser Substanzen zeichnet das Krankheitsbild eines Leukocyte Adhesion Deficiency Syndrom mit rezidivierenden Infekten und fehlender Pusbildung aus (91, 92).

Die Synthese der chemotaktischen Substanzen erfolgt im Endothel der Gefäße und die Wirkung der Chemokine entfaltet sich erst bei längerer Kontaktzeit mit dem Endothel. Es tritt eine Konformationsänderung der  $\beta_2$ -Integrine innermolekular auf. Eine erhöhte Bindungsaffinität führt zur Endotheladhäsion in Form des Sticking (93). Zeitgleich setzt beim Endothel eine vermehrte Produktion von Integrinliganden ein. Diese werden den Immunglobulinen zugeordnet und als Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und ICAM-2 bezeichnet (94). ICAM-1 tritt bei den meisten Zellen von bei Vorhandensein von Entzündungsmediatoren in Erscheinung und bindet hauptsächlich an leukozytäre  $\beta_2$ -Integrine LFA-1 und an das Mac-1 Antigen. ICAM-2 kann auch unabhängig einer inflammatorischen Reaktion auf Endothelzellen nachgewiesen werden und bindet nur LFA-1. Eine erhöhte Bildung und Expression durch Zytokine erfolgt nicht. Es gewinnt eine besondere Bedeutung bei Wiederaufnahme in das Gefäßsystem (88).

Ein deutliches Ansteigen der Anzahl der Roller unter dem Einfluss des nichtsteroidalen Antiphlogistikums Indometacin (von  $5,9 \pm 1,4/0,01 \text{ mm}^2/30\text{s}$  auf  $34,8 \pm 13,4/0,01 \text{ mm}^2/30\text{s}$ ;  $p < 0,05$ ) konnte in der Submukosa nachgewiesen werden (95). Ein gegenteiliger Effekt des Antibiotikums Metronidazol nach subkutaner Injektion von Indometacin wurde in mesenterialen postkapillären Venolen durch eine Abnahme der Roller beobachtet (96). In einer vergleichbaren Versuchsanordnung wurde ein Absinken der temporär adhärenenten Leukozyten und ein Ansteigen der fest adhärenenten Leukozyten intraperitonealer Instillation von Chlorhexidin und Taurolidin beobachtet (97).

Bei den adhärenenten Leukozyten wurde ein positiver Effekt auf das Absinken der bei LPS induzierter Sepsis unter 21-aminosteroid-U-74389G und Iloprost beobachtet (68, 98). In einer anderen Untersuchung wurde ein hemmender Effekt auf das „Sticking“ unter dem Einfluss von dem  $\beta$ -Lactam Antibiotikum Ampicillin beschrieben, jedoch nicht bei Verwendung eines Derivates (KKP723) (99). Mit Metronidazol behandelte Tiere wiesen ebenfalls eine geringere Anzahl fester adhärenenter Leukozyten auf. Allerdings wurde hier ein anderes Sepsismodell verwendet (colon ascendens stent peritonitis- CASP), die Dosierung des Lipopolysaccharid lag bei  $15 \text{ mg/kg/KG}$  und wurde intravenös verabreicht (100).

## 1.6 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte (FCD) gilt als Maß für die Länge der intravitalmikroskopisch ermittelten erythrozytenperfundierten Kapillaren im mikroskopisch erfassten Gesichtsfeld und wird in  $\text{mm}^{-1}$  angegeben. Damit ist sie Ausdruck der Perfusion im Kapillargebiet und reflektiert die mikrozirkulatorische Situation. Eine Abnahme der funktionellen Kapillardichte korreliert direkt mit einem verminderten Blutfluss im untersuchten Gebiet. Ein so-genanntes No-reflow-Phänomen stellt einen kompletten Ausfall der kapillären Durchblutung dar (101-103). Bei unveränderter Gesamtpfusion des Darmes konnte in einigen Studien eine Umverteilung der Perfusion zugunsten der Mukosa dargestellt werden. Eine Abnahme der Perfusion in der Muskularis führt zu einem Verlust der intestinalen Peristaltik und strukturellen Integrität. In der Mukosa sind vermutlich jedoch zytotoxische Effekte im Bereich der apikalen Villi für die nachfolgenden Funktionsstörungen verantwortlich (98, 104, 105). Eine 35%-ige Reduktion des villösen Blutflusses bei Endotoxinämie konnten Schmidt et al. intravitalmikroskopisch als Ausdruck der villösen Minderperfusion nachweisen (106). Fink et al. konnten demonstrieren, dass eine alleinige mechanisch bedingte Minderperfusion zu keiner veränderten Darmpermeabilität führt (107). In verschiedenen Studien konnte eine verminderte funktionelle Kapillardichte unter septischen Bedingungen nachgewiesen werden (101, 108, 109). Das Zusammentreffen verschiedener Faktoren der Sepsis wie Hypotension und Hypoperfusion im kapillaren Endstromgebiet sowie Mikrothrombosierung und Veränderung der Darmpermeabilität aufgrund zytotoxischer Effekte bewirken die Endotoxin-induzierte Schädigung der Darmbarriere (110).

In anderen experimentellen Untersuchungen hatte das Einwirken von verschiedenen Substanzen unterschiedlichen Einfluss auf die funktionelle Kapillardichte. Während bei Verabreichung von Ampicillin kein Einfluss zu beobachten war, kam es unter Gabe von Dopexamin zu einer Verbesserung der funktionellen Kapillardichte (zwischen 33–48%) (99, 111). Eine Abnahme der funktionellen Kapillardichte wurde in einer Studie bei Applikation von Taurolidin und Chlorhexidin (Polyhexanid) bei ähnlicher Versuchsführung nachgewiesen (97).

## 1.7 Sepsismodelle

Zur Klärung der Pathomechanismen und Entwicklung von Therapieoptionen haben Tierversuche eine große Bedeutung zwischen molekular und zellbiochemischer Forschung und klinischer Anwendung entwickelter therapeutischer Optionen. Doch bisher gelang es nicht, ein optimales Modell insbesondere zur weiteren Evaluierung der Sepsis zu entwickeln (112). Die Schwierigkeit der Definition der Sepsis, speziesabhängige Unterschiede in Bezug auf Reaktion der exogen zugeführten Noxen und anatomische und metabolische Besonderheiten wirken sich negativ auf die Übertragbarkeit auf den Menschen aus. Um sepsisähnliche Krankheitsbilder hervorzurufen, können vitale Erreger von außen eingebracht, innerhalb des Organismus freigesetzt werden oder aber Membranbestandteile von Erregern wie z.B. von *E. coli* auf verschiedenen Applikationswegen zugeführt werden.

Historische Modelle der Sepsis setzen sich aufgrund schlechter Reproduzierbarkeit, hoher Mortalitätsrate oder aufwendiger Versuchsdurchführung nicht durch. Dazu zählt die Erzeugung eines dermalen oder intramuskulären Abszesses (112). Durch Injektion oder Implantation von lebenden Erregern kann ein klinisch der Peritonitis gleichendes Bild hervorgerufen werden und ursächlich zur Sepsis führen. Der Verlauf ist meist kurz und heftig und endet letal. Der Verlauf ist schwer abschätzbar und beeinflussbar.

1968 wurde von Clowes et al. ein Zökumligaturmodell entwickelt, welches an Hunden durchgeführt wurde (113). Pathophysiologisch wird die Blutversorgung des distalen Zökums unterbunden, was einen Austritt von Stuhl und Bakterien in die freie Bauchhöhle zur Folge hat, folgend tritt eine Peritonitis auf. Mit dem Ziel ein Sepsismodell zu schaffen, dessen Ergebnisse gut reproduzierbar sind und bei größeren Gruppenzahlen einfach durchgeführt werden können, um statistische Signifikanz zu erreichen, wurde diese Methode auf Ratten übertragen. Allerdings zeigte sich hier, dass es nicht zur Ausbildung einer Peritonitis kam. Stattdessen entwickelten sich abdominale Abszesse, die von den Ratten gut toleriert wurden. Folgend entwickelten Wichtermann et al. das CLP-Modell (cecal ligation and puncture) (114). Hier erfolgt nach der Zökumligatur eine Punktion der Darmwand. Nachteilig an dem Modell ist eine längere Anwartzeit und eine schlechte Quantifizierbarkeit der Menge und Art der Keime, die in die Bauchhöhle übertreten und dort eine peritonitisähnliche Reaktion hervorrufen.

Modelle, denen eine Injektion oder Infusion von Bakterien oder Bakterienbestandteilen, wie beispielsweise Lipopolysaccharid als

Membranbestandteil von gram-negativen Bakterien zugrunde liegt, setzen sich aufgrund besserer Quantifizierbarkeit der applizierten Dosis pathogener Substanzen weitaus mehr durch. Damit lässt sich der Symptom-Zeitverlauf besser reproduzieren (115, 116). Hervorgerufen wird eine Endotoxinämie. Anhand unterschiedlicher Dosis und Dauer der Applikation werden akute oder chronische sepsisähnliche Zustände hervorgerufen.

Danner et al. nahmen an 110 kritisch erkrankten Patienten eine LPS-Messung vor. Diese wurden aufgrund ihres klinischen Bildes in zwei Gruppen unterteilt. In Gruppe 1 mit bewiesener oder vermuteter Sepsis waren in 43% die Blutproben LPS-positiv. Bei Gruppe 2, den Patienten mit einem Schock oder einer anderen Erkrankung, wurden nur bei 10% positive LPS-Nachweise der Patienten gefunden (117). Hyperdynamie, metabolische und hämatologische Veränderungen, wie sie auch bei septischen Patienten zu finden sind, wurden in einer Untersuchung bei freiwilligen Probanden nachgewiesen, denen man eine geringe Dosis (4 ng/kg KG) LPS verabreichte. Es wurden eine Tachykardie, ein Blutdruckabfall, Fieber, eine Leukozytose, eine Lymphozytopenie und ein erhöhtes Herzzeitvolumen nachgewiesen (118).

Der Vorteil des CLP-Modells liegt darin, dass ein längerer Verlauf zur Entstehung von sepsisähnlichen Symptomen das klinische Bild der Sepsis am ehesten repräsentieren kann.

Nachteilig ist eine schlechte Reproduzierbarkeit, da die freigesetzte sepsisauslösende Keimzahl schlecht quantifizierbar und definierbar ist und es sich in der Regel um ein Keimgemisch handelt (119).

Beim Endotoxinmodell sind dagegen die Dosis und die Art des Toxins genau definierbar. Es lassen sich gut reproduzierbare Symptom-Zeitverläufe nachweisen. Deshalb findet es eine breite Anwendung (120). Bereits 30-45 Minuten nach Gabe des auslösenden Agens lassen sich pathophysiologische und klinische Symptome beobachten (121). Nachteilig ist jedoch, dass im Gegensatz zum CLP-Modell kein vollwertiges Bakterium verwandt wird. Stattdessen dienen Membranbestandteile als auslösendes Agens. Eine direkte Übertragbarkeit aus dem Tiermodell in die Klinik ist dennoch nicht gegeben, da pathophysiologische Unterschiede bestehen (122).

Drewe et al. zeigten in einer experimentellen Untersuchung, dass das Endotoxin unter normalen Bedingungen von der intestinalen Mukosa durch transzelluläre Diffusion aufgenommen wird. Unter ischämischen Bedingungen steigt die Permeabilität von Lipopolysaccharid durch das Ansteigen der parazellulären Permeabilität und eine Zunahme der epithelialen Destruktion deutlich (123). Beispielsweise konnte dies in einem Versuch mit dem Fusionsprotein TNFR: FC nachgewiesen werden, bei dem der p80 TNF- $\alpha$ -Rezeptor kovalent an den Fc-Teil

von IgG gebunden ist, der im murinen LPS-Modell bereits nach einmaliger Gabe die Mortalität signifikant senken konnte. In einer folgenden klinischen Studie an Patienten, die einen septischen Schock erlitten, hatte TNFR: FC jedoch keine Auswirkung auf die Mortalität (124).

In der vorliegenden Studie wurde aufgrund der genannten Vorteile (kurzer Zeitraum bis zum Auftreten klinischer und laborchemischer Symptome, genaue Dosierbarkeit der zugesetzten Menge an LPS) das Endotoxinmodell gewählt. Zu beachten ist die Durchführung der Versuche mit gleichen LPS-Serotypen, da bei verschiedenen Serotypen unterschiedliche Wirkungen auftreten können (125). Wie auch in einer Vielzahl von Versuchen wurde in unserer Studie der Serotyp E.coli O111:B4 eingesetzt (126-128).

Eine Bedeutung hat auch die LPS-Applikationsform als Bolus oder kontinuierlich (129). Nach Fink wurde bei intraperitonealer Bolusgabe in einem Kaninchenmodell bei niedriger LPS Dosis (1,3 µg/kg KG) ein hyperdynamisches Sepsisbild und bei höherer Dosierung (5 mg/kg KG) ein hypodynamisches Sepsisbild hervorgerufen (129).

Per infusionem verabreichte Dosen von Endotoxin lösen bei geringer Dosierung ebenfalls ein hyperdynamisches Bild aus, bei höherer Dosierung ein hypodynamisches Sepsisbild mit erhöhtem peripheren Widerstand und vermindertem Herzzeitvolumen. Somit ist es gut geeignet, verschiedene Sepsisphasen zu modellieren (130).

## 1.8 Bedeutung des Intestinums

Eine zentrale Rolle des Multiorganversagens im Rahmen einer Sepsis spielt der Darm. In seiner Stellung als peripheres Endstromgebiet erfährt er in vital bedrohlichen Situationen, im Gegensatz zu Gehirn und Herz, keine bevorzugte Perfusion, so dass sich bei längerem Fortbestehen dieser Situation eine Gefahr für den Gesamtorganismus in Form eines Multiorganversagens entwickeln kann. Bei Patienten, bei denen es nach schweren Traumen zu einem Multiorganversagen kam, wurden eine Inzidenz von 10-25% und eine Mortalität von 50-70% beobachtet (131). Infolge einer sympatikoadrenergen Reaktion, auslösend sind hierfür schwere traumatische Ereignisse ein septischer oder hämorrhagischer Schock, ist der Darm minderperfundierte. Aufgrund seiner Anatomie ist das Intestinum im septischen Schock besonders gefährdet und wird als „Motor des Multiorganversagens“ betrachtet. Bei Integrität der Darmwand stellt die Schicht der Mukosa eine Barriere für Bakterien und Toxine dar. Ding et al. zeigten tierexperimentell den Zusammenhang zwischen Gewebetraumatisierung und dem Auftreten von Permeabilitätsstörungen mit einer Zunahme der Bakterientranslokation im Intestinum durch ein Anstieg der Plasmaspiegel für Stickstoffmonoxid (132).

Eine prophylaktische Gabe von Wachstumshormonen kann die Membranintegrität des Darmes unter traumatisch oder Endotoxin-stimuliertem Stress reduzieren (133). Das bestehende Gegenstromdiffusionsprinzip im Bereich der Darmzotten wird bei Minderperfusion gestört und es kommt zur Ödembildung in der Lamina propria mit Ausbildung von Epithelnekrosen, die die Membranintegrität stören und eine vermehrte Translokation von Bakterien und Toxinen ermöglichen (134). Das Konzept der bakteriellen Translokation konnte in verschiedenen tierexperimentellen Studien nachgewiesen werden (132, 135). Experimentell konnte auch eine kapillare Minderperfusion in der Zottenspitze sowie ein verminderter Blutfluss nachgewiesen werden (136). Histologisch wird die gesteigerte Permeabilität als „leaky-gut“ beschrieben (137). Durch Ischämie und Reperfusion in der Mukosa kommt es einerseits zur Aktivierung des Xanthinoxidase-Xanthindehydrogenasesystem mit der Folge einer vermehrten Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, die im Verlauf die Membranintegrität weiter stören und zum anderen zur Aktivierung der zellulären Abwehr, repräsentiert durch das GALT („Gut Associated Lymphatic Tissue“). Es stellt mit 50-70 % der lymphoiden Zellen ein umfangreiches lymphatische Gewebe im menschlichen Körper dar, welches bei Aktivierung im Rahmen eines positiven Feedbacks humorale und zelluläre Systeme aktiviert, sowie Kontrollmechanismen schädigt im Sinne einer so genannten „Mediatorexplosion“ (11, 131).



Zur Beurteilung der Ischämie im Darm wurden neben angiographischen, dopplersonographischen Verfahren, Messungen mittels Serummarkern, endoskopischen Verfahren, Katheterisierung der Lebervenen auch die Beurteilung des intramukösen intestinalen pH-Wertes (pHi) herangezogen (131, 138). Ausgehend von der Vergleichbarkeit der Hydrogencarbonat ( $\text{HCO}_3$ )-Konzentration im arteriellen Blut und im Gewebe konnte nach der Henderson-Hasselbachschen Gleichung anhand des Kohlendioxidpartialdruckes der pH-Wert ermittelt werden. Gemessen wird mit einem Tonometer direkt an der intestinalen Wand an der Spitze einer Ernährungssonde. Als frühester Parameter einer intestinalen Ischämie gilt eine Azidose im Bereich der Darmmukosa. Eine Differenzierung zwischen respiratorischen und nicht-respiratorischen Störungen ist allerdings nicht möglich. Daher ging man zur Bestimmung der mukosa-arteriellen  $\text{CO}_2$  Differenz der  $\text{pCO}_2$  Gap über (139-141).

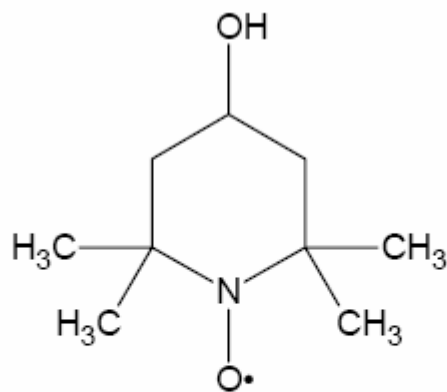
Dubin et al zeigten in einer Studie mit Schafen, die eine Lipopolysaccharidinfusion erhielten, dass in der Gruppe mit einer erhaltenen Darmperfusion ein Ansteigen des Delta  $\text{pCO}_2$  zu verzeichnen war. Im Vergleich dazu war in der Gruppe mit einem über 50%-igen gesteigertem intestinalem Blutfluss ein Ansteigen des Delta  $\text{pCO}_2$  nicht zu verzeichnen (140). Ähnlich zeigte sich auch bei einer induzierten Anämie, dass der Delta  $\text{pCO}_2$  nicht die Gewebehypoxie reflektiert (142).

Ein weiterer Ansatz einer exakteren Perfusionsbestimmung ist die Lebervenenkatheterisierung. Dabei geht man von der Korrelation funktioneller Parameter des Hepatosplanchnikusgebietes mit dem Outcome septischer Patienten, mittels der hepatischen Indocyaningrün-Clearance aus. In einer retrospektiven Studie fanden Sakka et al eine signifikante Korrelation zwischen der Indocyaningrün-Plasma disappearance rate und der Mortalität von kritisch kranken Patienten sowie eine gute Übereinstimmung mit Scoring-Systemen (APACHE II und SAPSII) (143).

## 1.9 Tempol

### 1.9.1 Allgemeines

Abbildung 3 Molekülstruktur von Tempol



TEMPOL

(4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl)

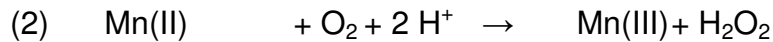
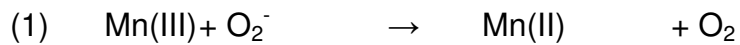
P = 3,7

Das synthetisch hergestellte Tempol ( $C_9H_{18}NO_2$ ) ist ein Superoxiddismutasemimetikum. Es liegt in fester Form als orangefarbene feste Substanz vor und löst sich in DMSO, Ethanol und Wasser. Aufgrund des niedrigen Molekulargewichtes (172,24) ist Tempol permeabel für biologische Membranen (144). Es wirkt wie die Superoxiddismutase und beschleunigt die Reaktion von  $O_2^-$  und  $H_2O$  zu  $H_2O_2$ . Die Superoxiddismutase besitzt dabei eine konstante Rate von  $2 \times 10^9 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$  (145).

### 1.9.2 Pharmakodynamik von Tempol

Die Substanz Tempol verhält sich in ihrer chemischen Reaktion wie die Superoxiddismutase. Einer der wichtigsten Aufgaben der Superoxiddismutase ist die Prävention der Reaktion von  $O_2^-$  mit NO. Die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies resultiert aus der Reduktion des molekularen Sauerstoffs um ein Elektron. Durch die Reaktion von verschiedenen Oxidasen wird so die Entstehung des Superoxidanions ( $O_2^-$ ) katalysiert. In den Blutgefäßen wurde die Superoxiddismutase als zytosolische Kuper-Zink-Form (CuZn-SOD), als

mitochondriale Manganese Form (Mn-SOD) und als extrazelluläre CuZn-SOD nachgewiesen (146). Anhand der nachfolgenden Gleichung soll beispielhaft die am Umwandlungsprozess beteiligte Mangankomponente dargestellt werden.



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



### 1.9.3 Experimentelle Untersuchungen mit Tempol

Das Superoxiddismutasemimetikum Tempol kann zu einer Normalisierung des Blutdruckes bei spontan hypertensiven Ratten führen (147, 148). Photoprotektive Eigenschaften von Tempol gegen UVA1-Bestrahlung durch Hemmung extrazellulärer Matrixzerstörung wurden in vitro nachgewiesen (149). Einen Einfluss auf die Angiogenese bei Hühnerembryonen (150), eine protektive Wirkung auf die glomeruläre Permeabilität unter oxidativem Stress in einer experimentellen Untersuchung an Ratten (151).

In 22 von 26 experimentellen Untersuchungen mit hypertensiven Nagetieren, die per infusionem Tempol erhielten, konnte ein dosisabhängiger, reproduzierbarer blutdrucksenkender Effekt nachgewiesen werden. Bei einer oralen Gabe oder als Infusion über den Verlauf von Wochen wurde dieser Effekt ebenfalls bei 59 von 68 betrachteten Studien deutlich (152). Synergistische blutdrucksenkende Effekte konnten in einer Untersuchung an Ratten mit Angiotensin II-induzierter Hypertonie nachgewiesen werden (153). Ebenso konnten synergistische Effekte mit Losartan, einem Angiotensin Typ 1 Rezeptorblocker, in Bezug auf Senkung des systolischen Blutdruckes nachgewiesen werden. In der Gruppe mit Tempol behandelten Ratten nahm er um 21%, in der Gruppe mit Losartan behandelten Tiere um 29 % im Vergleich zur Kontrollgruppe ab und normalisierte sich in der Gruppe der mit Tempol und Losartan behandelten Tiere (154).

Bei in vitro Untersuchungen an humanen Lymphozyten wurde nach Zugabe von Tempol ein anti-apoptotischer und antigenotoxischer Effekt nachgewiesen. Humane Lymphozyten wurden mit Chrom (III,VI) und Cadmium oder Tempol inkubiert und es war eine signifikant niedrigere Rate an apoptotischen oder nekrotischen Zellen nachweisbar (155). In einem Rattenmodell mit induzierter Sepsis (CLP Modell)

konnte histologisch eine geringere Anzahl von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten unter Behandlung mit Tempol im Vergleich zur unbehandelten Gruppe in der Lunge und der Leber nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde eine geringere Konzentration von Plasma- NO und Interleukin 1- $\beta$  in der mit Tempol behandelten Gruppe gemessen, so dass Tempol durchaus als therapeutischer Wirkstoff in der Behandlung des septischen Schocks vorstellbar ist (156). Weitere Studien zeigen eine geringere Konzentration von Malondialdehyd bei Tempol behandelten Tieren bei induzierter intestinaler Ischämie und Reperfusion. Ebenso wurde eine Abnahme der Rate von Arrhythmien am Herzen bei kardialer Ischämie/ Reperfusion beobachtet (157, 158).

#### **1.9.4 Klinische Anwendungen von Tempol**

Bisher liegen noch keine klinischen Untersuchungen mit Tempol vor. Aufgrund der bisherigen experimentellen Ergebnisse lassen sich Möglichkeiten in der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere der Hypertonie und der Koronaren Herzerkrankung, des Diabetes mellitus sowie dem Krankheitsbild der Sepsis vermuten. Aufgrund der positiven Wirkung im Hinblick auf die Reduktion des oxidativen Stresses sind Entwicklungen und Nutzung im Bereich des physiologischen Alterungsprozesses denkbar (159).

## 2 Herleitung der Aufgabenstellung

### 2.1 Allgemeines

Als natürliches Mittel der körpereigenen Abwehr stellen die reaktiven Sauerstoffspezies einen effektiven Mechanismus des menschlichen Körpers dar. Die Schädigung durch pathogene Keime, Viren und Pilze zu begrenzen bzw. zu verhindern. Durch eine Aktivierung des Systems im Rahmen einer Endotoxinämie kommt es zu einer Gewebeschädigung aufgrund einer Freisetzung von Mediatoren, die kaskadenartig abläuft und sich selbst wieder aktiviert, sich somit als circulus vitiosus darstellt.

Aus vorhergehenden Untersuchungen ist bekannt, dass verschiedene klinische Laborparameter, als Ausdruck des systemischen Geschehens, einen bedeutenden Einfluss auf die Entstehung und den Verlauf des septischen Multiorganversagens haben. Diese Arbeit untersucht bei provozierter Endoxämie die funktionelle Kapillardichte als Ausdruck der intestinalen Mikrozirkulation, die Leukozyten-Endothelinteraktion als Marker für die Leukozytenaktivierung und somit der Inflammationsreaktion, einschließlich verschiedener klinischer Laborparameter.

Freie Sauerstoffradikale, auch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) genannt, sind wichtige Mediatoren in der Pathogenese der Sepsis. Normalerweise stellen reaktive Sauerstoffspezies einen Teil der natürlichen körpereigenen Abwehr dar. Hauptquellen der reaktiven Sauerstoffspezies sind die Leukozyten und das Xanthinoxidase-Xanthindehydrogenasesystem, welches besonders im Gefäßendothel lokalisiert ist. Die Oxidaseform liegt unter normalen Bedingungen nur in geringer Konzentration vor. Bei Ischämien, zum Beispiel im Rahmen einer Sepsis, verschiebt sich dieses Gleichgewicht zugunsten dieser Hauptangriffspunkte der reaktiven Sauerstoffspezies sind Lipide, Proteine, und Nukleinsäuren. Aus Lipiden als Bestandteil von Zellmembranen entstehen unter dem Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies instabile Lipidradikale, die einen Verlust der Membranintegrität zur Folge haben und damit zur Zellzerstörung beitragen. Bei der Schädigung der Proteine steht vor allem eine veränderte Enzymfunktion im Vordergrund (56). Der Schaden auch an körpereigenen Zellen bewirkt eine Anregung des nukleären Faktors NF- $\kappa$ B, einer nachfolgenden TNF- $\alpha$ - Freisetzung und somit zur oxidative Schädigung von Zellmembranen. Das führt zu einer weiteren Freisetzung und Akkumulation von Leukozyten, so dass die Aktivierungskaskade von neuem beginnen kann und damit eine Fortsetzung der Schädigung vorprogrammiert ist. Eine weitere Aktivierung der Leukozyten und Freisetzung von Mediatoren erfolgt durch die ROS-induzierte

Freisetzung nukleärer Faktoren und stellt einen bisher nicht beherrschbaren circulus vitiosus dar (160). Bei wenig pathogenen Keimen bzw. einer geringen Keimzahl greift die Wirkung körpereigener Antioxidantien und der Kreislauf kann unterbrochen werden. Im Rahmen einer Sepsis erschöpfen sich die körpereigenen Reserven oder reichen in ihrer Effektivität nicht aus, um die Gewebeschädigung zu unterbinden.

Der Einsatz von Antioxidantien zur Downregulation der entsprechenden Enzyme, die reaktive Sauerstoffspezies entstehen lassen, oder die Bindung der bereits entstandenen reaktiven Sauerstoffspezies erscheint als Therapieansatz sinnvoll.

## 2.2 Ziele der Untersuchung

- Wie werden die funktionelle Kapillardichte und die Leukozyten-Endothel-Interaktion während experimenteller Endotoxinämie durch die Gabe von Tempol verändert?
- Wie werden die Konzentrationen von Entzündungsmediatoren Malondialdehyd, oxidierte Lipoproteine, advanced oxidation protein product, der Peroxidgehalt und die antioxidative Kapazität durch Gabe von Tempol beeinflusst?
- Wie verändern sich laborchemische Parameter unter Einfluss von Tempol und sind möglicherweise prägend für den gesamten klinischen Verlauf der Sepsis?

## **3 Methodik**

### **3.1 Versuchstiere**

#### **3.1.1 Tiermaterial**

Insgesamt wurden in der Studie 40 männliche Wistar-Ratten (Gewicht  $220 \pm 20$ g) im Alter von 6-7 Wochen verwendet. Die Versuchstiere wurden von der Fa. Dimed Schönwalde GmbH, Schönwalde, Deutschland bezogen. Die Haltung erfolgte in einem klimatisierten Raum bei einem 12 stündigen Dunkel-Hell-Rhythmus. Die Temperatur betrug  $22 \text{ °C} \pm 2^\circ$ , die Luftfeuchte 55-60%. Als Nahrung wurde Standardnahrung (altromin®, Haltungsfutter Ratten/Mäuse, Altromin GmbH, Lage, Deutschland) verwendet, zu der die Tiere freien Zugang hatten ebenso wie zu Wasser. Mindestens 12 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren die feste Nahrung entzogen aber freier Zugang zu Wasser weiterhin gewährt. Die Versuchsdurchführung erfolgte innerhalb einer Woche nach Anlieferung der Tiere.

Die Versuche erfolgten nach Genehmigung von der zuständigen Berliner Senatsverwaltung zur Durchführung von Tierversuchen nach § 8 und § 2 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes (161) (Aktenzeichen: G0137/03).

#### **3.1.2 Gruppeneinteilung**

Die Versuchsreihe wurde in 4 Gruppen eingeteilt. Eine Kontrollgruppe (n=10) wurde instrumentiert, laparotomiert und der Versuchsablauf ohne Zugabe von Endotoxin oder Antioxidantien durchgeführt. Die zweite Gruppe (n=10) erhielt 10 mg/kg Körpergewicht/h Endotoxin (LPS von E. coli, Serotyp 055:B5; Sigma, Deisenhofen, Deutschland; gelöst in NaCl 0,9%) über 2 Stunden als i.v. Infusion ohne weitere Therapie.

Die Gruppe 3 (n=10) erhielt Tempol (4-Hydroxy-2, 2, 6, 6,-tetramethylpiperidine 1-oxyl, Sigma- Aldrich, Taufkirchen, gelöst in NaCl 0,9%) als Bolus von 30 mg/kg Körpergewicht und wurde nachfolgend als Infusion von 9 mg/kg/Körpergewicht über 2 Stunden gegeben.

In der Therapiegruppe 4 (n=10 Tiere) wurden die Tiere präpariert und erhielten 10 mg /kg Körpergewicht Endotoxin und zusätzlich eine Therapie mit Tempol entsprechend der o. g. Dosierung.



Tabelle 1 **Gruppeneinteilung**

| <b>Gruppen</b> | <b>Monitoring</b>           | <b>Spezielle Untersuchungen</b>    |
|----------------|-----------------------------|------------------------------------|
| Kontrollgruppe | Hf, MAP, BGA, Leuko, Laktat | IVM, MDA, oxLDL, AOPP, Perox, Anox |
| LPS            | Hf, MAP, BGA, Leuko, Laktat | IVM, MDA, oxLDL, AOPP, Perox, Anox |
| Tempol         | Hf, MAP, BGA, Leuko, Laktat | IVM, MDA, oxLDL, AOPP, Perox, Anox |
| LPS + Tempol   | Hf, MAP, BGA, Leuko, Laktat | IVM, MDA, oxLDL, AOPP, Perox, Anox |

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

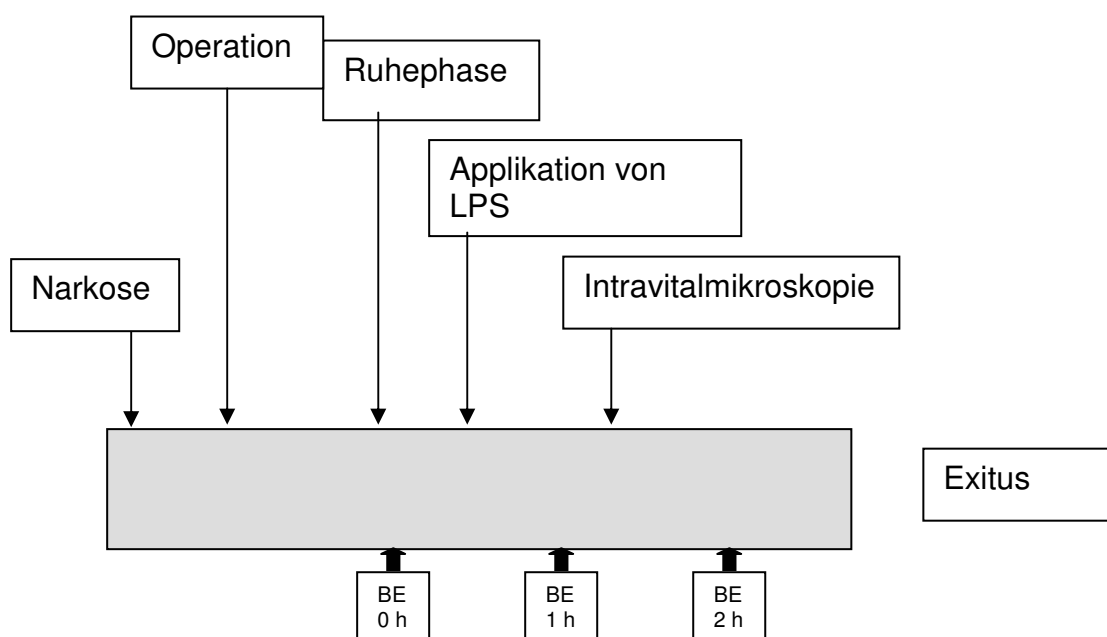
## 3.2 Versuchsmodell

### 3.2.1 Versuchsablauf

Der Versuchsablauf war für alle Gruppen identisch. Alle Tiere wurden intravital mikroskopiert und es wurden entsprechend unten stehender Tabelle Blutabnahmen vorgenommen.

Zu Beginn erfolgten die Präparation, die im Mittel 30-45 min dauerte, und die Tracheotomie sowie das Einlegen der intravasalen Katheter beinhaltete. Im Anschluss wurde den Versuchstieren eine Erholungszeit von 15 min gewährt. Im Anschluss wurde die Endotoxinämie bzw. Medikamentengabe per infusionem induziert. Die Blutabnahmen erfolgten zum Zeitpunkt 0 (vor Beginn der Endotoxinämie), 1 Stunde und 2 Stunden nach Gabe des Endotoxins. Eine mediane Laparatomie erfolgte 60 Minuten nach Untersuchungsbeginn. Die Intravitalmikroskopie wurde nach einer Erholungszeit von 15 Minuten durchgeführt.

Abbildung 4 Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs ( BE- Blutentnahme)



### **3.2.2 Anästhesie und Monitoring**

Die Narkose wurde mit intraperitonealer Gabe von 60 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital (Pentobarbital Natrium, Synopharm GmbH & Co. KG, Barsbüttel, Deutschland) eingeleitet. Die Narkosetiefe wurde anhand des Zwischenzehenreflexes, des Lidschlussreflexes und der Atemfrequenz überwacht. Bei Bedarf erfolgten i.v. Bolusgaben von Pentobarbital mit 30 mg/kg Körpergewicht.

Zehn bis fünfzehn Minuten nach Narkoseeinleitung konnte mit der Operation begonnen werden. Die Lagerung und Fixierung der Tiere erfolgte in Rückenlage auf einer Wärmeplatte. Zur Überwachung der Körperkerntemperatur von  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  wurde eine rektale Thermistorsonde (W 233, RFT, Stassfurt, Deutschland) verwendet.

Die Tiere wurden tracheotomiert, um eine Verlegung der Atemwege auszuschließen, sie atmeten spontan Raumluft.

Es wurden in die rechte Vena jugularis interna und die linke Arteria carotis communis nach entsprechender Präparation Polyethylenkatheder (PE 50 Innendurchmesser 0,58mm, Außendurchmesser 0,96, Portex, Hythe, Kent, GB) eingebracht und fixiert. Der Zugang über die Vena jugularis diente der Volumensubstitution und Verabreichung von Medikamenten und der arterielle Zugang zur Blutentnahme und Blutdrucküberwachung.

Kontinuierlich erfolgte ein Monitoring des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks, der Herzfrequenz und der Atemfrequenz (Biomonitor 5231, Druckmesswandler W112, RFT, Stassfurt, Deutschland).

Die Volumensubstitution erfolgte bei allen Tieren mit 7,5 ml/kg/h über den zentralvenösen Zugang mit Vollelektrolytlösung (Thomaejonin®, Thomae, Biberach, Deutschland). Es erfolgte eine Differenzvolumensubstitution zu der Gruppe, die durch Medikamentengabe am meisten Volumen erhalten hatte (Endotoxin- Tempol-Gruppe)

### **3.2.3 Operative Technik**

Nach Fixierung der Tiere in Rückenlage wurden der Halsbereich und Bauchbereich rasiert und desinfiziert. Die Haut wurde medial im Halsbereich etwa über eine Länge von 2 cm von kranial nach kaudal inzidiert. Es wurde die Trachea über eine Länge von etwa 1 cm dargestellt und unterhalb des Kehlkopfes mit einer Mikroschere (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) quer eröffnet. Die Intubation erfolgte mit einer Venenverweilkanüle (Braunüle® G 14, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland).

Im Anschluss wurde die Vena jugularis interna dextra dargestellt, nach proximaler Ligatur in Venae-sectio-Technik eröffnet und der Polyethylenkatheder eingebracht, der

mit einem Faden (Ethibond Exel<sup>®</sup>, 2-0 Ethicon, Johnson-Johnson, Belgien) fixiert wurde. Im Anschluss wurde die Arteria communis sinistra in gleicher Weise dargestellt. Die Arterie wurde distal ligiert und proximal mittels Microclip (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) abgeklemmt. Nach Kathetereinlage wurde dieser mit einem Faden fixiert und der Microclip entfernt.

Nach Intubation, arterieller und venöser Kathetereinlage folgte eine Erholungsphase von 15 Minuten. Die mediane Laparotomie vom Xiphoid bis zur Symphyse erfolgte kurz vor Durchführung der Intravitalmikroskopie.

Eine Stunde nach Beginn der Endotoxinämie wurde die Intravitalmikroskopie durchgeführt. In No-Touch-Technik wurde ein ca. 5 cm langes Segment des terminalen Ileums proximal der Ileocoecalklappe aufgesucht und auf eine spezielle Halterung gebracht. Zur Abdeckung der Mikroskopierkammer diente ein transparentes Deckgläschen (20x26 mm). Darmabschnitte die für die Untersuchung nicht benötigt wurden, wurden mit Gaze abgedeckt und mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung (Thomaejonin<sup>®</sup>, Thomae, Biberach, Deutschland) kontinuierlich befeuchtet, um eine Austrocknung zu vermeiden.

Am Schluss der Untersuchung erfolgte eine Tötung der Tiere mit 4 ml gesättigter Chloralhydratlösung (Chloralhydrat, Aldrich-Chemie, Steinheim, Deutschland) intravenös.

### **3.3 Labor**

Nach 0, 60 und 120 Minuten wurden aus dem arteriellen Katheter jeweils 600 µl Citratblut und 150 µl Heparinblut entnommen. Im Anschluss an die jeweilige Blutentnahme wurde aus dem heparinisierten Blut das Blutbild angefertigt. Zeitgleich zur Bestimmung des Blutbildes wurden die 600 µl Citratblut bei 6000 Umdrehungen/min zentrifugiert (Janetzki TH 12). Der Plasmaüberstand von etwa 200 µl wurde abpipettiert, mit NaCl 1:1 verdünnt und in 6 Proben à ca. 60 µl aufgeteilt und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C tief gefroren. Die unten aufgeführten Laborparameter wurden mit rattenspezifischen Labor-Kits

#### **3.3.1 Leukozyten**

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

#### **3.3.2 Malondialdehyd**

Um Malondialdehyd zu bestimmen, wurden 50 µl EDTA- Plasma benötigt. Der Spiegel an Malondialdehyd wird mit Hilfe der Thiobarbitursäure (TBA) festgestellt (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland. Es wurden 20µl der Probe mit 1 ml Derivatisierungslösung eine Stunde bei 95°C inkubiert. Die Probe wurde nach Abkühlen über 15 Minuten auf 2-8°C 5 Minuten lang zentrifugiert. Zu der so aufbereiteten Probe (500 µl) wurden 500 µl Reaktionslösung zugegeben. Durch die Reaktion von zwei Molekülen Malondialdehyd mit Thiobarbitursäure (TBA) entsteht ein roter Farbstoff, der photometrisch gemessen werden kann und somit dem Gehalt an Malondialdehyd entspricht.

#### **3.3.3 Oxidierte low density Lipoprotein (oxLDL)**

50 µl EDTA- Plasma wurden für ein Sandwich-Enzym-Immun-Assay (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland) benötigt. Das in der Probe enthaltene oxLDL des Versuchstieres wird durch einen monoklonalen Antikörper der verwendeten Mikrotiterplatte gebunden und überschüssige ungebundene Substanz ausgewaschen. Nach Zugabe eines peroxidase markierten Antikörpers erfolgt erneut

eine Inkubation und Auswaschung überschüssiger Substanz. Nach Zugabe des Peroxidasesubstrates Tetramethylbenzidin (TMB) und nachfolgend einer säurehaltigen Stopplösung findet ein Farbumschlag von blau nach gelb statt. Die mittels photometrischer Messung (450 nm) ermittelte Farbintensität ist direkt proportional der Konzentration der gemessenen oxidierten low density Lipoproteins. Eine Angabe der Werte erfolgt in ng/ml.

### **3.3.4 Advancend oxidation protein products (AOPP)**

In 50µl EDTA- Plasma wurde mit Hilfe eines kolorimetrischen Mikrotiterplattenassays (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland) der Gehalt an AOPP ermittelt. Es erfolgt eine Messung der Absorption bei 340 nm einer Standard- und Kontrolllösung, sowie der Probe. Die Chloramin-T (CT) Absorption bei 340 nm ist im Konzentrationsbereich von 0-100 µmol/l linear. Die Angabe der AOPP- Konzentration erfolgte in µmol/l.

### **3.3.5 Antioxidative Kapazität (ANOX)**

Für die Bestimmung wurden ebenfalls 10µl EDTA-Plasma benötigt. Eine Messung der antioxidativen Kapazität erfolgte mittels eines kolorimetrischen Mikrotiterplattenassays (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland. Es wurde durch Zuführung einer genau bestimmten Menge von exogenem Peroxid die Kapazität der reaktiven Sauerstoffspezies in der vorliegenden Probe ermittelt. Die quantitative Bestimmung des nicht umgesetzten Peroxides wurde durch eine peroxidasekatalysierte Reaktion ermittelt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C. Nach Zugabe einer Stopplösung wurde eine photometrische Messung bei 450nm durchgeführt. Eine Angabe des Ergebnisses erfolgte in µmol/l.

### **3.3.6 Peroxidbestimmung**

Mittels eines Test-Kits (Immundiagnostik AG, Bensheim, Deutschland) wurde photometrisch bei 450 nm die Bestimmung der Peroxide in µmol/l nach Reaktion von Peroxidase mit Peroxid und nachfolgender Substratumsetzung mit Tetramethylbenzidin (TMB) aus einer Probenmenge von 10 µl EDTA-Plasma ermittelt. In eine Mikrotiterplatte mit entsprechenden Vertiefungen wurden 10 µl EDTA- Plasma eingebracht. Nach Zugabe eines Reaktionspuffers wurde die Eigenabsorption bei 450nm gemessen. Eine Stopplösung wurde nach Inkubation für 15 Minuten bei 37 °C zugefügt und eine erneute photometrische Messung bei 450nm durchgeführt. Die Differenz der Messungen verhält sich proportional zur Peroxidkonzentration. Eine Angabe der Ergebnisse erfolgte in µmol/l.

## **3.4 Intravitalmikroskopie**

### **3.4.1 Technik**

Die nachfolgend aufgelisteten Geräte erlaubten die Durchführung der Intravitalmikroskopie einschließlich der Aufzeichnung der Untersuchungen.

Epifluoreszenzmikroskop Axiotech Vario, Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Lichtquelle HBO 50, Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Okulare 10x, Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Objektiv- 10 x / 0,5; Fluar, Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Objektiv- 20 x / 0,5; Achroplan, Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Filtersatz Nr. 20, Carl Zeiss, Jena, Deutschland ( Anregung: BP 450-490; Frequenzteiler: 510; Emission: BP 515-565) für Beobachtungen mit FITC- Dextran

Video Kamera: Panasonic WV 1850, Matsushita, Tokio, Japan

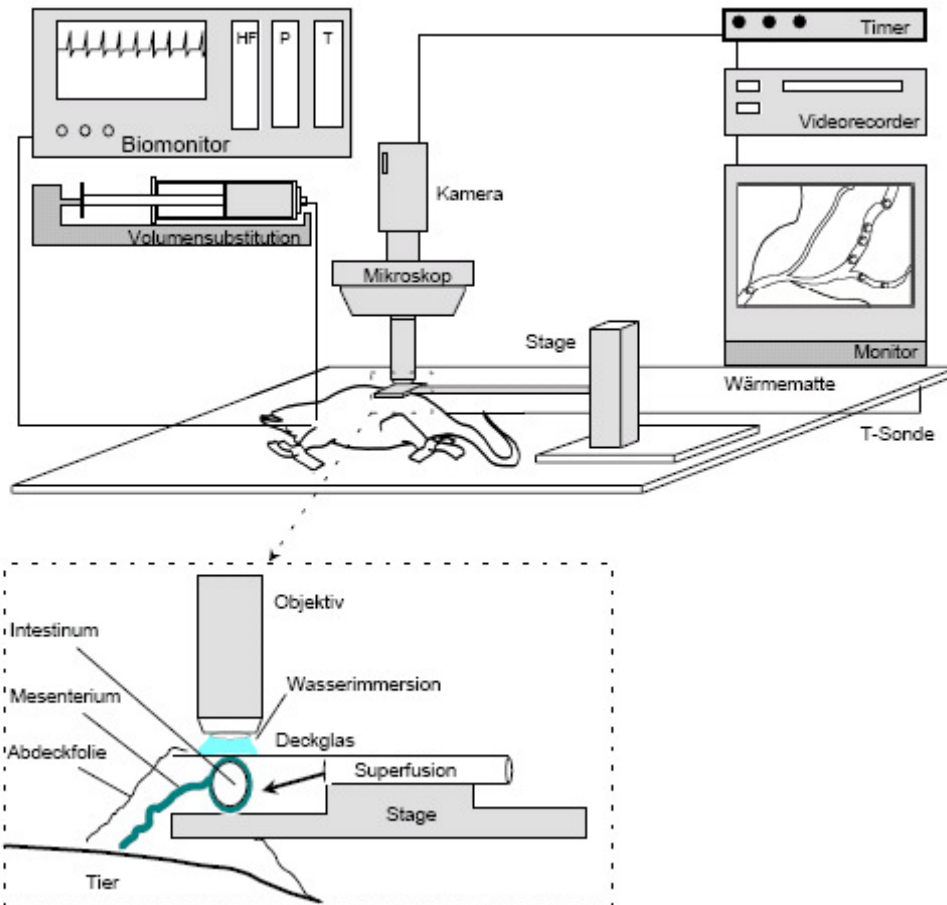
Videorecorder: Panasonic AG 6200, Matsushita, Tokio, Japan

Monitor: Philips LDH 2106/00, Philips, Eindhoven, Niederlande

Video Timer: VTG-22, For-A, Tokio, Japan

Die Mikroskopie erfolgte am mittels No-Touch-Technik ausgelagerten Darmabschnitt.

Abbildung 5 **Darstellung der Intravitalmikroskopie (87)**



Mit der intravenösen Gabe eines Bolus von 200 $\mu$ l 0,017% Rhodamin-6G (Sigma, Deisenhofen, Deutschland; Lösungsmittel: NaCl 0,9%) erfolgte die Markierung der Leukozyten und es konnte damit eine entsprechende Darstellung über den gesamten Mikroskopierzeitraum erreicht werden. Nachfolgend wurden Gefäße der Submukosa mittels Fokussierung dargestellt. Die Zählung der Leukozyten erfolgte in 3 Gesichtsfeldern an unverzweigten über mindestens 300  $\mu$ m gestreckt verlaufenden Venolen 3.Grades. Die Aufzeichnung und Auszählung erfolgte über einen Zeitraum von 30 -60s. Die Dauer der Mikroskopie betrug 15-20 Minuten.

Im Anschluss erfolgte die Gabe von 200  $\mu$ l einer 5 %-igen FITC-Dextran-Lösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland; gelöst in 0,9 %-igem NaCl) als intravenösem Bolus.



### 3.4.2 Leukozytenadhärenz

Es wurden jeweils sieben submuköse Venolen 3. Grades (V3) mit einem Durchmesser von  $37,2 \pm 5,5 \mu\text{m}$  zur Auswertung herangezogen. Eine Markierung der Leukozyten erfolgte mit Rhodamin- 6G.

Unterteilt wurden die Leukozyten in zwei Gruppen:

- Die Anzahl der für einen vorgegebenen Zeitraum von 30 Sekunden am untersuchten Gefäßabschnitt die Gefäßwand mit einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von  $50 \mu\text{m/s}$  passierten Leukozyten (76). Diese werden auch als „Roller“ bezeichnet, da nur eine temporäre Gefäßinteraktion besteht. Ein Mittelwert wurde aus zwei Gefäßdurchmessern des jeweiligen Gefäßes nach folgender Gleichung bestimmt:  $\text{Roller-flow} = \text{Anzahl der Zellen/min}$
- Eine zweite Gruppe stellen die so genannten „Sticker“ dar, die mindestens über einen Zeitraum von 30 Sekunden an einer umschriebenen Endothelfläche haften blieben. Bei der Berechnung wird eine zylinderförmige Struktur der Gefäßwand mit nachfolgender Formel zugrunde gelegt.

Zylinderfläche  $F = l \times U$

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

$D = \text{Gefäßdurchmesser}$

$l = \text{Länge des Gefäßes}$

Die maßstabsgetreue Größen- und Längenbestimmung erfolgte mittels eines speziellen Computerprogramms (Capiscope der Firma KKTechnology, Devon, Großbritannien).

### 3.4.3 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte definiert sich aus dem Verhältnis der sichtbaren erythrozytenperfundierten Kapillaren (Hell-[FITC-Dextran-markiertes Plasma]/ Dunkel-[Erythrozyten] Kontrast) zu einer definierten Fläche. Eine Abnahme steht in direktem Zusammenhang zu einem verringerten bis sistierendem Blutfluss im untersuchten Gebiet und kann bis hin zu einem kompletten Ausfall der kapillären Durchblutung, dem so genannten *No-reflow-Phänomen*, reichen (102). Als funktionslos wurden die Kapillaren eingestuft, die keinerlei sichtbare Erythrozytenperfusion über den Beobachtungszeitraum erkennen ließen.

Zur Anwendung kam die manuelle Methode nach Schmid-Schoenbein et. al. mit einem dafür entworfenen Computerprogramm Capiscope der Firma KKTechnology (KKTechnology, Devon, Großbritannien) welches zur Dokumentation und Auszählung der perfundierten Kapillaren mittels einer definierten Gitterschablone genutzt wurde (162).

Rechnerisch wird die Kapillarlänge je Gitterkästchen ( $L_K$ ) ermittelt.

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

$$L = 2 P_M d = \text{Länge des Gittersystems}$$

$$d = \text{Kantenlänge eines Kästchens (in } \mu\text{m} = \text{Originallänge)}$$

$$P_M = \text{Kästchenzahl}$$

$$N = \text{Kreuzungen von perfundierten Kapillaren mit Gitterlinien}$$

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

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

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

### 3.5 Statistik

Die Auswertung der Daten und statistische Analyse wurde mit dem Statistical Package for Social Sciences (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) Version 15.0 durchgeführt. Eine Angabe aller Daten erfolgte in Medianen mit 25. und 75. Perzentilen. Unter der Voraussetzung, dass keine Normalverteilung vorlag, wurde auf das Vorhandensein der Gleichheit der Varianzen überprüft. Ausgehend von den vorliegenden kleinen Fallzahlen wurden auf der Grundlage der Basiswerte nicht-parametrische Tests zur Analyse der Daten durchgeführt. Dieses ermöglicht einen Vergleich der Gruppen miteinander über die gesamte Versuchszeit. Bei festgestellten Unterschieden der Gruppen zu bestimmten Zeitpunkten wurden der H-Test nach Kruskal-Wallis und der U-Test nach Mann-Whitney zum paarweisen Vergleich einzelner Gruppen benutzt.

Bei Wiederholungsmessungen wurden die über den gesamten Untersuchungszeitraum erhobenen Werte mit in die Berechnung einbezogen und als zweifaktorielle nichtparametrische Kovarianzanalyse (ANCOVA) der longitudinalen Daten mit Orientierung am Basiswert als Kovariate durchgeführt. Der erste Faktor war die Betrachtung mit den Abstufungen Kontrollgruppe, Endotoxin-Gruppe, Tempol-Gruppe, Endotoxin-Tempol-Gruppe. Der zweite Faktor Zeit war abgestuft in die einzelnen Messzeitpunkte (0 Stunden, 1 Stunde, 2 Stunden). Bei dieser Analyse wird nicht nur die Wirkung beider Faktoren und deren Interaktion bestimmt, sondern auch der Einfluss von möglichen Kovariaten. Der Nachweis einer Veränderung in Bezug auf die Zugehörigkeit bestimmter Gruppen erfolgte nur bei Vorhandensein von Signifikanz der Interaktion beider Faktoren ohne Einfluss der Kovariate. Im Anschluss wurden mit Hilfe linearer Kontraste die einzelnen Therapiegruppen mit den Kontrollgruppen mit dem U- Test nach Mann- Whitney verglichen. Im Falle eines signifikanten Unterschiedes zwischen der Endotoxin- und einer der Therapiegruppen schloss sich ein Post-Hoc-Test an. Dabei wurde paarweise zu den einzelnen Messzeitpunkten verglichen.

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

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klinische Parameter

#### 4.1.1 Herzfrequenz

In Tabelle 2 ist die Herzfrequenz (HF) dargestellt. Gemessen wurde die Anzahl der Schläge pro Minute (n/min) über einen Zeitraum von 2 Stunden wurde im Abstand von 15 Minuten gemessen. Zur Auswertung kamen die Zeitpunkte Null, nach einer und nach zwei Stunden. Die Ausgangswerte der Tempol-Gruppe und der Endotoxin-Tempol-Gruppe lagen im Median mit 325/min bzw. 308/min deutlich niedriger als die der Kontrollgruppe (377/min) bzw. der mit Endotoxin (368/min) behandelten Gruppe.

In der Endotoxin-Gruppe kam es zum Ansteigen der Herzfrequenz sowohl nach einer Stunde mit einem Median von 394/min. Nach zwei Stunden war ein Anstieg zu verzeichnen mit 436/min mit Vergleich zur Kontrollgruppe mit 333/min nach der ersten und 394/min nach der zweiten Stunde, jedoch ohne Signifikanz. Im Vergleich zur Tempol-Gruppe war dieser signifikant ( $p < 0,05$ ).

In der Tempol-Gruppe bleibt die Herzfrequenz nach der ersten Stunde im Median mit 325/min relativ unverändert. Sie fällt leicht ab auf 308/min- auch hier ohne Signifikanz innerhalb der Gruppe, aber signifikant zur Endotoxin behandelten Gruppe ( $p < 0,05$ ). Die Tempol-Endotoxin-Gruppe zeigt ebenfalls eine erhöhte Herzfrequenz im Median nach der ersten Stunde bei 316/min und nach zwei Stunden bei 368/min, woraus sich eine Signifikanz im Vergleich zur Tempol-Gruppe beschreiben lässt.

Tabelle 2 Herzfrequenz n/min

| Zeit [h]                | 0                | 1                | 2                | p               |
|-------------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|
| Gruppe                  |                  |                  |                  |                 |
| Kontrollgruppe          | 377<br>(342-395) | 333<br>(304-383) | 394<br>(368-411) | n.s.            |
| Endotoxin-Gruppe        | 368<br>(360-411) | 394<br>(364-448) | 436<br>(355-470) | $p \leq 0,05^1$ |
| Tempol-Gruppe           | 325<br>(304-364) | 325<br>(291-325) | 308<br>(291-360) | $p \leq 0,05^2$ |
| Endotoxin+Tempol-Gruppe | 308<br>(282-346) | 316<br>(304-360) | 368<br>(342-377) | n.s.            |

Bestimmung der Herzfrequenz in Anzahl der Schläge pro Minute [n/min]. Messungen zum Zeitpunkt 0,1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion, p für ANCOVA. n.s.: nicht signifikant; <sup>1</sup> im Vergleich zur Tempol-Gruppe; <sup>2</sup> im Vergleich zur Endotoxin-Gruppe

### 4.1.2 Atemfrequenz

In der Tabelle 3 ist die Atemfrequenz (AF) dargestellt. Gemessen wurde die Anzahl der Atemzüge pro Minute (n/min). Die Messung erfolgte im Abstand von 15 Minuten und zur Auswertung kamen die Werte zum Zeitpunkt Null, nach einer und nach zwei Stunden. Ein Trend der Erhöhung der Atemfrequenz über den gesamten Untersuchungszeitraum war in der Endotoxin-Gruppe der Kontrollgruppe und der Endotoxin- Tempol- Gruppe zu beobachten. Statistisch zeigten sich keine Unterschiede. In der Gruppe der mit Tempol behandelten Tiere zeigte sich nach der ersten Stunde eine leicht steigende Tendenz im Median auf 103/min mit nachfolgend abfallender Frequenz im Median auf 85/ min. Bei der Gruppe, die zusätzlich Endotoxin erhielt, nahm die Atemfrequenz über den gesamten Zeitverlauf leicht zu, bei beiden Gruppen jedoch ohne Nachweis einer Signifikanz. Zwischen den Gruppen konnten keine Unterschiede nachgewiesen werden.

Tabelle 3 Atemfrequenz n/min

| Zeit [h]                | 0                | 1                 | 2                  | p    |
|-------------------------|------------------|-------------------|--------------------|------|
| Gruppe                  |                  |                   |                    |      |
| Kontrollgruppe          | 92,5<br>(83-98)  | 93<br>(80-110)    | 96,5<br>(81-100)   | n.s. |
| Endotoxin-Gruppe        | 85,5<br>(70-109) | 108,5<br>(95-131) | 121,5<br>(104-131) | n.s. |
| Tempol-Gruppe           | 95<br>(79-97)    | 103<br>(94-119)   | 85<br>(80-103)     | n.s. |
| Endotoxin+Tempol-Gruppe | 81,5<br>(64-98)  | 100,5<br>(95-109) | 102,5<br>(90-121)  | n.s. |

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

### 4.1.3 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

In Tabelle 4 ist der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) dargestellt. Die Blutdruckmessung erfolgte über den gesamten Zeitraum der Untersuchung im Abstand von 15 Minuten. Zur Auswertung kamen die Messungen zum Zeitpunkt Null, nach einer und nach zwei Stunden. In allen vier Gruppen zeigte sich nach der ersten Stunde ein Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes. In der Tempol-Gruppe fiel dieser am niedrigsten aus. In der zweiten Stunde zeigt sich eine leichte Erholung der Blutdruckwerte bis auf die Gruppe der mit Endotoxin behandelten Tiere, wo es zu einem weiterem Absinken der Werte im Median auf 94,5 mmHg kam. Im Vergleich zu den Ausgangswerten wurde nur in der Tempol-Gruppe ein leichter Anstieg auf 91 mmHg zum Zeitpunkt 2 Stunden im Median beobachtet. Im Vergleich der Tempol-Gruppe und der Endotoxin- Tempol- Gruppe können Unterschiede nachgewiesen werden mit  $p=0,04$ .

Tabelle 4 **mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) in mmHg**

| Zeit [h]                | 0                    | 1                      | 2                      | p               |
|-------------------------|----------------------|------------------------|------------------------|-----------------|
| Gruppe                  |                      |                        |                        |                 |
| Kontrollgruppe          | 121<br>(95,5-129,5)  | 100<br>(86-119)        | 108<br>(89-112)        | n.s.            |
| Endotoxin-Gruppe        | 107,5<br>(98-122,5)  | 103,5<br>(80-118,25)   | 94,5<br>(75,25-111,25) | n.s.            |
| Tempol-Gruppe           | 83<br>(62,75-116)    | 82<br>(73,5-95,5)      | 91<br>(77,75-108,25)   | $p \leq 0,05^1$ |
| Endotoxin+Tempol-Gruppe | 96<br>(78,75-107,75) | 80,5<br>(72,75-101,75) | 82<br>(74,5-96)        | $p \leq 0,05^2$ |

*Bestimmung des mittleren arteriellen Blutdrucks im Millimeter Quecksilbersäule [mmHg]. Messungen zum Zeitpunkt 0,1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion, p für ANCOVA. n.s.: nicht signifikant; <sup>1</sup> im Vergleich zur Endotoxin+Tempol-Gruppe; <sup>2</sup> im Vergleich zur Tempol-Gruppe*

#### 4.1.4 Leukozyten

In Tabelle 5 ist die Zahl der Leukozytenzahl dargestellt. Sie wurden zum Zeitpunkt Null, nach einer und nach zwei Stunden bestimmt. Ein leichtes Ansteigen der Leukozytenzahlen im peripheren Blut nach einem Zeitverlauf von zwei Stunden war in der Kontrollgruppe von 4,08 auf 4,82 Gpt/ l und in der Tempol-Gruppe von 2,98 auf 3,88Gpt/l zu beobachten. Ein Absinken der Leukozytenzahlen wurde in der Endotoxin- Gruppe von 3,75 auf 2,18 Gpt/ l und in der Endotoxin-Tempol-Gruppe von 3,6 auf 0,82 Gpt/ l beobachtet. Signifikante Unterschiede waren nicht nachweisbar.

Tabelle 5 **Leukozytenzahl in Gpt/l**

| Zeit [h]                | 0                   | 1                   | 2                   | p    |
|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|------|
| Gruppe                  |                     |                     |                     |      |
| Kontrollgruppe          | 4,08<br>(2,35-6,11) | 3,38<br>(2,41-4,13) | 4,82<br>(2,92-7,52) | n.s. |
| Endotoxin-Gruppe        | 3,37<br>(2,10-3,74) | 1,61<br>(0,71-2,84) | 2,17<br>(1,15-3,36) | n.s. |
| Tempol-Gruppe           | 2,98<br>(2,39-3,69) | 2,36<br>(1,24-3,60) | 3,88<br>(2,62-5,58) | n.s. |
| Endotoxin+Tempol-Gruppe | 3,36<br>(1,71-5,31) | 2,46<br>(1,19-3,95) | 0,82<br>(2,89-4,14) | n.s. |

*Bestimmung der Leukozytenzahl in Gigapartikel pro Liter [Gpt/l]. Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion. Multivariate nonparametrische Analyse, Ausrichtung an dem 0-Wert als Covariate, angepasst für die Analyse wiederholter Messungen n.s.: nicht signifikant*



#### 4.1.5 Malondialdehyd

In Tabelle 6 ist die Bestimmung des Malondialdehyds in Nanomol pro Milliliter (nmol/ml) dargestellt. Eine Bestimmung erfolgte zum Zeitpunkt Null, nach einer und nach zwei Stunden. Bei der Bestimmung der Malondialdehydkonzentration zeigte sich ein Abfall in der Endotoxin-Gruppe von 0,62 auf 0,55 nmol/ml und in der Tempol-Gruppe von 0,55 auf 0,51 nmol/ml im Median, der jedoch nur im Vergleich der Endotoxin-Gruppe zur Kontrollgruppe signifikant war. Auffällig war eine höhere Ausgangskonzentration von Malondialdehyd in der Endotoxin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im zeitlichen Verlauf der Untersuchung war eine Zunahme der Malondialdehydkonzentration in der Endotoxin-Tempol-Gruppe am deutlichsten. Ebenfalls nicht signifikant fiel in der Tempol-Gruppe ein leichtes Absinken der Malondialdehydkonzentration auf (0,55 auf 0,51 nmol/ml). Mittels nicht-parametrischer ANCOVA mit Messwiederholung konnte ein Unterschied  $p = 0,01$  im Vergleich der Kontrollgruppe mit der Endotoxin-Gruppe nachgewiesen werden.

Tabelle 6 **Malondialdehyd (MDA) in  $\mu\text{mol/l}$**

| Gruppe                  | Zeit [h] | 0                   | 1                   | 2                   | p               |
|-------------------------|----------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------|
| Kontrollgruppe          |          | 0,36<br>(0,33-0,67) | 0,38<br>(0,32-0,55) | 0,55<br>(0,47-0,83) | $p \leq 0,05^1$ |
| Endotoxin-Gruppe        |          | 0,62<br>(0,41-0,76) | 0,43<br>(0,40-0,86) | 0,55<br>(0,44-0,78) | $p \leq 0,05^2$ |
| Tempol-Gruppe           |          | 0,55<br>(0,39-0,61) | 0,37<br>(0,34-0,48) | 0,51<br>(0,31-0,76) | n.s.            |
| Endotoxin+Tempol-Gruppe |          | 0,49<br>(0,31-0,68) | 0,47<br>(0,33-0,63) | 0,66<br>(0,46-0,83) | n.s.            |

Konzentration des Malondialdehyds in Mikromol pro Milliliter [ $\mu\text{mol/ml}$ ] Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion. Multivariate nonparametrische Analyse, Ausrichtung an dem 0-Wert als Covariate, angepasst für die Analyse wiederholter Messungen. n.s.: nicht signifikant; <sup>1</sup> im Vergleich zur Endotoxin-Gruppe; <sup>2</sup> im Vergleich zur Kontrollgruppe

#### 4.1.6 Oxidierte low density Lipoprotein (oxLDL)

Tabelle 7 zeigt die Messergebnisse für den Zeitpunkt Null, nach einer und nach zwei Stunden des bestimmten Gehaltes an oxLDL, angegeben in Nanogramm pro Milliliter (ng/ml). In keiner der Gruppen kam es eine Stunde nach Versuchsbeginn zu einem wesentlichen Ansteigen der oxLDL, im Vergleich mit den Ausgangswerten. Im weiteren Verlauf konnte, ebenfalls in allen Gruppen, ein deutliches Ansteigen der oxidierten low density Lipoproteinkonzentration in Bezug zum Ausgangswert festgestellt werden. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren allerdings nicht nachweisbar ( $p > 0,05$ ).

Tabelle 7 Oxidierte low- density- Lipoproteine (oxLDL) in ng/ml

| Zeit [h]                | 0                       | 1                       | 2                         | p    |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|------|
| Gruppe                  |                         |                         |                           |      |
| Kontrollgruppe          | 73,28<br>(66,73-98,69)  | 83,57<br>(68,58-119,75) | 178,45<br>(126,28-198,85) | n.s. |
| Endotoxin-Gruppe        | 91,98<br>(70,93-111,11) | 73,81<br>(63,49-111,48) | 189,65<br>(133,53-228,43) | n.s. |
| Tempol-Gruppe           | 72,80<br>(65,76-82,75)  | 71,65<br>(65,72-78,52)  | 117,08<br>(98,91-187,73)  | n.s. |
| Endotoxin+Tempol-Gruppe | 91,66<br>(73,04-210,85) | 92,74<br>(71,95-153,46) | 211,29<br>(151,9-337,50)  | n.s. |

*Bestimmung der oxidierten low-density Lipoproteine in Nanogramm pro Milliliter [ng/ml]. Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion. Multivariate nonparametrische Analyse, Ausrichtung an dem 0-Wert als Covariate, angepasst für die Analyse wiederholter Messungen. n.s.: nicht signifikant*

#### 4.1.7 Advanced oxidation protein product (AOPP)

Tabelle 8 zeigt Ergebnisse der zum Zeitpunkt Null, nach einer und nach zwei Stunden bestimmten Messwerte für die AOPP, angegeben in Mikromol pro Liter ( $\mu\text{mol/l}$ ). Unter Ausnahme der Endotoxin-Gruppe, in der es zu einem leichten Ansteigen der AOPP-Konzentration, jedoch waren die Messwerte der anderen Gruppen eine Stunde nach Versuchsbeginn im Vergleich zum Ausgangswert der jeweiligen Gruppe leicht niedriger. Eine Signifikanz bestand nicht. Zwei Stunden nach Versuchsbeginn zeigte sich in allen Gruppen ein deutlicher Anstieg der AOPP-Konzentration, der in der Endotoxin-Tempol-Gruppe am höchsten ausfiel. Allerdings lag auch der Ausgangswert in dieser Gruppe am höchsten. Signifikanz bestand nicht.

Tabelle 8 **Advanced oxidation protein products (AOPP) in  $\mu\text{mol/l}$**

| Zeit [h]                | 0                   | 1                    | 2                      | p    |
|-------------------------|---------------------|----------------------|------------------------|------|
| Gruppe                  |                     |                      |                        |      |
| Kontrollgruppe          | 3,86<br>(0,58-9,96) | 1,63<br>(0,76-6,71)  | 20,06<br>(16,57-23,25) | n.s. |
| Endotoxin-Gruppe        | 2,81<br>(1,75-4,1)  | 3,04<br>(0,76-4,97)  | 22,02<br>(15,69-36,78) | n.s. |
| Tempol-Gruppe           | 4,9<br>(3,35-9,25)  | 2,25<br>(0,76-4,17)  | 19,59<br>(13,25-30,8)  | n.s. |
| Endotoxin+Tempol-Gruppe | 5,27<br>(2,66-8,03) | 4,725<br>(4,17-6,65) | 24,0<br>(14,22-28,13)  | n.s. |

*Bestimmung der advanced oxidation protein products in Mikromol pro Milliliter [ $\mu\text{mol/ml}$ ]. Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion. Multivariate nonparametrische Analyse, Ausrichtung an dem 0- Wert, als Covariate angepasst für die Analyse wiederholter Messungen. n.s.: nicht signifikant*

#### 4.1.8 Antioxidative Kapazität

Die in der Tabelle 9 dargestellten Ergebnisse zeigen die Messergebnisse der antioxidativen Kapazität im Verlauf zum Zeitpunkt Null, nach einer und nach zwei Stunden. Die antioxidative Kapazität veränderte sich bei Messung nach der ersten Stunde nur geringfügig. In der Kontrollgruppe, der Endotoxin-Gruppe und der Tempol-Gruppe zeigte sich eine leichte Reduktion der antioxidativen Kapazität und in der Endotoxin-Tempol-Gruppe ein geringfügiger Anstieg der antioxidativen Kapazität. Zwei Stunden nach Versuchsbeginn sank die antioxidative Kapazität in der Endotoxin-Gruppe und der Endotoxin-Tempol-Gruppe deutlich. Am stärksten zeigte sich diese Abnahme in der Endotoxin-Gruppe. Eine Erniedrigung zeigte sich auch in der Endotoxin-Tempol-Gruppe, jedoch weniger stark ausgeprägt. Kontrollgruppe und Tempol-Gruppe zeigten dann eine Abnahme der antioxidativen Kapazität unter den Ausgangswert. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden nicht festgestellt.

Tabelle 9 **Antioxidativen Kapazität in  $\mu\text{mol/l}$**

| Gruppe                  | Zeit [h] | 0               | 1               | 2               | p    |
|-------------------------|----------|-----------------|-----------------|-----------------|------|
| Kontrollgruppe          |          | 290,95          | 284,8           | 250,7           | n.s. |
|                         |          | (277,82-304,62) | (255,32-302,6)  | (163,95-280,4)  |      |
| Endotoxin-Gruppe        |          | 250,4           | 263,15          | 87,25           | n.s. |
|                         |          | (223,92-302,4)  | (207,75-287,07) | (11,85-235,05)  |      |
| Tempol-Gruppe           |          | 266,55          | 277,85          | 245,65          | n.s. |
|                         |          | (243,62-280,2)  | (238,22-282,77) | (163,5-264,6)   |      |
| Endotoxin+Tempol-Gruppe |          | 272,15          | 260,65          | 180,05          | n.s. |
|                         |          | (253,05-282,07) | (244-265,12)    | (117,57-265,62) |      |

*Bestimmung der antioxidativen Kapazität in Mikromol pro Liter [ $\mu\text{mol/l}$ ]. Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion. Multivariate nonparametrische Analyse, Ausrichtung an dem 0- Wert, als Covariate angepasst für die Analyse wiederholter Messungen. n.s.: nicht signifikant*

#### 4.1.9 Peroxidbestimmung

Das Ergebnis der Peroxidbestimmung zum Zeitpunkt Null, nach einer und nach zwei Stunden ist in Tabelle 10 dargestellt. Die Konzentration der Peroxide reduzieren sich sowohl eine Stunde nach Versuchsbeginn, als auch im weiteren Versuchsverlauf der zweiten Stunde in allen Gruppen, ohne eine Signifikanz aufzuweisen. Signifikante Unterschiede konnten zwischen den einzelnen Gruppen nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 10 **Kontrollen zur Peroxidbestimmung in  $\mu\text{mol/l}$**

| Zeit [h]                | 0                       | 1                      | 2                      | p    |
|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------|
| Gruppe                  |                         |                        |                        |      |
| Kontrollgruppe          | 28,89<br>(17,47-33,42)  | 26,91<br>(14,86-30,38) | 21,76<br>(16,43-28,83) | n.s. |
| Endotoxin-Gruppe        | 26,53<br>(18,85-31,00)  | 22,44<br>(13,02-29,82) | 18,47<br>(12,03-24,67) | n.s. |
| Tempol-Gruppe           | 23,72<br>(11,22-28,912) | 21,83<br>(8,57-27,97)  | 19,17<br>(12,02-27,2)  | n.s. |
| Endotoxin+Tempol-Gruppe | 26,90<br>(24,24-28,85)  | 25,30<br>(22,36-28,67) | 23,12<br>(21,18-24,01) | n.s. |

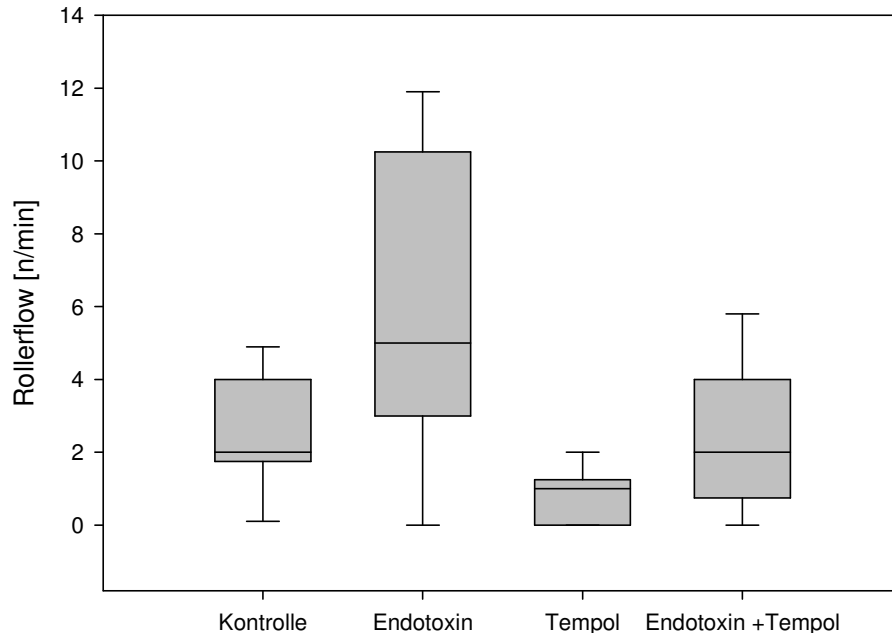
*Bestimmung der Kontrollen zur Peroxidbestimmung in Mikromol pro Liter [ $\mu\text{mol/l}$ ]. Messungen zum Zeitpunkt 0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Endotoxin-Infusion. Multivariate nonparametrische Analyse, Ausrichtung an dem 0-Wert als Covariate, angepasst für die Analyse wiederholter Messungen, n.s.: nicht signifikant*

## 4.2 Intravitalmikroskopie

### 4.2.1 Temporär adhärenente Leukozyten

In der Abbildung 4 ist die Anzahl der temporär an der Gefäßwand adhärenenten Leukozyten dargestellt. In der Kontrollgruppe konnten im Median 2 Roller/ Minute (2-4) verzeichnet werden. In der Endotoxin-Gruppe wurde eine höhere Anzahl im Median von 5 temporär adhärenenten Leukozyten in der Minute (3-10/ min) beobachtet. Ein statistischer Unterschied zu anderen Gruppen lag nicht vor. In der Tempol-Gruppe waren im Median 1 Leukozyt (1- 2) zu verzeichnen und bei der Endotoxin-Tempol-Gruppe im Median 2 Roller (1- 4).

Abbildung 6 Temporär adhärenente Leukozyten (Roller) in den submucösen Venolen in n/min eine Stunde nach Beginn der Endotoxininfusion

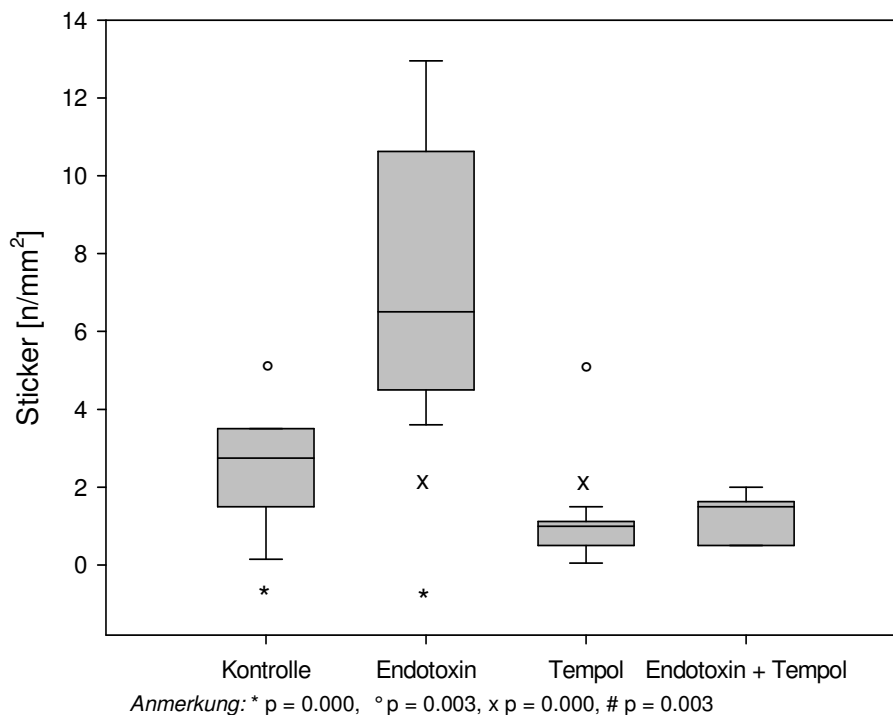


*Bestimmung der temporär adhärenenten Leukozyten in Anzahl pro Minute [n/min] Messung 1 Stunde nach Beginn der Endotoxininfusion. Nonparametrische Analyse*

## 4.2.2 Adhärenente Leukozyten

In Abbildung 5 ist die Anzahl der fest an der Gefäßwand adhärenente Leukozyten dargestellt. In der Kontrollgruppe wurden im Median 3/mm<sup>2</sup> (1- 4/ mm<sup>2</sup>) gezählt. Signifikanten Unterschied waren zwischen der Endotoxin- Gruppe, im Median 6/mm<sup>2</sup> (4-10/ mm<sup>2</sup>) zur Kontrollgruppe zu beobachten. Auch Vergleich der Tempol-Gruppe (1/mm<sup>2</sup> (0-1 mm<sup>2</sup>)) mit der Kontrollgruppe und der Endotoxin-Gruppe wies statistische Unterschiede auf. Zwischen der Endotoxin-Gruppe und der Endotoxin-Tempol-Gruppe bestand ein signifikanter Unterschied.

Abbildung 7 **Fest adhärenente Leukozyten (Sticker) in den submucösen Venolen in n/mm<sup>2</sup> eine Stunde nach Beginn der Endotoxininfusion**

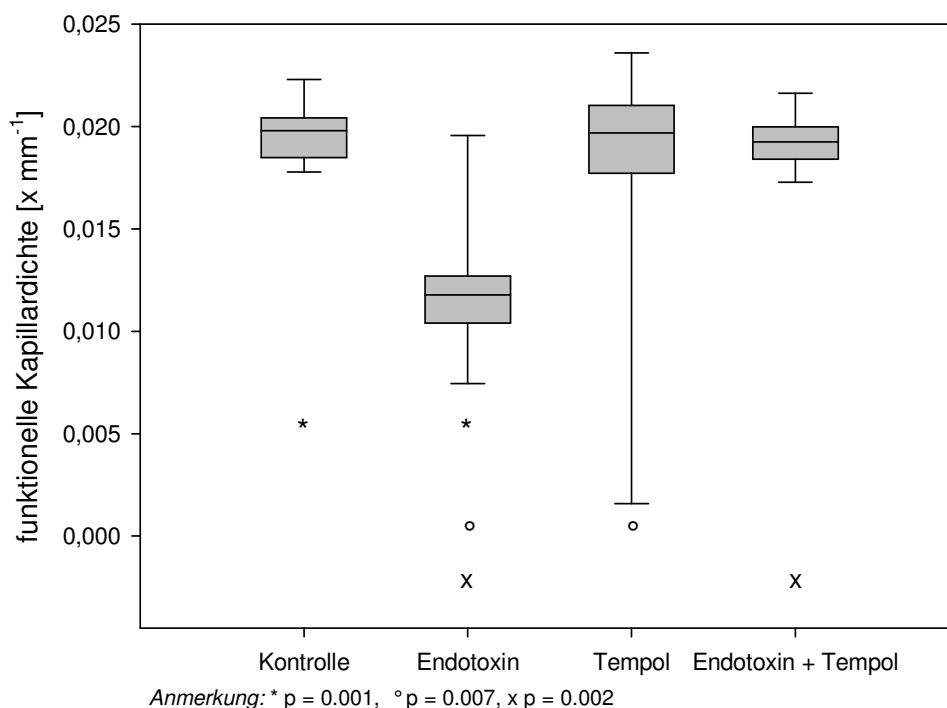


Bestimmung der fest adhärenente Leukozyten in Anzahl der Sticker pro Quadratmillimeter [n/mm<sup>2</sup>].  
Messung 1 Stunde nach Beginn der Endotoxin- Infusion. Nonparametrische Analyse

### 4.2.3 Funktionelle Kapillardichte

Im Median betrug die funktionelle Kapillardichte in der Kontrollgruppe  $198 \text{ mm}^{-1}$  (185-204), in der Endotoxin-Gruppe  $118 \text{ mm}^{-1}$  (104-127  $\text{mm}^{-1}$ ). Ein paarweiser Vergleich der Kontroll-Gruppe und der Endotoxin- Gruppe zeigt einen Unterschied. Weitere signifikante Unterschiede bestanden zwischen der Endotoxin-Gruppe und der Tempol-Gruppe, Median  $197 \text{ mm}^{-1}$  (177-210  $\text{mm}^{-1}$ ). Auch im Vergleich der Endotoxin-Tempol-Gruppe, Median  $192 \text{ mm}^{-1}$  (184-199  $\text{mm}^{-1}$ ) waren signifikante Unterschiede zur Endotoxin-Gruppe nachzuweisen. Unterschiede zwischen der Tempol-Gruppe und der Endotoxin-Tempol-Gruppe waren nicht signifikant.

Abbildung 8 Funktionelle Kapillardichte in  $x \text{ mm}^{-1}$  gemessen in der Lamina muscularis eine Stunde nach Beginn der Endotoxininfusion



Bestimmung der funktionellen Kapillardichte (FCD) in  $x \text{ mm}^{-1}$ . Messungen zum Zeitpunkt 1 Stunde nach Beginn der Endotoxin-Infusion. Nonparametrische Analyse



## **5 Diskussion**

### **5.1 Hämodynamik**

Pathognomonisch für das Krankheitsbild der Sepsis ist das Auftreten hämodynamischer Veränderungen. Wissenschaftliche Untersuchungen stellen besondere Anforderungen an das hämodynamische Profil insbesondere bei Untersuchungen von Prozessen, die die Mikrozirkulation betreffen. Es sollte eine eindeutige Abgrenzung zu systemischen Veränderungen beispielsweise der systemischen Hypotension möglich sein (19, 163).

Die intestinale Mikrozirkulation stellt einen bedeutenden Faktor in der Pathogenese der endotoxininduzierten Sepsissymptome dar (107, 109, 131) In einer Untersuchung des intestinalen, mikrovaskulären Blutflusses wurde ein Absinken sowohl zwei als auch vier Stunden nach Endotoxingabe beobachtet. Bei Kontrollen mit systemischer Clonidingabe und bei sympathektomierten Tieren nahm ebenfalls der intestinale, mikrovaskuläre Blutfluss ab (164). Eine signifikante Abnahme des intestinalen, mikrovaskulären Blutflusses, gemessen mittels Dopplerflowmetrie im terminalen Ileum, konnten auch Lehmann et al. nachweisen. In der von ihm durchgeführten Untersuchung konnte allerdings kein Effekt durch die Gabe von Iloprost im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (68). Der direkte Einfluss des arteriellen Blutdruckes auf die Flussgeschwindigkeit führt zu veränderten Scherkräften und damit zu einem veränderten Verhalten der Leukozytenadhärenz (165). Ein Ausschluss von systemischen Hypotonien zur adäquaten Beurteilung der Leukozyten-Endothel-Interaktion erscheint notwendig und wurde durch entsprechende Volumensubstitution, die zu weitgehend normotensiven Blutdruckwerten führte, Rechnung getragen. Zu berücksichtigen war auch die Dosis der intravenös applizierten Menge an Endotoxin. Lehmann et al. konnten zeigen, dass bei Konzentrationsunterschieden vom 5 mg und 20 mg intravenös appliziertem Endotoxin nach einer Stunde die Blutdruckwerte der Versuchsreihe mit 20 mg etwas niedriger lagen als bei der mit 5 mg. In der vorliegenden Studie wurde eine Konzentration von 10 mg/kg KG Endotoxin verwandt. Im weiteren Verlauf waren keine signifikanten Unterschiede mehr nachweisbar (87, 166).

#### **5.1.1 Mittlerer arterieller Blutdruck**

Zu Beginn eines septischen Geschehens liegt aufgrund eines erniedrigten peripheren Widerstandes eine normotensive, hyperdynamische Kreislaufsituation vor (167). Im weiteren Verlauf der Sepsis und im septischen Schock kommt es zu einer

behandlungspflichtigen Hypotension bei meist hyperdynamer Kreislaufsituation (19, 168). Bei weiterer Progredienz geht diese in eine hypodyname Situation über (39). Vasodilatatorisch wirkende Sepsismediatoren wie TNF- $\alpha$ , Stickstoffmonoxid und Interleukin-1 stehen den endogen vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen wie Noradrenalin, Vasopressin und Leukotrienen in der arteriellen Endstrombahn entgegen (168, 169). In der vorliegenden Untersuchung zeigten sich im Verlauf geringfügige nicht signifikante Schwankungen des mittleren arteriellen Blutdruckes. Nach einem initialen Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes nach einer Stunde, setzte sich diese Tendenz nur in der ausschließlich mit LPS-Gruppe behandelten Gruppe weiter fort. In allen anderen Gruppen zeigte sich eine Stabilisierung der Blutdruckwerte. In der Kontrollgruppe lag der mittlere arterielle Blutdruck konstant höher. Unter dem Einfluss von Tempol wurde keine wesentliche Veränderung der Hämodynamik beobachtet. Die Stabilität im Hinblick auf die Makrohämodynamik erlaubt die Ergebnisse der Leukozyten-Endothel-Interaktion, im Rahmen der Intravitalmikroskopie, unter den Versuchsgruppen zu vergleichen.

Der Einfluss von Antioxidantien wird in der Literatur allerdings kontrovers diskutiert. Unter dem Einfluss von Tirilazad-Mesylat ergab sich ein ähnliches Bild im Blutdruckverhalten, wie in unseren Untersuchungen ohne eine wesentliche Veränderung der Hämodynamik (170). Einen positiven Einfluss von Tirilazad-Mesylat konnten Zhang et al. an Hunden mit Endotoxinämie feststellen (171). Eine endotoxininduzierte Hypotension und eine transiente Tachykardie wurde nicht beeinflusst durch Gabe von Alpha-Tocopherol, reduziertem Glutathion, Allopurinol oder der Superoxidismutase, allein oder in Kombination (172). Onuma et al. konnten einen blutdrucksenkenden Effekt von Tempol feststellen. Bei oral verabreichtem Tempol sank der mittlere arterielle Blutdruck, bei gleichzeitigem Ansteigen des medullären Blutflusses in der Niere der untersuchten Ratten, und einem Ansteigen des NO als endogenem Vasodilatator (173). Über die Wirkung der hämodynamischen Effekte von Tempol ist auch das verminderte Auftreten von Reperfusionarrhythmien erklärbar (174).

### **5.1.2 Herzfrequenz**

Anhand der Definition der Sepsis bzw. des SIRS ist ein Anstieg der Herzfrequenz beim Menschen über 90 Schläge/Minute zu beobachten (19). Der Herzfrequenzanstieg dient bei der Versuchsdurchführung einer induzierten Sepsis neben dem Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes als Effektivitätsparameter. In der vorliegenden Untersuchung war ein Herzfrequenzanstieg in den Gruppen mit Gabe von Lipopolysaccharid zu beobachten. Initial lag die Herzfrequenz in der Endotoxin-Gruppe bei 368 /min und stieg im Verlauf der zweiten Stunde auf 436/min an. In der Kontrollgruppe war die Herzfrequenz vergleichsweise stabil über den

gesamten Untersuchungszeitraum. Durch Xu et al. wurde bei Gabe von 5 mg/kg KG Lipopolysaccharid eine erhöhte Herzfrequenz und eine Zunahme des Herzminutenvolumens im Rahmen einer bestehenden hyperdynamen Kreislaufsituation nachgewiesen (121). Bei Gabe von höheren Dosen LPS (40 mg Endotoxin/ kg Körpergewicht) ist eine hypodynamische Kreislaufsituation zu beobachten, ebenfalls mit deutlichen Anstieg der Herzfrequenz (168). Ein messbarer Einfluss von Tempol auf die Herzfrequenz konnte in unserer Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Diese in der Literatur vergleichbare Beobachtung lässt diesen Parameter als Kontrollkriterium für die Effektivität der Sepsis zu.

### **5.1.3 Atemfrequenz**

Wie auch das Kreislaufsystem unterliegt das Atmungssystem in der Sepsis vielfältigen Einflüssen. Zu einem der häufigsten Organversagen bei Endotoxämie zählt die respiratorische Insuffizienz (39). In der Definition der Sepsis findet sich als frühes klinisches Zeichen die Tachypnoe (19). Den Störungen der pulmonalen Perfusion und somit des Gasaustausches muss eine vermehrte Atemarbeit entgegenwirken. In dem vorliegenden Versuch findet sich nach 2 Stunden ein signifikanter Unterschied der Atemfrequenz zwischen der Kontrollgruppe und den LPS-Gruppen, welcher mit der Induktion einer Sepsis erklärt werden kann. In den Gruppen die ausschließlich oder zusätzlich Tempol erhielten stieg die Atemfrequenz zwar leicht an, zeigt jedoch keine Signifikanz. Dieses kann durchaus auf einen positiven Effekt von Tempol zurückgeführt werden kann.

### **5.1.4 Einfluss von Tempol**

Nachweisbare hämodynamische Effekte für das Superoxiddismutasemimetikum Tempol konnten in mehrfacher Hinsicht experimentell belegt werden. Eine blutdrucksenkende Wirkung nach oraler Applikation wurde durch Onuma et al nachgewiesen (173). Gou et al. zeigte bei reperfusionsbedingten Ischämien eine Abnahme der Arrhythmien unter dem Einfluss von Tempol, basierend auf der Annahme eines verminderten myokardialen Sauerstoffverbrauches, ebenso eine Abnahme des mittleren arteriellen Blutdruckes und der Herzfrequenz (174). Einen positiven Einfluss zeigte Tempol auch auf die Atemfrequenz in dieser Untersuchung. Im Vergleich der Kontrolltiere mit Endotoxin behandelten Tieren nahm diese nicht zu.

## 5.2 Laborparameter

Das komplexe Geschehen der Sepsis spiegelt sich auch in den vielen, den oxidativen Stress beschreibenden Laborwerten wieder, die einzeln für sich keine Aussage zur Prognose und zum Verlauf erlauben, sich jedoch in der Summe mit dem klinischem Bild eignen, den Krankheitsverlauf zu beschreiben und zu bewerten (175).

Aufgrund fehlender signifikanter Unterschiede innerhalb der untersuchten Gruppen in Bezug auf die Laborparameter kann man sagen, dass die zur Untersuchung gewählten Parameter nicht geeignet waren den intravitalmikroskopisch nachgewiesenen Effekt von Tempol labordiagnostisch nachzuvollziehen. Offen bleibt, ob nach längerer Untersuchungszeit, als in der vorliegenden Arbeit, ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden könnte. Möglich ist auch, dass wie in anderen Studien gezeigt andere Laborparameter wie Plasma-NO oder Interleukin-1 $\beta$  eine höhere Aussagekraft bezüglich der Tempolwirkung haben (156).

### 5.2.1 Leukozytenzahl

Marker der Sepsis stellen eine Leukozytopenie (<4000/ml) oder eine Leukozytose (12000/ml) dar. In vorangegangenen Studien konnte bereits bei Induktion einer Sepsis eine anfängliche Leukozytopenie nachgewiesen werden (48, 176, 177). Als Ursache für die anfängliche Leukozytopenie wird eine verstärkte Leukozytenadhärenz in der mikrovaskulären Endstrombahn der Organe und eine Migration ins Gewebe angenommen (166). Durch Aktivierung der Stammzellen im Knochenmark kommt es später zu einer Ausschüttung reifer Granulozyten in den bereits zirkulierenden Leukozytenpool (75). In der vorliegenden Untersuchung zeigt sich in der Kontrollgruppe nach der ersten Stunde eine Leukopenie, die den Verbrauch der Leukozyten reflektiert und im Rahmen der Traumatisierung durch den chirurgischen Eingriff und der damit initiierten Immunreaktion erklärbar ist. Ein signifikanter Anstieg der Leukozyten in der Kontrollgruppe im weiteren Verlauf ist auf die Aktivierung der Stammzellen im Knochenmark zurückzuführen (75). Experimentell kam es durch eine kombinierte orale Behandlung mit alpha-lipoid-acid und Glutamine zu einer zahlenmäßigen Steigerung der intestinalen und systemisch vorhandenen B-Lymphozyten bei Mäusen, denen intraperitoneal eine Sepsis induziert wurde (178). Eine Abnahme der Leukozytenzahlen im peripheren Blut korrelierte mit einer Zunahme der adhärenenten Leukozyten (179). Eine relativ große Schwankungsbreite der Leukozytenzahlen innerhalb eines Messzeitpunktes und kein Nachweis einer Signifikanz im Verlauf zeigen, dass sich auch unter Einfluss inflammatorischer

Faktoren ein Gleichgewicht zwischen Leukozytenbildung, zirkulierenden Leukozyten und adhärennten Leukozyten einstellt.

### **5.2.2 Malondialdehyd**

Als Antwort auf oxidativen Stress und der damit induzierten Lipidoxidation können in der frühen Phase einer Sepsis die höchsten Malondialdehydkonzentrationen gemessen werden. Die Konzentrationen von Metaboliten des Fettstoffwechsels korrelieren mit den Produkten der Arachidonsäureperoxidation. In dieser Studie erfolgte eine Bestimmung der Werte 6, 12, 24, 72 Stunden nach Induktion einer Peritonitis durch Zökumligatur und Punktion (CLP) (180).

Giamarellos-Bourboulis et al. wiesen nach, dass nicht immer das Vorhandensein pathogener Keime, sondern bereits entzündliches Geschehen im Rahmen einer Gastritis die Lipidperoxidation aktiviert und damit zur Zunahme der Malondialdehydkonzentration führt. Er untersuchte in seiner Studie die Auswirkungen von *Helicobacter pylori* (181).

Bei Patienten, die im Rahmen einer Sepsis erhöhtem oxidativen Stress ausgesetzt waren, konnte ein Ansteigen der Serumspiegel für Malondialdehyd nachgewiesen werden (57). Gleichzeitig konnte eine ungünstige Prognose im Krankheitsverlauf bei kritisch Kranken mit erhöhtem Malondialdehydserumspiegel festgestellt werden (58). Koksäl et al. konnten in einem Rattenmodell bei induzierter Sepsis zeigen, dass ein Ansteigen des Serumspiegels für Malondialdehyd mit den Gewebekonzentrationen in Herz, Lunge, Leber und Niere positiv korrelieren (182). Ein erhöhter Malondialdehydspiegel fand sich auch in einer Studie, die den Einfluss einer hyperbaren Sauerstoffbehandlung bei Vorliegen einer Nierenfunktionsstörung untersuchte (183). Ein geschlechterspezifischer Unterschied der Malondialdehydkonzentration im Plasma zwischen männlichen und weiblichen Tieren wurde nicht nachgewiesen (184).

Bei Behandlung mit N-Acetylcystein wurde in einer experimentellen Studie mit einer LPS induzierten Sepsis im Vergleich zur unbehandelten Gruppe ein Absinken der Malondialdehydkonzentration beobachtet (170, 185). Das Ansteigen der Serumkonzentration von Malondialdehyd konnte bereits 30 min nach Sepsisinduktion beobachtet werden und war im weiteren Verlauf bis 150 min nach Untersuchungsbeginn immer höher als in der Vergleichsgruppe (186). C. Lehmann et al. konnten ebenfalls einen Anstieg des Malondialdehyd bereits nach 15 min nachweisen (187).

Entsprechend dieser Arbeiten kann bei einer Blutentnahme zum Zeitpunkt 0, nach einer und nach zwei Stunden davon ausgegangen werden, dass mögliche Anstiege des Malondialdehyds erfasst werden.

In der vorliegenden Untersuchung wird ein Anstieg von Malondialdehyd in der Kontrollgruppe und der Endotoxin-Tempol-Gruppe beobachtet. Eine leichte Abnahme in der mit Tempol behandelten Gruppe, der jedoch nicht signifikant ist, lässt eine antioxidative Potenz erahnen.

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

Unter oxidativem Stress wird LDL in oxLDL umgewandelt, verliert seine Bindungsfähigkeit und zeigt daraufhin zytotoxische Wirkung. Monozyten werden zu Makrophagen umgewandelt und binden mittels des Scavenger-Rezeptors oxidiertes LDL. Eine fehlende Hemmung des Rezeptors führt zu einer Anhäufung von intrazellulärem Cholesterin, durch welches die Makrophagen zu Schaumzellen werden und eine Endothelschädigung, beispielsweise als arteriosklerotische Plaques bewirken.

Mehrfach konnte in der Vergangenheit in invitro-Versuchen die zytotoxische Wirkung von oxLDL auf Makrophagen und an humanen Endothelzellen gezeigt werden (188, 189). Durch Wagner et al. wurde eine gesteigerte Apoptoserate bei kultivierten humanen Makrophagen unter Einfluss von oxLDL nachgewiesen. Begleitend konnte die Induktion einer mitochondrialen MnSOD Expression nachgewiesen werden (190). In einer weiteren Studie zeigt oxLDL konzentrationsabhängig einen dualen Effekt von Proliferation (5-10 µg/ml) und Apoptose (50 bis 300 µg/ml) in einer Untersuchung an kultivierten humanen endothelialen Umbilikalvenenzellen. Ein antioxidativer Effekt im Hinblick auf die Superoxiddismutase konnte nachgewiesen werden. In einer Studie von Galle et al. konnte weiterhin durch oxLDL eine dosisabhängige Suppression in Bezug auf die Expression des antiapoptotischen Gens A 20 nachgewiesen werden (191). Tierexperimentell wurde ein inhibitorischer Effekt durch Gabe von einem unspezifischen nichtsteroidalen Antiphlogistikum (Diclofenac) auf oxLDL nachgewiesen (192). Ebenfalls wurde eine Reduktion des oxLDL nach Gabe von N-Azetylcystein im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (193). In klinischen Studien wurde bei herztransplantierten Patienten ein positiver antioxidativer Effekt durch Gabe von Vitamin C und E auf die Progression einer koronaren endothelialen Dysfunktion nachgewiesen (194). Gaut et al. zeigte zwar, dass eine direkt protektive Wirkung durch Gabe von Vitamin C ein Fortschreiten der Lipidperoxidation unter einer akuten Infektion nicht verhindert. Auch Munteanu et al. gehen nicht von einer alleinigen Wirkung bei Vitamin E aus. Im Vordergrund stehen eher die spezifische Interaktionen verschiedener Enzyme (Superoxiddismutase, 5-Lipoxygenase, NADPH-oxygenase, Phospholipase) und der Modulation der Genexpression als positiver Einfluss einer antioxidativen Therapie mit Vitamin C und E unter dem Aspekt auf die Entstehung der Atherosklerose (195, 196).

Unter Anwendung von Tempol kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem geringeren Ansteigen des oxLDL, ohne Signifikanz zu zeigen. Am höchsten war jedoch der Gehalt an oxLDL in der Tempol-Endotoxin-Gruppe, weshalb anzunehmen ist, dass Tempol keinen Einfluss auf die Lipidperoxidation hat. Der starke Anstieg nach 2 Stunden weist möglicherweise auf das zusätzliche Trauma der Laparatomie hin.

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

Bereits 1996 wurden die AOPP in einer spektrophotometrischen Untersuchung in erhöhter Konzentration im Blutplasma bei urämischen Patienten nachgewiesen. Die Plasmaspiegel der AOPP waren am höchsten bei Patienten, die eine Hämodialyse erhielten, gefolgt von der Patientengruppe mit einer Peritonealdialyse und der Patientengruppe, die eine chronische Niereninsuffizienz hatte, jedoch nicht dialysiert wurde (197). In einer klinischen Studie mit Vergleich von gesunden Probanden und kritisch Kranken (Sepsis, Reperfusionssyndrom, Herzversagen) konnte gezeigt werden, dass die AOPP als Referenzkriterium und Monitoring des oxidativen Stress einen bedeutenden Stellenwert haben (66). Eine erhöhte AOPP-Konzentration induziert eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Sekretion und initiiert eine NADPH-Oxidase vermittelte gesteigerte ROS-Produktion und letztlich eine endotheliale Dysfunktion auf Grundlage einer gestörten Leukozytenfunktion (68). Kayali et al. wiesen einen geschlechtsspezifischen Unterschied nach. Die Serumkonzentrationen für AOPP lagen bei männlichen Ratten höher als bei weiblichen (184). Einen weiteren Einfluss auf die Serumkonzentration der AOPP hat Übergewicht, wie Atabek et al. in einer Studie an übergewichtigen, insulinresistenten Jugendlichen zeigten. In dieser Gruppe lagen die AOPP-Werte signifikant höher als in der Vergleichsgruppe junger gesunder Probanden (198).

Um den Kriterien wie Gewicht, Alter, Geschlecht und dem Vorliegen von chronischen Erkrankungen gerecht zu werden, wurden in dieser Studie ausschließlich junge männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von  $210 \pm 50$ g untersucht. In allen Gruppen zeigt sich die AOPP eine Stunde nach Untersuchungsbeginn unverändert zum Ausgangswert. In der zweiten Stunde nach Beginn (eine Stunde nach Laparatomie) wird ein Ansteigen der AOPP-Konzentration vor allem in den mit Endotoxin behandelten Gruppen am deutlichsten. Es konnten keine Signifikanz nachgewiesen werden. Die Erhöhung vor allem in der zweiten Stunde ist möglicherweise auf das chirurgische Trauma und dem damit verbundenen Ansteigen des oxidativen Stresses im Rahmen der Laparatomie zurückzuführen. In den mit Tempol behandelten Gruppen ist dieses Ansteigen im Verhältnis etwas geringer. Eine Signifikanz wurde jedoch nicht nachgewiesen. Es zeigt sich aber durchaus

einen Effekt auf die Proteinoxidation. Offen bleibt, ob sich bei längerer Versuchsdauer der Effekt deutlicher dargestellt hätte.

### **5.2.5 Antioxidative Kapazität (ANOX)**

Die antioxidative Kapazität beschreibt die Gesamtheit aller im Blutplasma verfügbaren Substanzen, Reaktionsprodukte, die durch oxidativen Stress entstehen zu beseitigen. Es werden enzymatische Schutzsysteme, wie das der Superoxiddismutase und Katalase, als auch nichtenzymatische, wie antioxidativ wirkende Vitamine C und E, oder auch antioxidativ wirkende Substanzen (Tempol, Acetylcystein, Gluthation) erfasst. Im Hinblick auf die Schwankungsbreite und die ungenügende Spezifität kann dieser Parameter nur im Zusammenhang mit anderen Werten, wie oxLDL, MDA oder AOPP eine Aussage im Hinblick auf die Prognose der Erkrankung geben (175). Unter ischämischen Bedingungen konnte eine Zunahme der antioxidativen Kapazität nachgewiesen werden, die jedoch nicht zu einer Verminderung der Lipidoxidation führte (199). Ein positiver Effekt in Bezug auf die renale Dysfunktion im Rahmen einer Sepsis konnte unter einer hyperbaren Sauerstoffbehandlung beobachtet werden (183). Durch eine adjuvante intravenöse Selentherapie bei Sepsis oder kritisch Kranken wurde eine Senkung der Mortalität (28 Tage Überlebensrate) auf 42,4% erreicht, im Vergleich zur Kontrollgruppe, die Placebo erhielt, und bei 56,7% lag (200).

In allen Gruppen dieser Untersuchung kann ein Absinken der antioxidativen Kapazität beobachtet werden. Die Tiere der LPS-Tempol-Gruppe zeigten im Vergleich zur Endotoxin-Gruppe einen verminderten Abfall der antioxidativen Kapazität. Dieser erwies sich als nicht signifikant. Nicht auszuschließen ist, dass sich diese Tendenz bei längerem Versuchsablauf fortsetzt hätte und eine Signifikanz deutlicher geworden wäre.

### **5.2.6 Peroxidbestimmung**

Ein Ansteigen der Lipidperoxidation konnte von Takeda et al. in Organen wie Lunge und Niere nachgewiesen werden, jedoch kam es in dieser Untersuchung nicht zu einem Anstieg im Blutplasma (201). Aufgrund der antioxidativen und antiinflammatorischen Wirkung konnte unter Gabe von Propofol bei induzierter Sepsis in mehreren tierexperimentellen Versuchen eine Abnahme der Lipidoxidation nachgewiesen werden (202-204). Daher wurde für die vorliegende Untersuchung die Gabe von Pentobarbital für die Narkose der Tiere gewählt. Unter den Bedingungen einer Ischämie wurde ein Ansteigen der Lipidperoxidation und der damit folgenden gesteigerten intestinalen Mukosapermeabilität nachgewiesen. Außerdem zeigte sich ein erhöhter Plasmaspiegel und eine Zunahme des Peroxidgehaltes im Lebergewebe (205, 206). Durch den Einsatz verschiedener antioxidativer Substanzen wie



Melatonin und N-Azetylcystein wird die Lipidperoxidation nachweislich vermindert (207, 208).

In dieser Untersuchung sank der Lipidperoxidgehalt im Plasma in allen untersuchten Gruppen, was möglicherweise durch eine Verschiebung zugunsten der AOPP zustande kommt. Laborchemisch ist ein Fehler unwahrscheinlich.

## **5.3 Intravitalmikroskopie**

Die vorliegende Untersuchung bietet eine gute Reproduzierbarkeit zur Beurteilung der mikrohämodynamischen Situation der Endstrombahn unter charakteristischen klinischen Konstellationen ähnlich einer Sepsis. Durch sie ist es möglich dynamische Prozesse in der Endstrombahn wie die Leukozyten-Endothel-Interaktion und die Kapillarperfusion zu beurteilen. Mittelpunkt dieser Untersuchung war die Beurteilung des Einflusses von Tempol auf die intestinale Mikrozirkulation als zentralem Geschehen im Hinblick auf das septische Multiorganversagen.

### **5.3.1 Leukozytenadhärenz**

Eine bei der Endotoxinämie auftretende Adhärenz der Leukozyten stellt eine mehrstufige Kaskade dar. In deren Beginn steht eine Margination der Leukozyten aus der Blutstrommitte. Als Folge kommt es zu einer temporären Adhärenz am Gefäßendothel, dem so genannten Leukozytenrolling (75, 85, 86). Eine feste Adhärenz der Leukozyten am Gefäßendothel stellt das Leukozytensticking dar. Durch Integrine vermittelt haften die Leukozyten am Endothel und setzen durch ihre Aktivierung verschiedene Mediatoren frei, die zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität führen und weitere Kaskadensysteme aktivieren (88-90).

#### **5.3.1.1 Temporär adhärente Leukozyten (Roller)**

In dieser Untersuchung zeigte sich zwischen den einzelnen Gruppen kein nachweisbarer Unterschied im Hinblick auf die Anzahl der temporär adhärenen Leukozyten am Gefäßendothel. Der Roller-flow definiert sich durch die Anzahl der passierenden Leukozyten in einem ausgewählten Gefäß im definierten Beobachtungszeitraum.

Beim Leukozytenrolling handelt es sich um einen physiologischen Prozess, der je nach Gewebeart bis zu 45% der Gesamtleukozyten betragen kann (75). Bei non-invasiven Versuchen an der Haut von Ratten konnten im Median 85% Granulozyten als temporär adhärenen Leukozyten nachgewiesen werden (84). Die transendotheliale Leukozytenmigration zeigt die Bereitschaft einer jederzeit möglichen Aktivierung des Immunsystems (209). Ein Ansteigen bei entzündlichen Veränderungen, wie beispielsweise im Rahmen einer Sepsis führt zu einem Ansteigen der Roller (210). Nicht unwesentlich stellt sich der Einfluss verwendeter Anästhetika dar. Unter dem, auch in dieser Untersuchung verwandten Pentobarbital, konnte kein Ansteigen der temporär adhärenen Leukozyten nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu einer Untersuchung von Janssen et al. mit Fentanyl, bei dem es

zum Ansteigen der Roller kam (211). Eine Verringerung der Roller-Anzahl wurde durch Schmidt et al. unter Ketamin beschrieben (53).

Einen wesentlichen Einfluss auf die vorliegende Untersuchung stellt die Gewebetraumatisierung dar. Sowohl die Laparatomie, als auch die Auslagerung des Darmes, der mit entsprechendem Flüssigkeitsverlust verbunden ist, sind bedeutsam. Weiterhin stellt auch die Benutzung von Fluoreszenzlicht während der Untersuchung eine Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse dar, da diese eine Aktivierung von Leukozyten zur Folge hat. Bei jeglicher Gewebebeeinträchtigung kommt es zu einem spontanen Ansteigen der Roller. Daher muss dies in die Interpretation der Ergebnisse miteinbezogen werden. Fiebig et al. konnte an einem Kaninchenmodell nachweisen, dass nach einer Auslagerungszeit des Darmes von 1 bis 5 Minuten bereits eine Anzahl von 8 Rollern (Kontrollgruppe 4 Roller) nachweisbar war, die im Verlauf der Untersuchung nach 30 Minuten auf 24 (Kontrollgruppe 14 Roller) anstieg (212). In einer Studie bei deren Beginn die Mikroskopie 15 Minuten nach Auslagerung des Darmes durchgeführt wurde, lag die Anzahl der Roller mit durchschnittlich 7 Rollern pro Minute niedriger. Die Anzahl blieb über den gesamten untersuchten Zeitraum konstant (213). Ein direkte Vergleichbarkeit ergibt sich zu der vorliegenden Arbeit jedoch nicht, da in dieser Studie zu drei Zeitpunkten (0, 1 und 2 Stunden nach Beginn der Lipopolysaccharidinfusion) eine intravitalmikroskopische Untersuchung durchgeführt wurde und eine stärkere Gewebetraumatisierung durch eine längere Auslagerungszeit, auftretende Gewebeaustrocknung und wiederholte längere Einwirkung von Fluoreszenzlicht während der Mikroskopie angenommen werden muss. Es wurde ein Mittelwert ermittelt und die Zahl der temporär adhärenenten Leukozyten wies eine Konstanz über den Zeitverlauf auf. Im Gegensatz dazu konnte Schmidt et al. in seinen Untersuchungen eine Abnahme der Roller zugunsten der Sticker nach Endotoxininfusion beobachten (214). Bei anderen Untersuchungen konnte eine Zunahme der Roller in intestinalen Venen nachgewiesen werden (215, 216). In der vorliegenden Untersuchung wurden aufgrund der kleinen Gruppengröße und der damit vermutlich nicht gegebenen Normalverteilung die Angabe in Median und Perzentilen gewählt. Die Werte der Kontrollgruppe lagen bei 2 Roller/Minute. In der Endotoxingruppe zeigt sich eine deutlich erhöhte Anzahl mit 5 Roller/Minute. Eine Signifikanz konnte nicht nachgewiesen werden. Diese relativ geringe Anzahl kann in der Kontrollgruppe möglicherweise auf die Ruhezeit zwischen Versuchsbeginn, Laparatomie und dem Zeitpunkt der Mikroskopie zurückgeführt werden. Durch die einmalig durchgeführte Intravitalmikroskopie wurde ebenfalls der Einfluss einer zusätzlichen Gewebetraumatisierung minimal gehalten. In dieser Untersuchung konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe, der Tempol-Gruppe und der Gruppe die Tempol und Endotoxin erhielt beschrieben werden. Ein deutlicher

Unterschied zeigte sich zur Gruppe, die Endotoxin erhielt, mit 5 temporär adhärenen Leukozyten in der Minute. Das lässt möglicherweise die Tendenz der Wirkung von Tempol erkennen, die Zunahme des Rollerflows zu reduzieren.

#### 5.3.1.2 Fest adhärenente Leukozyten (Sticker)

Bezüglich der fest adhärenen Leukozyten konnte in dieser Untersuchung ein Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der LPS-Gruppe gezeigt werden. Signifikante Unterschiede bestanden auch zwischen der Tempol- Gruppe und der Kontrollgruppe, der Tempol-Gruppe und der Endotoxin-Gruppe und der Endotoxin-Gruppe und der Endotoxin-Tempol-Gruppe. Per Definition handelt es sich bei adhärenen Leukozyten (Sticker) um die im Beobachtungszeitraum von 30 Sekunden am Endothel haftenden Leukozyten (88).

Ein Ansteigen der Sticker unter experimenteller Endotoxämie konnte in verschiedenen Studien nachgewiesen werden (98, 170, 217). Lehmann et al. fanden bei einem Mikroskopiezeitpunkt von zwei Stunden nach Infusionsbeginn von 5 mg/kg/KG LPS in der Kontrollgruppe 60 Sticker/mm<sup>2</sup> und in der Endotoxingruppe 237/mm<sup>2</sup> Sticker (98). Korose et al. beobachtete in mesenterialen Venolen in der Kontrollgruppe bei Ratten mit induzierter Endotoxinämie (2 mg/kg/h) 12 Sticker /4000µm<sup>2</sup> nach 60 Minuten Versuchsdauer (217). Weitere Untersuchungen in mesenterialen Venolen zeigten eine Zunahme von adhärenen Leukozyten um den Faktor 4-8 in Endotoxin-behandelten Gruppen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen (2- 5 mg/kg/KG) (213, 218). Diese unterschiedlichen Werte weisen daraufhin, dass auch der Zeitpunkt der Untersuchung maßgebend ist. Das heißt ein Ansteigen der adhärenen Leukozyten kann mit zunehmender Untersuchungsdauer unter dem Einfluss einer bestehenden Sepsis erwartet werden.

In der vorliegenden Untersuchung zeigt der signifikante Unterschied zwischen der LPS+Tempol-Gruppe und der LPS-Gruppe ( $p < 0,08$ ) den hemmende Effekt von Tempol auf die Leukozytenadhärenz deutlich. Die geringe Anzahl der Sticker in der Kontrollgruppe macht deutlich, dass allein die operations- und versuchsbedingten Schädigungen bereits zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren führen und eine Adhärenz der Leukozyten an der Gefäßwand zur Folge haben. Bestätigung hinsichtlich zeitlichem Ablauf und korrekter Versuchsdurchführung zeigt der signifikante Unterschied zwischen der Kontroll- und der LPS-Gruppe.

#### 5.3.2 Funktionelle Kapillardichte

Bezüglich der funktionellen Kapillardichte konnte in der vorliegenden Untersuchung ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Endotoxin-Gruppe, der Endotoxin-Gruppe und der Tempol-Gruppe, als auch zwischen Endotoxin-Gruppe und der Endotoxin-Tempol-Gruppe nachgewiesen werden. Somit konnten

mit diesem Sepsismodell und der gewählten Methodik einerseits die Veränderung der intestinalen Perfusion bei Endotoxinämie als auch ein positiver Effekt von Tempol nachgewiesen werden. Unterschiedlich gewählte Untersuchungstechniken können den Einfluss einer Minderperfusion belegen (219, 220), oder aber nicht in Erscheinung treten lassen (219-222). Eine induzierte mechanische mesenteriale Minderperfusion hatte keine direkte Veränderung der Darmpermeabilität zur Folge (107). Die sepsisbedingte Minderperfusion scheint demnach nicht ausschließlich für die veränderte Darmpermeabilität verantwortlich zu sein. Erst das Zusammentreffen verschiedener pathogener Faktoren führt im Ergebnis zu einer sepsisbedingten Störung der Membranintegrität (98, 105). Wie eine Studie belegt, hatte die Gabe des verwendeten Narkotikums keinen Einfluss auf die funktionelle Kapillardichte. Diese Tiere erhielten sowohl Pentobarbital, als auch Ketamin und wiesen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der funktionellen Kapillardichte, Leukozyten-Endothelinteraktion und der Plasmakonzentrationen der Zytokine (TNF- $\alpha$ , Interleukin 1 $\beta$ , 6 und 10) auf. Somit wäre eine Verwendung dieser Narkotika bei zukünftigen Studien möglich (223).

## 6 Zusammenfassung

### **Einfluss von Tempol auf die Funktionelle Kapillardichte und Leukozytenadhärenz unter experimenteller Endotoxinämie**

Mit einer Inzidenz von 11% stellt die Sepsis in Deutschland die dritthäufigste Todesursache dar. Bei über 90% der septisch Erkrankten kann als Ursache ein bakterielles Geschehen nachgewiesen werden. Vor allem daraus resultierende Störungen der Mikrozirkulation führen letztlich zum Multiorganversagen.

Im Mittelpunkt des Entstehens einer endothelialen Dysfunktion stehen die Leukozyten. Durch Freisetzung von Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies und anderer Mediatoren sowie deren nachfolgende Interaktion wird die Schädigung in der mikrovaskulären Endstrombahn vorangetrieben und führt letztlich zu einer Zell- und Gewebeschädigung deren Resultat ein Multiorganversagen darstellen kann.

Das antioxidativ wirkende Superoxiddismutasemimetikum Tempol zeigte in verschiedenen anderen experimentellen Studien positive Effekte auf die Mikrozirkulation und die Inflammationsreaktion im Rahmen eines induzierten septischen Geschehens.

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Beurteilung der Effizienz von Tempol als Antioxidans bei Vorliegen einer tierexperimentell erzeugten Sepsis. Im Mittelpunkt stand die Beurteilung der intestinalen Mikrozirkulation, insbesondere der funktionellen Kapillardichte und der Leukozyten-Endothel-Interaktion.

Es wurde mit Genehmigung der zuständigen Tierschutzkommission ein Tiermodell an der Ratte gewählt, da eine Untersuchung der Mikrozirkulation des Intestinum in klinischen Untersuchungen kaum möglich ist. Mit diesem Modell wurde die Wirkung von Tempol bei einer Lipopolysaccharidbelastung von 10 mg/kg Körpergewicht der Tiere untersucht. Die Beurteilung der Mikrozirkulation wurde mittels Intravitalmikroskopie durchgeführt. Als Parameter der intestinalen Mikrozirkulation wurden die funktionelle Kapillardichte und die Leukozyten-Endothel-Interaktion, als Ausdruck einer Leukozytenaktivierung, gemessen. Der Einfluss auf die systemische Entstehung von Oxidationsprodukten wurde durch Kontrollen der Serumwerte von Malondialdehyd, der Peroxidkonzentration, der AOPP, der antioxidativen Kapazität und der oxLDL beurteilt. Weiterhin wurden klinische Parameter zur Kontrolle des septischen Geschehens wie Leukozytenzahl, Herz- und Atemfrequenz erfasst.

Eine Abnahme der funktionellen Kapillardichte durch Tempol konnte mittels intravitalmikroskopischer Untersuchung nachgewiesen werden. Die temporäre

Leukozytenadhärenz in mesenterialen Venolen wurde durch die Gabe von Tempol nicht signifikant beeinflusst. Eine signifikante Reduktion der Anzahl der fest adhärenen Leukozyten konnte unter dem Einfluss von Tempol nachgewiesen werden.

Die Laborparameter: Leukozytenzahl, Malondialdehydkonzentration, Peroxidkonzentration, advanced oxidation protein products, antioxidative Kapazität und die oxidierten low density Lipoproteine wurden durch die Verabreichung von Tempol nicht signifikant beeinflusst.

Sowohl der Nachweis der Wirkung von Tempol im Hinblick auf die Abnahme der funktionellen Kapillardichte, die Reduktion der Anzahl der fest adhärenen Leukozyten, als auch die gewählten labordiagnostischen Parameter lassen darauf schließen, dass leukozytenunabhängige Effekte im pathophysiologischen Geschehen der Sepsis eine Rolle spielen. Gegebenenfalls müssen in weiteren Studien andere labordiagnostische Parameter untersucht werden oder die Parameter über einen längeren Zeitraum erfasst werden, da möglicherweise signifikante Unterschiede dann in Erscheinung treten könnten.

## **7 Abstract**

### **Impact of Tempol Administration on the Functional Capillary Density and Leucocyte Adherence in experimental endotoxemia**

The increase of ordinary age population diseases with a high mortality rate like severe sepsis comes to the fore especially in the view of economical aspects. With an incidence of 11 % represents the severe sepsis the third frequently cause of mortality in Germany. Within more than 90% of septic patients bacterial events can be proved as a cause. Above all microcirculation dysfunction leads in the end to the „multiple organ dysfunction syndrome“. In the centre of the endothelial dysfunction are the leucocytes. The damage is caused by the emission of cytokines, reactive oxygen species and other mediators, as well as their following interactions in the terminal microvascular bed. It leads in the end to cell and tissue damage and results in a multi organ failure. The antioxidative effect of superoxide dismutase mimetic Tempol was proven in different other experimental studies and showed positive effects on the microcirculation and the inflammation reaction within experimental sepsis.

Main focus of this work was to evaluate the efficiency of Tempol as an antioxidant substance using an animal sepsis model. Intestinal microcirculation, in particular the functional capillary density and the leucocyte-endothel-interaction, were analyzed. An animal sepsis model of the rat was chosen, because an investigation of the microcirculation of the intestinum is hardly possible in clinical investigations. In this study the enotoxemia was induced by a lipopolysaccharid infusion of 10 mg/kg body weight. The investigation of the microcirculation was performed by intravital videomicroscopy. As a parameter of the intestinalen microcirculation the functional capillary density and as an expression of leucocyte activation the leucocyte-endothel-interaction was measured. The influence of Tempol on the oxidative stress in sepsis was estimated by mesurement of serum levels of Malondialdehyd, peroxid-concentration, advanced oxidation protein products, antioxidative capacity and oxidized low-density lipoprotein. Furthermore clinical parameters as heart rate, blood pressure and respiratory rate were recorded.

A significant decrease of the functional capillary density due to the administration of Tempol could be proved by intravital microscopy.



The temporary leukocyte adherence in mesenterial venules was not influenced by Tempol. A significant reduction of the number of the firmly adherent leucocytes could be proved under the influence of Tempol. The clinical parameters: white blood cell count, Malondialdehyd concentration, peroxid concentration, advanced oxidation protein products, the antioxidative capacity and oxidized low density lipoprotein were not influenced by the administration of Tempol.

In this study a decrease of the functional capillary density and a reduction of firmly adherent leucocytes due to the administration of Tempol in experimental sepsis were proven. Further investigations must show if there are other diagnostic parameters showing the effects of Tempol and if maybe a higher dosage of Tempol or a longer observation time can bring out more effects.

## 8 Literaturverzeichnis

1. **Angus DC, Wax RS.** Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med.* 2001;29(7 Suppl):S109-16.
2. **Dremsizov TT, Kellum JA, Angus DC.** Incidence and definition of sepsis and associated organ dysfunction. *Int J Artif Organs.* 2004;27(5):352-9.
3. **Kreymann G, Wolf M.** [History and definition of sepsis--do we need new terminology?]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 1996;31(1):9-14.
4. **Le Gall JR, Alberti, C., and Brun, B.C.** Epidemiology of infection and sepsis intensive care unit patients. *Bull.Acad.Natl.Med.* 2004;188(7):1115-1125.
5. **Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al.** 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003;29(4):530-8.
6. **Llewelyn M, Cohen J.** Diagnosis of infection in sepsis. *Intensive Care Med.* 2001;27 Suppl 1:S10-32.
7. **Moerer O, Schmid A, Hofmann M, et al.** Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med.* 2002;28(10):1440-6.
8. **Radetsky M.** The discovery of penicillin. *Pediatr Infect Dis J.* 1996;15(9):811-8.
9. **Schottmüller H.** Wesen und Behandlung der Sepsis. *Verhandlungen Dt.Kongresses für Innere Medizin.* 1914;31:257-280.
10. **Bone RC.** Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med.* 1996(7):1125-8.
11. **Deitch EA.** Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg.* 1992;216(2):117-34.
12. **Brunkhorst FM.** Definition und Diagnose der Sepsis nach aktuellen Kriterien. *Klinikerzt.* 2004;33(6):167-172.
13. **Rychlik R.** Sozioökonomische Relevanz der Sepsis in Deutschland. *Gesundh Ökon Qual Manag.* 2001(5):67-72.
14. **Brunkhorst F.** Sepsis fordert viel mehr Todesopfer als gedacht. *Gesundheitsforschung für den Menschen.* 2004;17:2-4.
15. **Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR.** Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* 2001;29(7):1303-10.
16. **Bone RC.** Let's agree on terminology: definitions of sepsis. *Crit Care Med.* 1991;19(7):973-6.
17. **Moerer O, Plock E, Mgbor U, et al.** A German national prevalence study on the cost of intensive care: an evaluation from 51 intensive care units. *Crit Care.* 2007;11(3):R69.

18. **Reinhardt KB.** Leitlinie Diagnose und Therapien der Sepsis- Methodenreport. *Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.* 2005.
19. **Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al.** Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992;101(6):1644-55.
20. **Linde-Zwirble WT, Angus DC.** Severe sepsis epidemiology: sampling, selection, and society. *Crit Care.* 2004;8(4):222-6.
21. **Slade E, Tamber PS, Vincent JL.** The Surviving Sepsis Campaign: raising awareness to reduce mortality. *Crit Care.* 2003;7(1):1-2.
22. **Guidet B, Aegerter P, Gauzit R, Meshaka P, Dreyfuss D.** Incidence and impact of organ dysfunctions associated with sepsis. *Chest.* 2005;127(3):942-51.
23. **Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, et al.** Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *Jama.* 1995;274(12):968-74.
24. **Burchardi H. LR, Schuster H.-P., Suter P.M.** *Die Intensivmedizin* Berlin: Springer Verlag; 2004.
25. **Burchardi H, Schneider H.** Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. *Pharmacoeconomics.* 2004;22(12):793-813.
26. **Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K.** [Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. *Anaesthesist.* 2006;55(8):835-45.
27. **Cerra FB.** Multiple organ failure syndrome. *Dis Mon.* 1992;38(12):843-947.
28. **Smith RL, Meixler SM, Simberkoff MS.** Excess mortality in critically ill patients with nosocomial bloodstream infections. *Chest.* 1991;100(1):164-7.
29. **Urbaschek B, Urbaschek R.** The inflammatory response to endotoxins. *Bibl Anat.* 1979(17):74-104.
30. **Wade S, Bussow M, Hanisch E.** [Epidemiology of systemic inflammatory response syndrome, infection and septic shock in surgical intensive care patients]. *Chirurg.* 1998;69(6):648-55.
31. **Ince C.** The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care.* 2005;9 Suppl 4:S13-9.
32. **Weigand MA, Bardenheuer HJ, Bottiger BW.** [Clinical management of patients with sepsis]. *Anaesthesist.* 2003;52(1):3-22.
33. **Kayser F, Bienz, KA.,Eckert, J.,Lindemann, J.** *Allgemeine Bakteriologie, Morphologie und Feinstruktur der Bakterien.* In: *Wiesmann, E. ed. Medizinische Mikrobiologie (Immunologie, Bakteriologie, Mykologie, Virologie, Parasitologie).* 7. überarbeitete Auflage ed Stuttgart-New York: Georg Thieme Verlag; 1998.
34. **Quezado Z, Natason, C., Hoffmann, WD.** *Endotoxin in Septic Shock.* In *Reinhart K., Eyrich K.(eds): Sepsis- current perspectives in pathophysiology and therapy.* Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1994.

35. **Bruin K, von der Möhlen, MAM., van Deventer, DJH.** *Endotoxemia and Sepsis: Important Roles for Lipopolysaccharide Binding Protein and CD14 in Endotoxin Signal transduction.*, In Reinhardt K, Eyrich K (eds): *Sepsis- current perspectives in pathophysiology and therapy* Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1994.
36. **Adam D, Gerlach, B.** *Antibacterial Treatment of Sepsis*, In: Reinhart, K., Eyrich, K. (eds): *Sepsis-current perspectives in pathophysiology and therapy*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1994.
37. **Marra MN, Wilde CG, Griffith JE, Snable JL, Scott RW.** Bactericidal/permeability-increasing protein has endotoxin-neutralizing activity. *J Immunol.* 1990;144(2):662-6.
38. **Gray PW, Corcorran AE, Eddy RL, Jr., Byers MG, Shows TB.** The genes for the lipopolysaccharide binding protein (LBP) and the bactericidal permeability increasing protein (BPI) are encoded in the same region of human chromosome 20. *Genomics.* 1993;15(1):188-90.
39. **Schuster H, Werdan, K.** *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen.* 3. Auflage ed. ed Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio: Springer Verlag; 2000.
40. **Kirschning CJ, Wesche H, Merrill Ayres T, Rothe M.** Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1998;188(11):2091-7.
41. **Bazil V, Strominger JL.** Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J Immunol.* 1991;147(5):1567-74.
42. **Frey EA, Miller DS, Jahr TG, et al.** Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 1992;176(6):1665-71.
43. **Marchant A, Duchow J, Delville JP, Goldman M.** Lipopolysaccharide induces up-regulation of CD14 molecule on monocytes in human whole blood. *Eur J Immunol.* 1992;22(6):1663-5.
44. **Hampton RY, Golenbock DT, Penman M, Krieger M, Raetz CR.** Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature.* 1991;352(6333):342-4.
45. **Fenton MJ, Golenbock DT.** LPS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol.* 1998;64(1):25-32.
46. **Schumann RR, Leong SR, Flagg GW, et al.** Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science.* 1990;249(4975):1429-31.
47. **Beutler B, Grau GE.** Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. *Crit Care Med.* 1993;21(10 Suppl):S423-35.
48. **Barroso-Aranda J, Zweifach BW, Mathison JC, Schmid-Schonbein GW.** Neutrophil activation, tumor necrosis factor, and survival after endotoxic and hemorrhagic shock. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;25 Suppl 2:S23-9.
49. **Wang P, Li N, Li JS, Li WQ.** The role of endotoxin, TNF-alpha, and IL-6 in inducing the state of growth hormone insensitivity. *World J Gastroenterol.* 2002;8(3):531-6.
50. **Bohler T, Waiser J, Hepburn H, et al.** TNF-alpha and IL-1alpha induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of

- hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers. *Cytokine*. 2000;12(7):986-91.
51. **Rothe M, Manhhart, N., Punz, A.** Role of antioxidants in sepsis. *Intensivmedizin*. 1998;35(2):95-105.
  52. **Goode HF, Webster NR.** Free radicals and antioxidants in sepsis. *Crit Care Med*. 1993;21(11):1770-6.
  53. **Schmidt H, Ebeling D, Bauer H, et al.** Ketamine attenuates endotoxin-induced leukocyte adherence in rat mesenteric venules. *Crit Care Med*. 1995;23(12):2008-14.
  54. **Javesghani D, Hussain SN, Scheidel J, Quinn MT, Magder SA.** Superoxide production in the vasculature of lipopolysaccharide-treated rats and pigs. *Shock*. 2003;19(5):486-93.
  55. **Chan EL, Murphy JT.** Reactive oxygen species mediate endotoxin-induced human dermal endothelial NF-kappaB activation. *J Surg Res*. 2003;111(1):120-6.
  56. **Kretschmar M.** *Role of oxygen free radicals in the pathophysiology of Sepsis*, In: Reinhart, K., Eyrich, K. (eds): *Sepsis- current perspectives in pathophysiology and therapy* Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag; 1994.
  57. **Bela P, Bahl R, Sane AS, et al.** Oxidative stress status: possible guideline for clinical management of critically ill patients. *Panminerva Med*. 2001;43(1):27-31.
  58. **Mishra V, Baines M, Wenstone R, Shenkin A.** Markers of oxidative damage, antioxidant status and clinical outcome in critically ill patients. *Ann Clin Biochem*. 2005;42(Pt 4):269-76.
  59. **Fischer B, von Knethen A, Brune B.** Dualism of oxidized lipoproteins in provoking and attenuating the oxidative burst in macrophages: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Immunol*. 2002;168(6):2828-34.
  60. **Napoli C, de Nigris F, Palinski W.** Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J Cell Biochem*. 2001;82(4):674-82.
  61. **Chen XP, Xun KL, Wu Q, Zhang TT, Shi JS, Du GH.** Oxidized low density lipoprotein receptor-1 mediates oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis in human umbilical vein endothelial cells: role of reactive oxygen species. *Vascul Pharmacol*. 2007;47(1):1-9.
  62. **Schmitz G, Grandl M.** Role of redox regulation and lipid rafts in macrophages during Ox-LDL-mediated foam cell formation. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(9):1499-518.
  63. **Galle J.** [Atherosclerosis and arteriitis: implications for therapy of cardiovascular disease]. *Herz*. 2004;29(1):4-11.
  64. **Galle J, Mameghani A, Bolz SS, et al.** Oxidized LDL and its compound lysophosphatidylcholine potentiate AngII-induced vasoconstriction by stimulation of RhoA. *J Am Soc Nephrol*. 2003;14(6):1471-9.

65. **Ando K, Fujita T.** Role of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in the development of hypertensive organ damage. *Clin Exp Nephrol.* 2004;8(3):178-82.
66. **Selmeçi L, Seres L, Antal M, Lukacs J, Regoly-Merei A, Acsady G.** Advanced oxidation protein products (AOPP) for monitoring oxidative stress in critically ill patients: a simple, fast and inexpensive automated technique. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(3):294-7.
67. **Iwao Y, Anraku M, Hiraike M, et al.** The structural and pharmacokinetic properties of oxidized human serum albumin, advanced oxidation protein products (AOPP). *Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;21(2):140-6.
68. **Zhang ZH, Liu SX, Hou FF, et al.** [Advanced oxidation protein products-induced tumor necrosis factor alpha secretion in monocytes via reactive oxygen species generation]. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao.* 2005;25(5):493-7.
69. **Li HY, Hou FF, Zhang X, et al.** Advanced oxidation protein products accelerate renal fibrosis in a remnant kidney model. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(2):528-38.
70. **Shi XY, Hou FF, Niu HX, et al.** Advanced oxidation protein products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Endocrinology.* 2008;149(4):1829-39.
71. **Pan HZ, Zhang H, Chang D, Li H, Sui H.** The change of oxidative stress products in diabetes mellitus and diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol.* 2008;92(4):548-51.
72. **Bauer M.** [The physiopathology of sepsis. Current concepts]. *Anaesthesist.* 1996;45(4):312-22.
73. **Alves-Filho JC, Benjamim C, Tavares-Murta BM, Cunha FQ.** Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100 Suppl 1:223-6.
74. **Alves-Filho JC, Tavares-Murta BM, Barja-Fidalgo C, et al.** Neutrophil function in severe sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 2006;6(2):151-8.
75. **Opdenakker G.** New insights in the regulation of leukocytosis and the role played by leukocytes in septic shock. *Verh K Acad Geneeskd Belg.* 2001;63(6):531-8; discussion 538-41.
76. **Ley K.** Leukocyte adhesion to vascular endothelium. *J Reconstr Microsurg.* 1992;8(6):495-503.
77. **Li X, Steeber DA, Tang ML, Farrar MA, Perlmutter RM, Tedder TF.** Regulation of L-selectin-mediated rolling through receptor dimerization. *J Exp Med.* 1998;188(7):1385-90.
78. **Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ.** Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun.* 2002;70(7):3602-10.

79. **Steeber DA, Tedder TF.** Adhesion molecule cascades direct lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation. *Immunol Res.* 2000;22(2-3):299-317.
80. **Harrington EO, Stefanec T, Newton J, Rounds S.** Release of soluble E-selectin from activated endothelial cells upon apoptosis. *Lung.* 2006;184(5):259-66.
81. **Norman KE, Moore KL, McEver RP, Ley K.** Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood.* 1995;86(12):4417-21.
82. **Ley K, Tedder TF.** Leukocyte interactions with vascular endothelium. New insights into selectin-mediated attachment and rolling. *J Immunol.* 1995;155(2):525-8.
83. **Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B.** Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science.* 1989;243(4895):1160-5.
84. **oode Egbrink MG, Janssen GH, Ookawa K, et al.** Especially polymorphonuclear leukocytes, but also monomorphonuclear leukocytes, roll spontaneously in venules of intact rat skin: involvement of E-selectin. *J Invest Dermatol.* 2002;118(2):323-6.
85. **Gonzalez-Amaro R, Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F.** Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs.* 1998;56(6):977-88.
86. **Rossiter H, Alon R, Kupper TS.** Selectins, T-cell rolling and inflammation. *Mol Med Today.* 1997;3(5):214-22.
87. **Lehmann C.** Tierexperimentelle Untersuchungen zur intestinalen Mikrozirkulation bei Endotoxinämie. In: Habilitationsschrift, ed; 2000.
88. **Granger DN, Kubes P.** The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukoc Biol.* 1994;55(5):662-75.
89. **Hynes RO.** Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992;69(1):11-25.
90. **Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K.** Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood.* 2002;99(1):336-41.
91. **Arndt H, Palitzsch KD, Anderson DC, Rusche J, Grisham MB, Granger DN.** Leucocyte-endothelial cell adhesion in a model of intestinal inflammation. *Gut.* 1995;37(3):374-9.
92. **von Andrian UH, Berger EM, Ramezani L, et al.** In vivo behavior of neutrophils from two patients with distinct inherited leukocyte adhesion deficiency syndromes. *J Clin Invest.* 1993;91(6):2893-7.
93. **Springer TA.** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* 1994;76(2):301-14.
94. **Thiel M, Zourelidis C, Peter K.** [The role of polymorphonuclear neutrophilic leukocytes in the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome (ARDS)]. *Anaesthesist.* 1996;45(2):113-30.

95. **Anthoni C, Rijcken EJ, Laukoetter MG, et al.** Submucosal collecting venules: a reliable site for intestinal intravital microscopy in rats. *J Invest Surg.* 2002;15(5):259-67.
96. **Arndt H, Palitzsch KD, Grisham MB, Granger DN.** Metronidazole inhibits leukocyte-endothelial cell adhesion in rat mesenteric venules. *Gastroenterology.* 1994;106(5):1271-6.
97. **Frieling H, Lauer KS, Grundling M, et al.** Peritoneal instillation of taurolidine or polihexanide modulates intestinal microcirculation in experimental endotoxemia. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22(7):807-17.
98. **Lehmann C, Georgiew A, Weber M, Birnbaum J, Kox WJ.** Reduction in intestinal leukocyte adherence in rat experimental endotoxemia by treatment with the 21-aminosteroid U-74389G. *Intensive Care Med.* 2001;27(1):258-63.
99. **Grundling M, Lehmann C, Saeger D, et al.** Response of the rat intestinal microcirculation to experimental endotoxemia is attenuated by ampicillin but not by its derivative KKP723. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008;38(3):163-70.
100. **Lehmann C, Bac VH, Pavlovic D, et al.** Metronidazole improves intestinal microcirculation in septic rats independently of bacterial burden. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006;34(3):427-38.
101. **Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD.** A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia. *Shock.* 1999;12(5):355-64.
102. **Menger MD, Steiner D, Messmer K.** Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol.* 1992;263(6 Pt 2):H1892-900.
103. **Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K.** Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl).* 1998;198(1):23-35.
104. **Revelly JP, Ayuse T, Brienza N, Fessler HE, Robotham JL.** Endotoxic shock alters distribution of blood flow within the intestinal wall. *Crit Care Med.* 1996;24(8):1345-51.
105. **Lehmann C, Konig JP, Dettmann J, Birnbaum J, Kox WJ.** Effects of iloprost, a stable prostacyclin analog, on intestinal leukocyte adherence and microvascular blood flow in rat experimental endotoxemia. *Crit Care Med.* 2001;29(7):1412-6.
106. **Schmidt H, Secchi A, Wellmann R, et al.** Effect of endotoxemia on intestinal villus microcirculation in rats. *J Surg Res.* 1996;61(2):521-6.
107. **Fink MP, Antonsson JB, Wang HL, Rothschild HR.** Increased intestinal permeability in endotoxic pigs. Mesenteric hypoperfusion as an etiologic factor. *Arch Surg.* 1991;126(2):211-8.
108. **Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, et al.** Microhemodynamic and cellular mechanisms of activated protein C action during endotoxemia. *Crit Care Med.* 2004;32(4):1011-7.
109. **Diller R, Stratmann U, Helmschmied T, et al.** Microcirculatory dysfunction in endotoxemic bowel anastomosis: the pathogenetic contribution of



- microcirculatory dysfunction to endotoxemia-induced healing impairment. *J Surg Res.* 2008;150(1):3-10.
110. **Ellis CG, Jagger J, Sharpe M.** The microcirculation as a functional system. *Crit Care.* 2005;9 Suppl 4:S3-8.
  111. **Birnbaum J, Klotz E, Spies CD, 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):R117.
  112. **Parker SJ, Watkins PE.** Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg.* 2001;88(1):22-30.
  113. **Clowes GH, Jr., Zuschneid W, Turner M, et al.** Observations on the pathogenesis of the pneumonitis associated with severe infections in other parts of the body. *Ann Surg.* 1968;167(5):630-50.
  114. **Warner BW, Hasselgren PO, James JH, et al.** Superoxide dismutase in rats with sepsis. Effect on survival rate and amino acid transport. *Arch Surg.* 1987;122(10):1142-6.
  115. **Law W, Ferguson, JL.** Naloxon alters organ perfusion during endotoxin shock in conscions rats. *Am J Physiol.* 1988;255:H 1106-1113.
  116. **Johnston T, Hampton, WW., Fry, DE.** Septic hemodynamics produced by infusion of endotoxin. *Curr Surg.* 1989;46:101-103.
  117. **Danner RL, Elin RJ, Hosseini JM, Wesley RA, Reilly JM, Parillo JE.** Endotoxemia in human septic shock. *Chest.* 1991;99(1):169-75.
  118. **Revhaug A, Michie HR, Manson JM, et al.** Inhibition of cyclo-oxygenase attenuates the metabolic response to endotoxin in humans. *Arch Surg.* 1988;123(2):162-70.
  119. **Fink MP, Heard SO.** Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res.* 1990;49(2):186-96.
  120. **Kuebler WM, Borges J, Sckell A, et al.** Role of L-selectin in leukocyte sequestration in lung capillaries in a rabbit model of endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;161(1):36-43.
  121. **Xu D, Qi L, Guillory D, Cruz N, Berg R, Deitch EA.** Mechanisms of endotoxin-induced intestinal injury in a hyperdynamic model of sepsis. *J Trauma.* 1993;34(5):676-82; discussion 682-3.
  122. **Waisbren BA.** Gram-Negative Shock And Endotoxin Shock. *Am J Med.* 1964;36:819-24.
  123. **Drewe J, Beglinger C, Fricker G.** Effect of ischemia on intestinal permeability of lipopolysaccharides. *Eur J Clin Invest.* 2001;31(2):138-44.
  124. **Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM, et al.** Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med.* 1996;334(26):1697-702.
  125. **de Carvalho H, Matos JA, Bouskela E, Svensjo E.** Vascular permeability increase and plasma volume loss induced by endotoxin was attenuated by hypertonic saline with or without dextran. *Shock.* 1999;12(1):75-80.

126. **Ghiselli R, Cirioni O, Giacometti A, et al.** The cathelicidin-derived tritrpticin enhances the efficacy of ertapenem in experimental rat models of septic shock. *Shock*. 2006;26(2):195-200.
127. **Orro T, Sankari S, Pudas T, Oksanen A, Soveri T.** Acute phase response in reindeer after challenge with Escherichia coli endotoxin. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004;27(6):413-22.
128. **Nedrebo T, Reed RK.** Different serotypes of endotoxin (lipopolysaccharide) cause different increases in albumin extravasation in rats. *Shock*. 2002;18(2):138-41.
129. **Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH.** Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res*. 1980;29(2):189-201.
130. **Johnston TD, Hampton WW, Fry DE.** Septic hemodynamics produced by infusion of endotoxin. *Curr Surg*. 1989;46(2):101-3.
131. **Grotz M, Regel G, Bastian L, et al.** [The intestine as the central organ in the development of multiple organ failure after severe trauma--pathophysiology and therapeutic approaches]. *Zentralbl Chir*. 1998;123(3):205-17.
132. **Ding LA, Li JS, Li YS, Zhu NT, Liu FN, Tan L.** Intestinal barrier damage caused by trauma and lipopolysaccharide. *World J Gastroenterol*. 2004;10(16):2373-8.
133. **Ding LA, Li JS, Li YS, Liu FN, Tan L.** Prophylactic treatment with growth hormone improves intestinal barrier function and alleviates bacterial translocation in stressed rats. *Chin Med J (Engl)*. 2004;117(2):264-9.
134. **Deitch EA, Ma WJ, Ma L, Berg R, Specian RD.** Endotoxin-induced bacterial translocation: a study of mechanisms. *Surgery*. 1989;106(2):292-9; discussion 299-300.
135. **Aksoyek S, Cinel I, Avlan D, et al.** Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Shock*. 2002;18(5):476-80.
136. **Rose J, Martin, C.** Tissue bioenergetics and microvascular perfusion are impaired in rat ileal mucosa in normotensive sepsis. *Microcirculation*. 2006;13(1):49-56.
137. **Fink M.** Leaky gut hypothesis: A historical perspective. *Crit Care Med*. 1990;18(5):579-80.
138. **Bauer A, Bruegger D, Christ F.** [Microcirculatory monitoring of sepsis]. *Anaesthesist*. 2005;54(12):1163-75.
139. **Zander R.** [Arterial-intramuscular CO<sub>2</sub>--partial pressure difference (aiDCO<sub>2</sub>)]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 1998;33 Suppl 2:S52-3.
140. **Dubin A, Estenssoro E, Murias G, et al.** Effects of hemorrhage on gastrointestinal oxygenation. *Intensive Care Med*. 2001;27(12):1931-6.
141. **Gutierrez G.** Blood flow, not hypoxia, determines intramucosal PCO<sub>2</sub>. *Crit Care*. 2005;9(2):149-50.
142. **Dubin A, Estenssoro E, Murias G, et al.** Intramucosal-arterial Pco<sub>2</sub> gradient does not reflect intestinal dysoxia in anemic hypoxia. *J Trauma*. 2004;57(6):1211-7.

143. **Sakka SG, Reinhart K, Meier-Hellmann A.** Prognostic value of the indocyanine green plasma disappearance rate in critically ill patients. *Chest*. 2002;122(5):1715-20.
144. **Aytekın FO, Teke Z, Aydin C, et al.** Effects of a membrane-permeable radical scavenger, Tempol, on healing of colonic anastomoses in the cecal ligation and puncture model of polymicrobial sepsis in rats. *Am J Surg*. 2007;193(6):723-9.
145. **Pugh SY, Fridovich I.** Induction of superoxide dismutases in *Escherichia coli* B by metal chelators. *J Bacteriol*. 1985;162(1):196-202.
146. **Spolarics Z.** Endotoxin stimulates gene expression of ROS-eliminating pathways in rat hepatic endothelial and Kupffer cells. *Am J Physiol*. 1996;270(4 Pt 1):G660-6.
147. **Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS.** Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension*. 1998;32(1):59-64.
148. **Patel K, Chen Y, Dennehy K, et al.** Acute antihypertensive action of nitroxides in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006;290(1):R37-43.
149. **Yan SX, Hong XY, Hu Y, Liao KH.** Tempol, one of nitroxides, is a novel ultraviolet-A1 radiation protector for human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci*. 2005;37(3):137-43.
150. **Polytarchou C, Papadimitriou E.** Antioxidants inhibit angiogenesis in vivo through down-regulation of nitric oxide synthase expression and activity. *Free Radic Res*. 2004;38(5):501-8.
151. **Duann P, Datta PK, Pan C, Blumberg JB, Sharma M, Lianos EA.** Superoxide dismutase mimetic preserves the glomerular capillary permeability barrier to protein. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;316(3):1249-54.
152. **Wilcox CS, Pearlman A.** Chemistry and antihypertensive effects of tempol and other nitroxides. *Pharmacol Rev*. 2008;60(4):418-69.
153. **Elmarakby AA, Williams JM, Imig JD, Pollock JS, Pollock DM.** Synergistic actions of enalapril and tempol during chronic angiotensin II-induced hypertension. *Vascul Pharmacol*. 2007;46(2):144-51.
154. **Dobrian AD, Schriver SD, Prewitt RL.** Role of angiotensin II and free radicals in blood pressure regulation in a rat model of renal hypertension. *Hypertension*. 2001;38(3):361-6.
155. **Lewinska A, Wnuk M, Slota E, Bartosz G.** The nitroxide antioxidant Tempol affects metal-induced cyto- and genotoxicity in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res*. 2008;649(1-2):7-14.
156. **Liaw WJ, Chen TH, Lai ZZ, et al.** Effects of a membrane-permeable radical scavenger, Tempol, on intraperitoneal sepsis-induced organ injury in rats. *Shock*. 2005;23(1):88-96.
157. **Teke Z, Kabay B, Ozden A, et al.** Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, on local and remote organ injuries caused by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *J Surg Res*. 2008;149(2):259-71.

158. **Neckar J, Ostadal B, Kolar F.** Acute but not chronic tempol treatment increases ischemic and reperfusion ventricular arrhythmias in open-chest rats. *Physiol Res.* 2008;57(4):653-6.
159. **Kasapoglu M, Ozben T.** Alterations of antioxidant enzymes and oxidative stress markers in aging. *Exp Gerontol.* 2001;36(2):209-20.
160. **Lentsch AB, Ward PA.** Activation and regulation of NFkappaB during acute inflammation. *Clin Chem Lab Med.* 1999;37(3):205-8.
161. **Tierschutzgesetz.** TierSchG Geltung ab 01.01.1987; 25.5.1998.
162. **Schmid-Schoenbein GW, Zweifach BW, Kovalcheck S.** The application of stereological principles to morphometry of the microcirculation in different tissues. *Microvasc Res.* 1977;14(3):303-17.
163. **Schumacher J, Binkowski K, Dendorfer A, Klotz KF.** Organ-specific extravasation of albumin-bound Evans blue during nonresuscitated hemorrhagic shock in rats. *Shock.* 2003;20(6):565-8.
164. **Birnbaum J, Lehmann C, Stauss HM, et al.** Sympathetic modulation of intestinal microvascular blood flow oscillations in experimental endotoxemia. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2003;28(4):209-20.
165. **Moazzam F, DeLano FA, Zweifach BW, Schmid-Schonbein GW.** The leukocyte response to fluid stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(10):5338-43.
166. **Barroso-Aranda J, Schmid-Schonbein GW, Zweifach BW, Mathison JC.** Polymorphonuclear neutrophil contribution to induced tolerance to bacterial lipopolysaccharide. *Circ Res.* 1991;69(5):1196-206.
167. **Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA.** Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 1997;112(1):235-43.
168. **Brackett DJ, Schaefer CF, Tompkins P, Fagraeus L, Peters LJ, Wilson MF.** 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):273-84.
169. **Ghosh S, Latimer RD, Gray BM, Harwood RJ, Oduro A.** Endotoxin-induced organ injury. *Crit Care Med.* 1993;21(2 Suppl):S19-24.
170. **Birnbaum J, Lehmann C, Klotz E, et al.** Effects of N-acetylcysteine and tirilazad mesylate on intestinal functional capillary density, leukocyte adherence, mesenteric plasma extravasation and cytokine levels in experimental endotoxemia in rats. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2008;39(1-4):99-111.
171. **Zhang H, Spapen H, Manikis P, et al.** Tirilazad mesylate (U-74006F) inhibits effects of endotoxin in dogs. *Am J Physiol.* 1995;268(5 Pt 2):H1847-55.
172. **McKechnie K, Furman BL, Parratt JR.** Modification by oxygen free radical scavengers of the metabolic and cardiovascular effects of endotoxin infusion in conscious rats. *Circ Shock.* 1986;19(4):429-39.
173. **Onuma S, Nakanishi K.** Superoxide dismutase mimetic tempol decreases blood pressure by increasing renal medullary blood flow in hyperinsulinemic-hypertensive rats. *Metabolism.* 2004;53(10):1305-8.

174. **Guo R, Gao XY, Wang W, et al.** Tempol reduces reperfusion-induced arrhythmias in anaesthetized rats. *Pharmacol Res.* 2005;52(2):192-8.
175. **Roth E, Manhart N, Wessner B.** Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2004;7(2):161-8.
176. **Barroso-Aranda J, Chavez-Chavez RH, Mathison JC, Suematsu M, Schmid-Schonbein GW.** Circulating neutrophil kinetics during tolerance in hemorrhagic shock using bacterial lipopolysaccharide. *Am J Physiol.* 1994;266(2 Pt 2):H415-21.
177. **Fitzal F, Delano FA, Young C, Rosario HS, Junger WG, Schmid-Schonbein GW.** Pancreatic enzymes sustain systemic inflammation after an initial endotoxin challenge. *Surgery.* 2003;134(3):446-56.
178. **Wessner B, Strasser EM, Manhart N, Roth E.** Supply of R-alpha-lipoic acid and glutamine to casein-fed mice influences the number of B lymphocytes and tissue glutathione levels during endotoxemia. *Wien Klin Wochenschr.* 2006;118(3-4):100-7.
179. **Walther A, Weihrauch M, Schmidt W, Gebhard MM, Martin E, Schmidt H.** Leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia. *Crit Care Med.* 2000;28(8):2943-8.
180. **Modzelewski B.** [Lipid peroxidation products in experimental peritonitis]. *Pol Merkur Lekarski.* 2005;18(106):421-3.
181. **Giamarellos-Bourboulis EJ, Tzivras M, Kourtesas D, et al.** Lipid peroxidation in chronic gastritis; any influence of Helicobacter pylori? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003;68(4):257-61.
182. **Koksal GM, Sayilgan C, Aydin S, Oz H, Uzun H.** Correlation of plasma and tissue oxidative stresses in intra-abdominal sepsis. *J Surg Res.* 2004;122(2):180-3.
183. **Edremitlioglu M, Kilic D, Oter S, et al.** The effect of hyperbaric oxygen treatment on the renal functions in septic rats: relation to oxidative damage. *Surg Today.* 2005;35(8):653-61.
184. **Kayali R, Cakatay U, Uzun H, Genc H.** Gender difference as regards myocardial protein oxidation in aged rats: male rats have increased oxidative protein damage. *Biogerontology.* 2007;8(6):653-61.
185. **Victor VM, Rocha M, De la Fuente M.** N-acetylcysteine protects mice from lethal endotoxemia by regulating the redox state of immune cells. *Free Radic Res.* 2003;37(9):919-29.
186. **Koussoulas V, Giamarellos-Bourboulis EJ, Adamis T, et al.** The significance of oxidant/antioxidant balance for the pathogenesis of experimental sepsis by multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2005;72(1):41-7.
187. **Lehmann C, Luther B, Kox WJ.** [Pharmacologic modification of intestinal reperfusion injury in the animal experiment]. *Zentralbl Chir.* 1996;121(1):70-6.
188. **Therond P, Abella A, Laurent D, et al.** In vitro study of the cytotoxicity of isolated oxidized lipid low-density lipoproteins fractions in human endothelial cells: relationship with the glutathione status and cell morphology. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(4):585-96.

189. **Hakamata H, Miyazaki A, Sakai M, Sakamoto YI, Horiuchi S.** Cytotoxic effect of oxidized low density lipoprotein on macrophages. *J Atheroscler Thromb.* 1998;5(2):66-75.
190. **Wagner KM.** MnSOD und p53- Bedeutung für die durch oxidierte Low Density Lipoproteine induzierte Apoptose von Makrophagen. 2004.
191. **Galle J, Heinloth A, Wanner C, Heermeier K.** Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress. *Kidney Int Suppl.* 2001;78:S120-3.
192. **Curcelli EC, Muller SS, Novelli Filho JL.** Beneficial effects of diclofenac therapy on serum lipids, oxidized low-density lipoprotein and antioxidant defenses in rats. *Life Sci.* 2008;82(15-16):892-8.
193. **Hsieh CC, Yen MH, Yen CH, Lau YT.** Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2001;49(1):135-45.
194. **Fang JC, Kinlay S, Beltrame J, et al.** Effect of vitamins C and E on progression of transplant-associated arteriosclerosis: a randomised trial. *Lancet.* 2002;359(9312):1108-13.
195. **Munteanu A, Zingg JM, Azzi A.** Anti-atherosclerotic effects of vitamin E--myth or reality? *J Cell Mol Med.* 2004;8(1):59-76.
196. **Gaut JP, Belaouaj A, Byun J, et al.** Vitamin C fails to protect amino acids and lipids from oxidation during acute inflammation. *Free Radic Biol Med.* 2006;40(9):1494-501.
197. **Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillere-Blandin C, et al.** Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int.* 1996;49(5):1304-13.
198. **Atabek ME, Keskin M, Yazici C, et al.** Protein oxidation in obesity and insulin resistance. *Eur J Pediatr.* 2006;165(11):753-6.
199. **Cizova H, Papezikova I, Kubala L, Lojek A, Ciz M.** Increased antioxidant capacity of serum did not prevent lipid peroxidation in the intermittent ischemia-reperfusion of rat small intestine. *Dig Dis Sci.* 2006;51(4):657-61.
200. **Angstwurm MW, Engelmann L, Zimmermann T, et al.** Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. *Crit Care Med.* 2007;35(1):118-26.
201. **Takeda K, Shimada Y, Okada T, Amano M, Sakai T, Yoshiya I.** Lipid peroxidation in experimental septic rats. *Crit Care Med.* 1986;14(8):719-23.
202. **Marik PE.** Propofol: an immunomodulating agent. *Pharmacotherapy.* 2005;25(5 Pt 2):28S-33S.
203. **Basu S, Mutschler DK, Larsson AO, Kiiski R, Nordgren A, Eriksson MB.** Propofol (Diprivan-EDTA) counteracts oxidative injury and deterioration of the arterial oxygen tension during experimental septic shock. *Resuscitation.* 2001;50(3):341-8.
204. **Mikawa K, Nishina K, Kodama S, Obara H.** Propofol attenuates diaphragmatic dysfunction induced by septic peritonitis in hamsters. *Anesthesiology.* 2001;94(4):652-60.

205. **Horton JW, Walker PB.** Oxygen radicals, lipid peroxidation, and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol.* 1993;74(4):1515-20.
206. **Yaylak F, Canbaz H, Caglikulekci M, et al.** Liver tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and lipid peroxidation in experimental hepatic ischemia reperfusion injury stimulated with lipopolysaccharide: the role of aminoguanidine. *J Surg Res.* 2008;148(2):214-23.
207. **Caglikulekci M, Pata C, Apa DD, et al.** The effect of N-acetylcysteine (NAC) on liver and renal tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) and tissue lipid peroxidation in obstructive jaundice stimulated by lipopolysaccharide (LPS). *Pharmacol Res.* 2004;49(3):227-38.
208. **Yerer MB, Yapislar H, Aydogan S, Yalcin O, Baskurt O.** Lipid peroxidation and deformability of red blood cells in experimental sepsis in rats: The protective effects of melatonin. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2004;30(2):77-82.
209. **Janssen GH, Tangelder GJ, Oude Egbrink MG, Reneman RS.** Spontaneous leukocyte rolling in venules in untraumatized skin of conscious and anesthetized animals. *Am J Physiol.* 1994;267(3 Pt 2):H1199-204.
210. **Anning PB, Evans TW.** Leukocytes in sepsis: do they just keep rolling along? *Crit Care Med.* 2000;28(8):3108-9.
211. **Janssen GH, Tangelder GJ, oude Egbrink MG, Reneman RS.** Different effects of anesthetics on spontaneous leukocyte rolling in rat skin. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1997;17(6):305-13.
212. **Fiebig E, Ley K, Arfors KE.** Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1991;10(2):127-44.
213. **Birnbaum J, Klotz E, Spies CD, et al.** Impact of combined C1 esterase inhibitor/coagulation factor XIII or N-acetylcysteine/tirilazad mesylate administration on leucocyte adherence and cytokine release in experimental endotoxaemia. *J Int Med Res.* 2008;36(4):748-59.
214. **Schmidt H, Weigand MA, Li C, Schmidt W, Martin E, Bardenheuer HJ.** Intestinal formation of hypoxanthine and uric acid during endotoxemia. *J Surg Res.* 1997;71(1):61-6.
215. **Hickey MJ, Issekutz AC, Reinhardt PH, Fedorak RN, Kubes P.** Endogenous interleukin-10 regulates hemodynamic parameters, leukocyte-endothelial cell interactions, and microvascular permeability during endotoxemia. *Circ Res.* 1998;83(11):1124-31.
216. **Miura S, Tsuzuki Y, Kurose I, et al.** Endotoxin stimulates lymphocyte-endothelial interactions in rat intestinal Peyer's patches and villus mucosa. *Am J Physiol.* 1996;271(2 Pt 1):G282-92.
217. **Kurose I, Suematsu M, Miura S, et al.** Oxyradical generation from leukocytes during endotoxin-induced microcirculatory disturbance in rat mesentery--attenuating effect of cetraxate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1993;120(1):37-44.
218. **Fukumura D, Miura S, Kurose I, et al.** IL-1 is an important mediator for microcirculatory changes in endotoxin-induced intestinal mucosal damage. *Dig Dis Sci.* 1996;41(12):2482-92.

219. **Drazenovic R, Samsel RW, Wylam ME, Doerschuk CM, Schumacker PT.** Regulation of perfused capillary density in canine intestinal mucosa during endotoxemia. *J Appl Physiol.* 1992;72(1):259-65.
220. **Theuer CJ, Wilson MA, Steeb GD, Garrison RN.** Microvascular vasoconstriction and mucosal hypoperfusion of the rat small intestine during bacteremia. *Circ Shock.* 1993;40(1):61-8.
221. **VanderMeer TJ, Wang H, Fink MP.** 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):1217-26.
222. **Neviere RR, Pitt-Hyde ML, Piper RD, Sibbald WJ, Potter RF.** Microvascular perfusion deficits are not a prerequisite for mucosal injury in septic rats. *Am J Physiol.* 1999;276(4 Pt 1):G933-40.
223. **Lehmann C, Feyerherd F, Feyerherd T, et al.** Ketamine does not affect intestinal microcirculation in pentobarbital-anaesthetized rats during experimental endotoxaemia. *Lab Anim.* 2007;41(1):55-62.



## 9 Anhang

### Danksagung

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

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

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

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

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

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

## **Lebenslauf**

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

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Charité zu Berlin bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen habe,

dass ich die Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Goltoft, den 22.03.2012

Vera Christoph