

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

DISSERTATION

Einfluss von C1-Esterase Inhibitor in Kombination mit
Blutgerinnungsfaktor XIII auf die mesenteriale Mikrozirkulation
bei experimenteller Endotoxinämie.

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jewgenij Feller
aus Tomsk

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr.med. J. Birnbaum
 2. Priv.-Doz. Dr.med. H. Kern
 3. Priv.-Doz. Dr.med. M. Hensel

Datum der Promotion: 23.06.2013

Inhaltsverzeichnis

I Einleitung.....5

1.1 Sepsis.....5

1.1.1 Epidemiologie.....5

1.1.2 Definitionen.....5

1.1.3 Pathogenese der Sepsis.....9

1.1.4 Bedeutung des Intestinums..... 17

1.1.5 Endothelschädigung und Plasmaextravasation..... 18

1.2 Therapiekonzepte bei Sepsis..... 19

1.2.1 Kausale Therapie..... 19

1.2.2 Supportive Therapie..... 19

1.2.3 Adjunktive Therapie..... 20

1.2.4 Weitere Therapieansätze..... 20

1.3 C1-Esterase-Inhibitor..... 21

1.4 Faktor XIII..... 23

1.5 Sepsismodelle..... 24

II Fragestellung..... 26

III Material und Methodik..... 27

3.1 Tiere und Tierhaltung..... 27

3.2 Gruppeneinteilung..... 27

3.3 Versuchsablauf..... 27

3.4 Narkoseführung und Monitoring..... 29

3.5 Operative Techniken..... 30

3.6 Endotoxinmodell..... 30

3.7 Intravitalmikroskopie..... 31

3.7.1 Leukozyten – Endothel – Interaktion..... 32

3.7.2 Plasmaextravasation..... 33

3.8 Laborparameter..... 33

3.8.1 Leukozytenzahl..... 34

3.8.2 TNF- α , IL-10, IL-1 β , IL-6..... 34

3.9 Statistische Methoden..... 34

IV	Ergebnisse	36
4.1	Intravitalmikroskopie.....	36
4.1.1	Leukozytenadhärenz	36
4.1.2	Extravasation	38
4.2	Laborparameter	39
4.2.1	Leukozyten.....	39
4.2.2	TNF- α	40
4.2.3	Interleukin-10	41
4.2.4	Interleukin-1 β	42
4.2.5	Interleukin-6	43
4.3	Hämodynamik.....	44
4.3.1	Mittlerer arterieller Blutdruck	44
4.3.2	Herzfrequenz	45
V	Diskussion.....	46
5.1	Methodik.....	46
5.2	Intravitalmikroskopie.....	48
5.2.1	Leukozytenadhärenz	48
5.2.2	Extravasation	53
5.3	Laborparameter.....	55
5.3.1	Leukozytenzahl	55
5.3.2	Interleukine	56
5.4	Hämodynamik.....	60
VI	Zusammenfassung	62
	Literaturverzeichnis	64
	Abkürzungsverzeichnis	72
	Abbildungsverzeichnis	75
	Danksagung.....	76
	Eidesstattliche Erklärung	77
	Lebenslauf	78
	Publikationsliste	79

I Einleitung

1.1 Sepsis

1.1.1 Epidemiologie

Der Sepsis und dem septischen Schock kommt aufgrund der unverändert hohen Letalität insbesondere im Bereich der Intensivmedizin eine besondere Bedeutung zu.

Allein in Deutschland wird jährlich bei etwa 79 000 (116 von 100.000) Einwohnern eine Sepsis und bei 75 000 (110 von 100.000) eine schwere Sepsis neu diagnostiziert, 60 000 Fälle davon enden letal. Die Prävalenz der Sepsis liegt bei Intensivpatienten in Deutschland bei 12,4% und der schweren Sepsis einschließlich des septischen Schocks bei 11%. Sepsis stellt die dritthäufigste Todesursache nach dem akuten Myokardinfarkt und der Herzinsuffizienz dar [1-2].

Die Behandlung der schweren Sepsis auf Intensivstationen verursacht jährliche Kosten von etwa 1.77 Milliarden Euro, was ca. 30% des Budgets von Intensivstationen ausmacht [2].

In den USA erkranken Jährlich 750.000 Menschen an schwerer Sepsis, Sepsis mit akuter Organdysfunktion oder septischem Schock wobei etwa 215.000 Fälle tödlich verlaufen [3]. Schwere Sepsis ist die führende Todesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen [4]. Die Sepsiserkrankungen erfordern langdauernde intensivmedizinische Versorgung. Dadurch entstehenden Kosten sind sehr hoch. Allein in den USA betragen die jährlichen geschätzten Kosten in Höhe von 16,7 Milliarden US- Dollar [5].

1.1.2 Definitionen

Der klinisch-infektologische Begriff der Sepsis geht auf eine Definition von Schottmüller aus dem Jahre 1914 zurück [6].

"Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, vom dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen, und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden."

Die Beobachtung, dass nicht nur eine infektiöse Triggerung zur Sepsis führt, sondern auch nicht-infektiöse Stimuli ein ähnliches Krankheitsbild wie die bakterielle Sepsis induzieren

können, führte zu einer Uneinheitlichkeit der Begriffe und einer Vielzahl unterschiedlich gebrauchter Synonyme.

Auf einer internationalen Konsensus-Konferenz des American College of Chest Physicians (ACCP) und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) im Jahr 1992 wurden Definitionen und Diagnosekriterien von Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock einheitlich festgelegt und im Jahr 2001 nochmals überarbeitet [7-8].

Tabelle 1: Diagnostische Kriterien der Sepsis nach den Kriterien der ACCP/SCCM Konsensus-Konferenz 2001.

Infektion	<ul style="list-style-type: none"> • Dokumentiert oder vermutet
Allgemeine Parameter	<ul style="list-style-type: none"> • Fieber ($>38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($<36^{\circ}\text{C}$) • Tachykardie: Herzfrequenz >90 /min oder 2 Standardabweichungen über dem altersentsprechenden Wert • Tachypnoe (Frequenz > 30/min) • veränderter mentaler Status • Hyperglykämie (Plasmaglukose > 110 mg/dl bei Ausschluß eines Diabetes mellitus) • signifikante Ödeme oder positive Flüssigkeitsbilanz (>20 ml/kg in 24 h)
Inflamationsparameter	<ul style="list-style-type: none"> • Leukozytose ($>12000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($<4000/\text{mm}^3$) oder $>10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild • C-reaktives Protein (CRP) > 2 Standardabweichungen oberhalb des Referenzbereichs • Procalcitonin im Plasma > 2 Standardabweichungen oberhalb des Referenzbereichs
Hämodynamische Parameter	<ul style="list-style-type: none"> • Arterielle Hypotension (systolischer arterieller Blutdruck < 90 mmHg, MAP < 70 mmHg, oder systolischer Blutdruckabfall > 40 mmHg bei Erwachsenen oder < 2 Standardabweichungen unter altersentsprechendem Referenzbereich) • Gemischtvenöse Sauerstoffsättigung (SvO₂) > 70 % • Herzindex > 3.5 l/min/m²
Parameter der Organdysfunktion	<ul style="list-style-type: none"> • Arterielle Hypoxie (PaO₂ / FiO₂ < 300 mmHg) • Akute Oligurie (Diurese $< 0,5$ ml/kg/h) • Kreatinin-Anstieg ($\geq 0,5$ mg/dl) • Gerinnungsstörungen (INR $> 1,5$ oder aPTT > 60 s) • Klinische Zeichen eines Ileus • Thrombocytopenie ($< 100.000/\mu\text{l}$) • Hyperbilirubinämie (Gesamtbilirubin > 4 mg/dl oder > 70 mmol/l)
Parameter der Gewebeperfusion	<ul style="list-style-type: none"> • Hyperlaktatämie (> 3 mmol/l) • Verminderter „capillary refill“ oder Marmorierung der Haut

Die schwere Sepsis ist eine Sepsis mit Zeichen der Organdysfunktion.

Der septische Schock ist definiert durch eine persistierende Hypotension, die trotz adäquater Volumensubstitution nicht behoben werden kann.

SIRS wird definiert, als systemische Reaktion auf verschiedene schwere infektiöse oder nicht-infektiöse Insulte, wenn zwei oder mehr der folgenden Symptome auftreten:

- Körpertemperatur $> 38^{\circ}\text{C}$ (oder $< 36^{\circ}\text{C}$)
- Herzfrequenz $> 90/\text{min}$
- Atemfrequenz $> 20/\text{min}$, oder $\text{PaCO}_2 < 32 \text{ mmHg}$
- Leukozytenzahl $> 12.000/\text{mm}^3$ oder $< 4.000/\text{mm}^3$ oder $> 10 \%$ unreife neutrophile Granulozyten

Die Sepsis ist eine systemische Reaktion auf eine Infektion, charakterisiert durch dieselben Kriterien wie ein SIRS. Sepsis ist ein dynamischer Prozess des Übergangs vom Stadium der einfachen Sepsis zur schweren Sepsis bzw. in den septischen Schock mit Organdysfunktion bzw. Organversagen.

Als Multiorganversagen (MOV) bezeichnet man das gleichzeitig oder in rascher zeitlicher Abfolge auftretende Versagen von zwei oder mehr vitalen Organsystemen. Das Multiorganfunktionssyndrom (MODS) geht als die initiale insuffiziente Leistung mehrerer Organe dem MOV voraus [9].

Zur besseren Charakterisierung septischer Patienten wurde das PIRO-System als zukünftiges Modell vorgeschlagen [8]. In Analogie zum etablierten TNM System bei Tumoren werden Patienten nach den folgenden Kriterien nach ihrem Risiko eingeordnet:

- Predisposition (Vorerkrankungen, Alter, Geschlecht)
- Insult (Erregerart, Resistenzprofil, Ort, Art und Ausmaß der Infektion)
- Response (Inflamationsreaktion, Fieber, Zytokine)
- Organ dysfunction (Anzahl betroffener Organsysteme)

Ziel des PIRO Systems ist es, die Sepsis bezüglich Schweregrad, Risiken und Prognose besser zu charakterisieren und damit eine effizientere Therapie zu ermöglichen.

Inwiefern ein solcher Ansatz wirklich eine Stratifizierung oder eine Prognose erlaubt, können nur zukünftige Studien evaluieren.

1.1.3 Pathogenese der Sepsis

Initialer Auslöser einer systemischen Entzündungsreaktion ist die Aktivierung des unspezifischen Immunsystems durch Toxine pathogener Keime, die nach Überwindung lokaler Barrieren in die Blutbahn gelangen. Es kommt zur Aktivierung humoraler und zellulärer Mediatorsysteme und dadurch, weitgehend unabhängig vom auslösenden Stimulus, zu erheblichen Störungen der Makro- und Mikrozirkulation. Das durch die Mikrozirkulationsstörungen verursachte Missverhältnis von Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot im Gewebe ist schon in der Frühphase der Sepsis nachweisbar.

Eine Funktionsstörung der autoregulativen Mechanismen der Gefäße führt zu Veränderungen des regionalen und kapillaren Blutflusses. Durch Einwirkung der proinflammatorischen Mediatoren Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Stickstoffmonoxid (NO) entstehen Regionen mit Vasodilatation und Vasokonstriktion direkt nebeneinander [10]. Das für die lokale Durchblutungsautoregulation verantwortliche Wechselspiel von Kapillarendothel, Prostazyklin (PGI₂), Thromboxan A₂ (TXA₂) und NO ist gestört [11]. Durch die Eröffnung von anatomischen arterio-venösen Shunts kommt es zur Perfusionsumverteilung zum Vorteil von Geweben mit einem höheren Sauerstoffbedarf auf Kosten der Sauerstoffversorgung von Geweben mit der geringeren metabolischen Aktivität [12]. Durch verstärkte Leukozyten-Endothel-Interaktion und ein Kapillarödem resultiert ein Sauerstoffmangel der Parenchymzelle [10, 13]. Anschließend kann es lokal zu Zellnekrosen kommen, die letztlich eine Organdysfunktion herbeiführen. Durch Aktivierung des Komplement- und Bradikinin-systems kommt es innerhalb der Endothelzelle zur Kontraktion des Zytoskeletts. Endothelschäden und Endothelkontraktionen führen zum Austritt vom Plasma in das Interstitium „Kapillarleck“ [14]. Klinische Konsequenz des Kapillarlecks ist die Minderdurchblutung der Organe mit entsprechenden Funktionsstörungen bei gleichzeitiger Ödembildung.

1.1.3.1 Endotoxin und Endotoxinrezeptoren

Den Hauptbestandteil der äußeren Zellwand gram-negativer Bakterien bildet Lipopolysaccharid (LPS). Jedes LPS-Molekül ist über den Lipidteil in der äußeren Membran verankert, die Polysaccharidkette erstreckt sich in den extrazellulären Raum.

Endotoxin ist ein Lipopolysaccharid (LPS) und besteht aus einer spezifisch antigenen Oligosaccharid-Region (O-Antigen), einem Kernpolysaccharid und dem für die Toxizität verantwortlichen Lipid A.

Lipid A besteht aus einem phosphorylierten Glucosamin-Disaccharid, das über Acyl- oder Amidbrücken mit langkettigen Hydroxyl-Fettsäuren substituiert ist [15].

Endotoxin entwickelt seine Toxizität nach Freisetzung aus der Bakterienwand und wird entweder während des Bakterienwachstums oder ihrer Zerstörung freigesetzt. Einmal aus der bakteriellen Zellmembran freigesetzt, bindet Endotoxin an verschiedene Serumproteine und Rezeptoren. Einige Endotoxin-Serumprotein-Interaktionen verändern die Endotoxinwirkung.

Die Bindung an HDL (high density lipoprotein) oder LDL (low density lipoprotein) oder das BPI (bactericidal permeability-increasing protein) führen zu einer Neutralisierung der Endotoxintoxizität.

Das LBP (lipopolysaccharide binding protein) / LPS-Komplex führt dagegen zur Verstärkung der Endotoxinwirkung [16].

Ein wichtiger Rezeptor für LPS ist das membranständige CD14 monozytärer Zellen. Die Affinität zum Rezeptor wird durch das von den Hepatozyten gebildeten LBP erhöht. Endothelzellen und glatte Muskelzellen, die keinen membranständiges CD14 besitzen, können durch einen LBP / sCD14 (lösliches CD14) / Endotoxin – Komplex aktiviert werden [17].

Aktivierte monozytäre Zellen zeigen vermehrte Chemotaxis, eine erhöhte Phagozytose- und Sekretionsaktivität. Bei den aktivierten Endothelzellen kommt es zur Expression von Adhäsionsmolekülen.

LBP

LBP wird als Akute-Phase-Protein in der Leber gebildet. Dieses Protein hat eine Größe von 60 kD. LBP bindet mit hoher Affinität an den Lipid A Teil des LPS und katalysiert die CD14

abhängige zelluläre Aktivierung durch LPS. Andererseits katalysiert LBP auch den Transfer von LPS zu endotoxinneutralisierendem HDL [16].

CD 14

CD 14 kommt im Organismus in zwei Formen vor: als membrangebundenes CD14 (mCD14) auf der Zelloberfläche reifen myeloischen Zellen und als lösliches CD14 im Serum (sCD14).

mCD14

mCD14 ist ein 53 kD membranassoziertes Glykoprotein, das sich besonders auf aktivierten Monozyten, Makrophagen und Granulozyten befindet. Der mCD14-Rezeptor ist über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI) in die Membranmatrix integriert und besitzt keine transmembranäre Signal-Domäne [18]. Das Signal wird vom assoziierten Toll-like-Rezeptor-4 und möglicherweise Toll-like-Rezeptor-2 in die Zelle übertragen [19-20].

sCD14

Eine lösliche Form von CD 14 (sCD14) entsteht durch proteolytisches Ablösen von mCD14 von der Zellmembran („shedding“) oder durch direkte Freisetzung aus den intrazellulären Depots. sCD14 kann Zellen aktivieren, die kein mCD14 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren wie z.B. Endothelzellen [17].

BPI

Bei dem BPI handelt es sich um ein Endotoxin bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 55-60 kDa.

BPI befindet sich in neutrophilen Granulozyten auf der Oberfläche und in den azurophilen Granula, in niedriger Konzentration wird es auch im Plasma gefunden. Bei septischen Patienten wurden BPI-Plasmaspiegel um den Faktor 100 höher als normal gefunden. BPI besitzt 45% strukturelle Homologie mit LBP. Es hat eine sehr hohe Affinität zu den Lipopolysacchariden (LPS) gram-negativer Bakterien und vermittelt auf diesem Wege seine LPS-neutralisierende Wirkung [16, 21].

1.1.3.2 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Im Rahmen inflammatorischer und immunologischer Prozesse kommt es zur Migration phagozytosefähiger Leukozyten aus dem Blut in benachbartes Gewebe, dies ist für die zelluläre Immunabwehr essentiell und findet hauptsächlich in kleinen venösen Gefäßen, den postkapillären Venolen statt [22]. Eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und auf Endothelzellen vermittelt und kontrolliert die Adhäsion der Blutzellen an die Gefäßwand. Dieser Prozess verläuft in mehreren regulierten Schritten und wird als Adhäsionskaskade bezeichnet [22-23]. Eingeleitet wird die Kaskade durch die Freisetzung von Mediatoren wie z.B. Histamin, Thrombin, Sauerstoffradikalen, aktivierten Komplementfaktoren, LPS, TNF- α und IL-1 [24-25].

Zunächst vermitteln die Selektine, eine Familie von Adhäsionsmolekülen, den initialen Kontakt und das Rollen der Leukozyten auf der Endotheloberfläche (Rolling). Dies führt zur Verlangsamung der Leukozyten und zur Aktivierung von Integrinen auf der Leukozytenoberfläche, die dann die feste Bindung dieser Zellen an die Endotheloberfläche vermitteln (Sticking). Die stabil adhärenen Leukozyten können sich gezielt fortbewegen und schließlich aktiv durch die Endothelzellschicht hindurchwandern.

1.1.3.2.1 Temporäre Adhärenz (Rolling)

Der erste Kontakt zwischen den Leukozyten und dem Gefäßendothel wird durch Adhäsionsmoleküle der Selectin-Familie vermittelt. Dies führt zu einem Phänomen, das als "Rolling" beschrieben wird, dem Rollen von Leukozyten an der inneren Wand der Blutgefäße [26-29]. Die rollenden Leukozyten haben eine typische Geschwindigkeit von ca. 50 $\mu\text{m/s}$ [30].

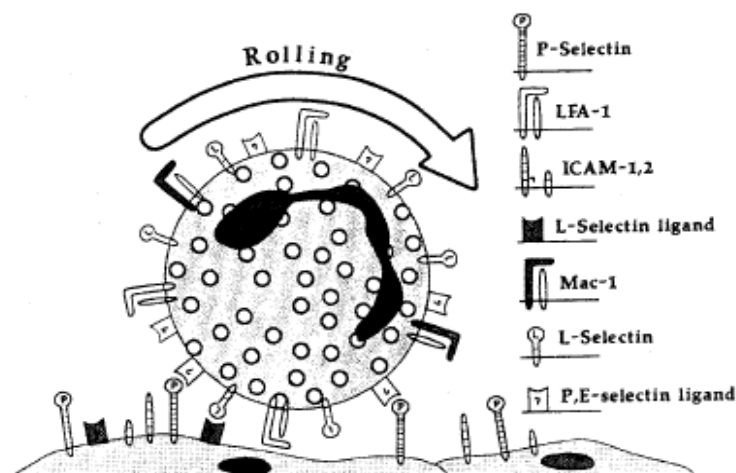


Abbildung 1: Leukozytenrolling [30]

Selektine

Selektine sind lang gestreckte membrangebundene Glykoproteine, die entsprechend ihrer Ursprungszellen in (L - Leukozyten, E - Endothel und P- Plättchen) L-, E-, P-Selektine eingeteilt werden [25]. Selektine unterscheiden sich im Wesentlichen durch ihre Kettenlänge. Dabei besitzen Selektine eine sich gleichende NH₂-terminale extrazelluläre Domäne, mit der es ihnen gut gelingt, vorbeikommende Leukozyten mit entsprechender Rezeptorexpression zu binden. Alle drei Selektine haben homologe Strukturen, die in fünf Domänen und eine membran-nahe Spaltungsregion eingeteilt werden [31]. (siehe Abbildung 3)

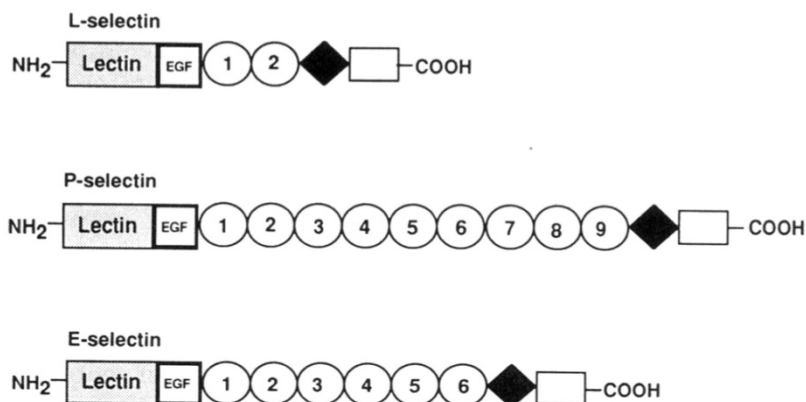


Abbildung 2: Selektin-Domänen [31]

Selektin-Domänen:

1. N-terminalen Lectin Domäne
2. Epidermal-growth-factor-(EGF) Domäne
3. Variable Anzahl von Complement-regulatory-like Modulen
4. Membrandomäne (◆)
5. Zytoplasmatische Domäne

L-Selektin

L-Selektin ist ein essentielles Selektin, das Leukozyten-Rolling vermittelt.

Es ist auf fast allen zirkulierenden Leukozyten nachweisbar und wird im Gegensatz zu E- und P-Selektin konstitutiv exprimiert. Es fungiert als „homing receptor“ in Lymphknoten [32]. Es besteht aus 444 Aminosäuren.

Nach Aktivierung der Leukozyten wird L-Selektin innerhalb weniger Minuten proteolytisch von der Zelloberfläche abgespalten. Die Modulation der L-Selektin-Funktion im Entzündungsprozeß wird, im Gegensatz zu den anderen beiden Selektinen, zusätzlich durch die entsprechende Ligandenexpression kontrolliert. Es bindet an sialysierte, fukosylierte und sulfatierte Glykoproteine und Glykolipide, die das Sialyl-Lewisx-Antigen (SLe^x) enthalten und übernimmt so das primäre Andocken der Granulozyten an die Endothelbarriere. Es besitzt sowohl Liganden- als auch Rezeptorfunktion [30].

E-Selektin

E-Selektin ist ein 110 kDa schweres Glykoprotein und wird von Endothelzellen nach Aktivierung durch Zytokine, insbesondere IL-1, TNF- α oder LPS exprimiert [33-35]. Nach Aktivierung wird E-Selektin kontinuierlich neu synthetisiert, die maximale Proteinkonzentration wird erst nach 4-8 Stunden erreicht. E-Selektin hat eine relativ geringe Halbwertszeit von wenigen Stunden, da es wesentlich schneller als die meisten anderen Membranproteine internalisiert wird, über Endosomen in Lysosomen gelangt und abgebaut wird [36-37]. Die Degradation der Oberflächenexpression von E-Selektin geschieht über Endozytose und intralysosomale Proteolyse, sowie über proteolytische Abspaltung der löslichen Anteile. Die SLex- Karboanhydratstruktur des CD62L auf neutrophilen Granulozyten ist ein Ligand von E-Selektin [38]. Nach ca. 24 Stunden verringert sich die Proteinsynthese, und es werden wieder die niedrigen Ausgangswerte erreicht [39]. An E-Selektin binden Granulozyten, Monozyten und einige T-Zell-Subpopulationen. E-Selectin spielt eine wichtige Rolle bei der Granulozytenmigration durch zytokinaktivierte Endothelzellen [31].

P-Selektin

P-Selektin ist ein 140 kDa schweres transmembranöses Glykoprotein, welches die Bindungen zwischen Neutrophilen und Thrombozyten bzw. Neutrophilen an Endothelzellen vermittelt [40]. P-Selektin wird in den α -Granula der Thrombozyten und in den Weibel-Palade-Körpern der Endothelzellen gespeichert. Die Expression von P-Selektinen nach Stimulierung durch Histamin oder Thrombin läuft innerhalb weniger Minuten ab. Die Expression ist jedoch nicht dauerhaft und scheint somit nur in der Frühphase der Leukozytenadhäsion von Bedeutung zu sein [41]. Durch Zellaktivierung mit Zytokinen oder Lipopolysacchariden wird P-Selektin neu synthetisiert [42]. Die Downregulation von P-Selektinen geschieht durch Endozytose und dauert ca. 30-60 Minuten. Der größere Anteil des P-Selektins wird in den Lysosomen abgebaut und der andere Anteil wird in den Weibel-Palade-Körper gespeichert und steht damit sofort wieder zur Verfügung [43].

1.1.3.2.2 Feste Adhärenz (Sticking)

Voraussetzung für die Auswanderung der Leukozyten aus den Blutgefäßen ist die feste Anheftung von Leukozyten an das Endothel der Gefäße, was durch Integrine und deren Liganden vermittelt wird. Die häufig benutzte Definition für einen fest adhärenenten Leukozyten (Sticker) in postkapillaren Venolen ist das stationäre Verharren an der Endotheloberfläche für mindestens 30 Sekunden [44].

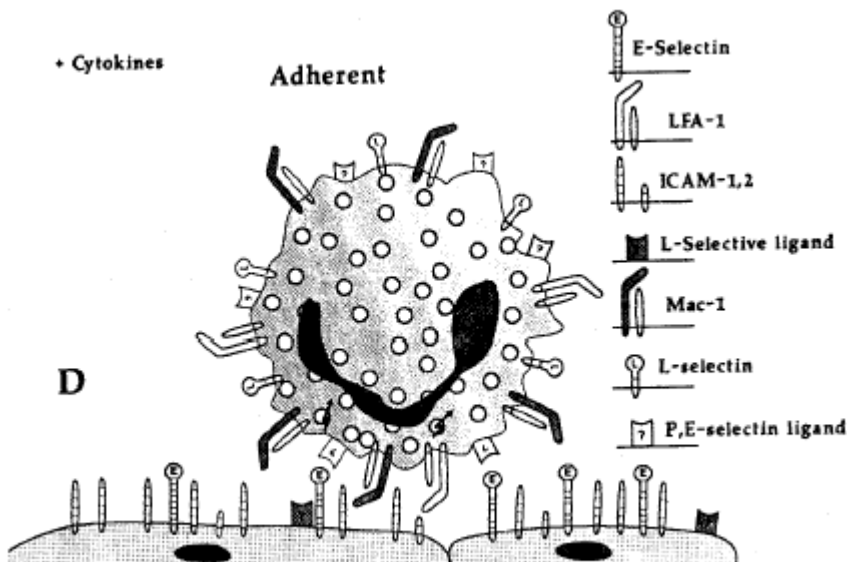


Abbildung 3: Leukozytensticking [30]

Integrine

Integrine sind langgestreckte, heterodimere Adhäsionsrezeptoren. Sie bestehen aus einer α - (CD11a-c) und einer β - (CD18)-Kette, die nicht-kovalent miteinander verknüpft sind [45]. Viele Integrine werden an der Zelloberfläche exprimiert, sind aber inaktiv und müssen erst aktiviert werden. Die Subfamilie der β 2-Integrine kommt ausschließlich auf weißen Blutzellen vor und wird je nach synthetisierenden Zelltypen unterschieden. Auf Lymphozyten werden sie als LFA-1 (Lymphocyte function associated antigen-1, Syn.: CD11c/CD18) und auf Granulozyten/Monozyten als MAC-1 (Syn.: CD11a/CD18) bezeichnet [46].

Nach Aktivierung der Leukozyten durch proinflammatorische Mediatoren kommt es über eine innermolekulare Konformationsänderung zu einer Steigerung der Bindungsaffinität der β 2-

Integrine (functional upregulation) und zu einer Erhöhung ihrer Zahl auf der äußeren Zellmembran (numeric upregulation) [47].

Integrine binden an endothelseitige Adhäsionsmoleküle der Immunglobulin-Superfamilie und vermitteln so eine stabile Adhäsion. Zu dieser Familie gehört das Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) und ICAM-2. ICAM-1 ist der wichtigste physiologische Ligand für Integrine auf dem Endothel. Seine Synthese wird durch Zytokine wie TNF- α und IL-1 stimuliert. ICAM-2 wird im Gegensatz zu ICAM-1 auch an nicht aktivierten Endothelzellen gefunden. Die Synthese und Expression von ICAM-2 wird von den Entzündungsmediatoren nicht beeinflusst. Aus diesem Grund wird ICAM-2 eine Bedeutung bei der Lymphozyten-Rezirkulation zugeschrieben [48].

1.1.4 Bedeutung des Intestinums

Im Rahmen einer Sepsis kommt es zu einer Zentralisation des Kreislaufs mit einer Perfusionsumverteilung zugunsten lebenswichtiger Organe wie Herz und Gehirn. Nachfolgend kommt es u.a. zu einer Minderperfusion des Splanchnikusgebietes. Das fortbestehende Perfusionsdefizit führt zur Stase im Splanchnikusgebiet, wodurch es zu einer Störung der Mukosabarriere mit Translokation von Bakterien oder Bakterienprodukten aus dem Darm kommt. Aufgrund der Anatomie der kleinsten mikrozirkulatorischen Einheiten, der Darmvilli, kann es unter Minderperfuionsverhältnissen sehr frühzeitig zu einer Minderversorgung der Zottenspitzen mit nachfolgender Ausbildung von Zottennekrosen kommen. Dadurch wird die enterale Schleimhautbarriere so beeinträchtigt, dass eine vermehrte Translokation von Bakterien und deren Toxinen möglich wird. Viele experimentelle Studien zeigten im Rahmen verschiedener Sepsismodelle, dass es zu einer Störung der mukosalen Integrität kommt. Es konnten sowohl lebendige als auch avitale Bakterien bzw. deren Zerfallsprodukte, insbesondere Wandbestandteile, in den Lymphknoten des Mesenteriums und im Pfortaderblut nachgewiesen werden [49].

Eine wesentliche Bedeutung für die Behandlung oder Prävention der Sepsis kann daher eine frühzeitige Wiederherstellung der Splanchnikusdurchblutung haben.

1.1.5 Endothelschädigung und Plasmaextravasation

Das Endothel bildet eine selektiv durchlässige Barriere zwischen dem Gefäßlumen und dem Interstitium. Für den transendothelialen Stoffaustausch stehen hauptsächlich zwei Wege zur Verfügung. Parazellulär im Bereich der Zell-Zell-Kontakte passiert der größte Anteil von gelösten Substanzen und Makromoleküle die endotheliale Barriere durch Diffusion und Konvektion. Zusätzlich können Makromoleküle in zytoplasmatischen Vesikeln das Endothel passieren [50-51]. Das Endothel ist gegenüber multiplen Pathogenen, ihren Toxinen sowie Mediatoren der zellulären und humoralen Immunantwort dauernd exponiert.

Unter pathophysiologischen Umständen kann die endotheliale Schrankenfunktion versagen. Eine Steigerung der parazellulären Permeabilität führt zur Zunahme der Makromolekül- und Flüssigkeitsextravasation [52]. Ein dadurch resultierendes extrazelluläres Ödem kann die Funktion des betroffenen Organs durch Verschlechterung der Nährstoffzufuhr und Verminderung der Hämoperfusion gefährden. Das resultierende Gewebeödem ist ein früher Indikator der Organdysfunktion und geht dem Organversagen voraus.

Wenn es zu einer Erhöhung der endothelialen Permeabilität für Makromoleküle kommt, sind therapeutische Ansätze zu einer Erhöhung des onkotischen Drucks im Plasma wirkungslos, weil sie nur die gesteigerte Wasserpermeabilität bekämpfen. Eine Möglichkeit, die endotheliale Schranke zu stabilisieren, auch wenn sich die Einflussnahme toxischer, entzündlicher oder anderer Faktoren nicht vermeiden lässt, ist die Therapie mit Faktor XIII (Transglutaminase).

Das Endothel spielt an der Regulation der entzündlichen Reaktion eine wichtige Rolle. Die Aktivierung von Endothelzellen im Rahmen inflammatorischer Prozesse führt zum weitgehenden Verlust antikoagulatorischer und zelladhäsionshemmender Eigenschaften.

Die Stimulation durch Zytokine wie TNF- α verursachen in Endothelzellen die Produktion und Freisetzung von Zytokinen, chemo- und vasoaktiven Faktoren, die Expression prokoagulatorischer Faktoren auf der Endotheloberfläche sowie die Hochregulation von Adhäsionsmolekülen [53].

1.2 Therapiekonzepte bei Sepsis

Trotz zunehmendem Erkenntnisgewinn auf dem Gebiet der Sepsis-Forschung ist die Therapie schwierig und Mortalität weiterhin sehr hoch. Einen wichtigen Einfluss auf den Krankheitsverlauf von septischen Patienten haben eine frühestmögliche Diagnose und eine rechtzeitige und gezielte Therapie.

Leitlinien zur Diagnose und Therapie der Sepsis wurden von der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. zusammen mit der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin entwickelt und 2010 zum ersten Mal revidiert [2, 54].

1.2.1 Kausale Therapie

Die vollständige chirurgische Fokussanierung ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Therapie. Die kalkulierte antibiotische Therapie sollte möglichst frühzeitig begonnen und auf das Risikoprofil des Patienten und das Resistenzmuster der jeweiligen Intensivstation ausgerichtet werden.

1.2.2 Supportive Therapie

Die supportive Therapie umfasst die Unterstützung gestörter Organfunktionen.

Primäres Ziel der hämodynamischen Stabilisierung ist das Erreichen eines adäquaten zellulären O₂-Angebotes. Zielkriterien in der frühen Phase der hämodynamischen Stabilisierung sind ein zentralvenöser Druck (ZVD) ≥ 8 bzw. ≥ 12 mmHg unter mechanischer Beatmung, ein mittlerer arterieller Druck (MAP) von ≥ 65 , eine zentralvenöse Sauerstoffsättigung (ScvO₂) ≥ 70 %, eine Diurese $\geq 0,5$ ml/kgKG/h und ein Laktat $\leq 1,5$ mmol/l.

Die erste Maßnahme stellt hier die Volumensubstitution dar. Besteht trotz Volumentherapie weiterhin ein eingeschränktes Herzzeitvolumen, so wird Dobutamin als positiv inotropes Katecholamin der ersten Wahl infundiert. Wird durch die ausreichende Volumensubstitution kein adäquater arterieller Mitteldruck > 65 mmHg erreicht, ist die Applikation eines Vasopressors indiziert. Als Mittel der Wahl wird Noradrenalin eingesetzt.

Bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock sollte die Indikation zur Intubation und Beatmung großzügig gestellt werden. Zu den Indikationen gehören schwere Tachypnoe > 35 /min, muskuläre Erschöpfung, eingeschränkte Vigilanz und ein Sättigungsabfall < 90 %

trotz Sauerstoffinsufflation. Besteht die Indikation zur maschinellen Ventilation, sollte diese mit niedrigen Atemzugvolumina von 6 ml/kg, einem Plateaudruck von <30 cmH₂O und einem optimierten PEEP durchgeführt werden.

1.2.3 Adjunktive Therapie

Eine adjunktive Therapie der Sepsis wird definiert als eine Behandlung zusätzlich zur kausalen und supportiven Therapie.

Bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock kann eine intravenöse moderate Insulintherapie zur adäquaten Blutzuckereinstellung (Schwellenwert von >150 mg/dl (>8,3 mmol/l)) erwogen werden.

Eine niedrig dosierte Hydrocortisontherapie wird in der Behandlung von Patienten mit septischem Schock nicht mehr empfohlen. Nur bei Patienten mit therapiefraktärem septischem Schock die trotz Volumentherapie und einer hochdosierten Therapie mit Vasopressoren nicht zu stabilisieren sind kann eine niedrig dosierte Hydrocortisontherapie (200–300 mg/Tag) als Ultima-Ratio erwogen werden.

Rekombinantes aktiviertes Protein C (rhAPC) senkt die 28-Tage-Sterblichkeit bei Patienten mit schwerer Sepsis von 30,8 auf 24,7 % [55].

1.2.4 Weitere Therapieansätze

Eine Reihe von weiteren Substanzen und Verfahren zur Sepsis-Therapie wurden in experimentellen und klinischen Settings untersucht. Diese verfolgen unterschiedliche pathophysiologisch begründete Ansätze. Trotz oft möglich günstiger Effekte konnten aber nur wenige Substanzen einen Einzug in die klinische Praxis finden.

Im Rahmen einer Sepsis kommt es zu einer überschießenden Aktivierung der Gerinnungskaskade, des Komplementsystem und des Kallikrein-Kinin-Systems.

Eine therapeutische Möglichkeit ist die Beeinflussung einer überschießenden Gerinnung durch die Substitution von Gerinnungsinhibitoren. Die häufigste therapeutische Intervention bei Patienten mit Verbrauchskoagulopathie ist die Substitution von Gerinnungsfaktoren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen die Wirkungen des C1-Esterase-Inhibitors sowie des Faktors XIII bei experimenteller Endotoxinämie erforscht werden.

1.3 C1-Esterase-Inhibitor

C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) ist ein Enzym mit vielen Funktionen. Es ist ein 105 kD schweres Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von vierzig Prozent. Seine Konzentration im menschlichen Plasma beträgt etwa 240 mg/l. Gebildet wird das Enzym überwiegend in den Parenchymzellen der Leber, geringfügig auch in Monozyten, Hautfibroblasten und endothelialen Zellen der Nabelschnur [56]. C1-Esterase-Inhibitor hemmt den klassischen Aktivierungsweg der Komplementkaskade durch Inaktivierung der enzymatisch aktiven Komplementkomponenten C1s und C1r [57]. Außerdem inhibiert C1-INH weitere Kaskadensysteme, vor allem das Gerinnungssystem, das Kallikrein-Kinin-System sowie die Fibrinolyse [58]. Das Kallikrein-Kinin-System wird auch als das Kontaktsystem bezeichnet. Das Kontaktsystem besteht aus Faktor XII, Faktor XI, Präkallikrein und dem hochmolekularen Kininogen [59].

Im Verlauf einer Sepsis kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems, des Kallikrein-Kinin-Systems und der Gerinnung. Die Aktivierung dieser plasmatischen Kaskadensysteme ist assoziiert mit einem Multiorganversagen und trägt zur hohen Mortalität der schweren Sepsis und des septischen Schocks bei.

Das Komplementsystem ist ein kaskadenartig ablaufender Abwehrmechanismus. Die Aktivierung des Komplementsystems stellt einen frühen Mechanismus dar, der die systemische Entzündungsreaktion triggert und verstärkt. Erhöhte Konzentrationen von aktiviertem Komplement sind eng mit der Sepsisletalität assoziiert [60].

Der klassische Weg der Komplementkaskade wird durch Antigen-Antikörper-Komplexe oder durch den aktivierten Faktor XII aktiviert [61]. Endotoxine können den alternativen Aktivierungsweg des Komplementsystems direkt aktivieren [57]. Die Komplementaktivierung führt zur Entstehung der Faktoren C3a, C4a und C5a. Diese Komponenten führen zu Chemotaxis und Anregung der neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Mastzellen zur Produktion und Freisetzung von Mediatoren, ausgeprägter Vasodilatation mit erhöhter Kapillarpermeabilität und Kontraktion der glatten Muskelzellen [57, 62-63]. Die Komplementaktivierung, entweder auf dem klassischen oder alternativen Aktivierungsweg,

führt schließlich zur Bildung des Membran-Angriffskomplexes (C5b-C9). Dies verursacht eine Lyse der Zielzelle oder des Mikroorganismus, aber auch eine Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen [57, 64].

Die Aktivierung des Komplementsystems ist für eine wirksame Bekämpfung von Bakterien notwendig [65]. Aber für den Patienten mit Sepsis ist es nicht immer von Nutzen, weil zu starke Komplementaktivierung den Verlauf der Erkrankung verschlechtern kann [66].

Die Opsonierung der Mikroorganismen wird durch C1-INH nicht beeinträchtigt, weil die Komplementaktivierung immer noch durch den alternativen Weg möglich ist. Deswegen hat die Gabe von C1-INH große Vorteile in der Regulierung der Komplementaktivierung.

Jansen et al. zeigten in einem Sepsismodell an Pavianen, dass eine Erhöhung des Plasmaspiegels von C1-INH um das etwa 5- bis 10-fache zu einer Verbesserung der Überlebensrate führt. Gleichzeitig beobachteten die Autoren eine Verringerung der Komplementaktivierung insbesondere von C4 und was besonders wichtig ist, keine Beeinträchtigung der Bakterien-Clearance durch Applikation von C1-INH [67].

Bei Patienten mit Sepsis und septischem Schock konnten einige Autoren eine Verminderung des Plasmaspiegels von Faktor XII, Präkallikrein und Faktor XI nachweisen [68-70]. Zugleich fanden sich erhöhte Spiegel von Kallikrein-C1-Inhibitor, Faktor XIIa - C1-Inhibitor und Faktor XIa - C1-Inhibitor [68-69, 71]. Die Aktivierung des Kontaktsystems im Rahmen einer Sepsis führt über Freisetzung von Bradykinin, direkt oder indirekt über die Freisetzung von Stickstoffmonoxid und Prostacyclin zu einer ausgeprägten Vasodilatation mit erhöhter Gefäßpermeabilität [72-73]. Pixley et al. verdeutlichten in einem Sepsismodell an Pavianen eine wichtige Rolle der Kontaktaktivierung an der Entstehung einer Sepsis. In diesem Modell wurde durch die Gabe eines monoklonalen Antikörpers gegen Faktor XII eine Besserung der hypotensiven Kreislagsituation mit einer verbesserten Überlebensrate der behandelten Tiere beobachtet. Die Gerinnungsaktivierung ließ sich aber nicht verhindern [72].

Das Kontaktsystem ist über die Aktivierung von Faktor IX durch Faktor XIa mit dem intrinsischen Gerinnungssystem und über die Aktivierung von C1 durch Faktor XIIa mit dem Komplementsystem verbunden [61].

In Rahmen einer Sepsis wird C1-INH vermutlich durch die enzymatische Wirkung der Neutrophilenelelastase abgebaut und inaktiviert [74]. Dies korreliert mit der Mortalität bei Patienten mit Sepsis [75].

1.4 Faktor XIII

Der Gerinnungsfaktor XIII ist das Proenzym einer Transglutaminase, die im Plasma als inaktives Zymogen vorliegt. Faktor XIII kommt in zwei Formen vor: als Plasma- und als Zellprotein. Im Plasma liegt der Faktor XIII als tetramerer Komplex vor. Dieser Komplex besteht aus zwei globulären A-Untereinheiten (Faktor XIII A) mit einer Molekularmasse von 83.000 und zwei langen, elastischen, fibrillären B-Untereinheiten mit einer Molekularmasse von 83.000 (Faktor XIII B) (A_2B_2). Die enzymatische Aktivität, die Thrombinbindungsstelle, die Kalziumbindungsstelle und das Aktivierungspeptid besitzt ausschließlich die A-Untereinheit [76-77]. Die zellständige Form des Faktors XIII ist in Monozyten, Makrophagen und Thrombozyten nachweisbar und liegt dort als Homodimer (A_2) vor. Faktor XIII B wird in der Leber synthetisiert und freigesetzt. In Megakaryozyten, Monozyten und ihren Abkömmlingen wird Faktor XIII A synthetisiert. Megakaryozyten sind die Hauptquelle der Untereinheit A im Plasma. Nach Austritt aus diesen Zellen verbinden sich im Plasma zwei A-Untereinheiten mit zwei B-Untereinheiten zu einem tetrameren Komplex (A_2B_2).

Faktor XIII wird aktiviert, indem Thrombin ein Aktivierungspeptid von der A-Untereinheit entfernt. In Anwesenheit von Kalzium kommt es zur Dissoziation der beiden A-Untereinheiten von den B-Untereinheiten, dadurch wird das aktive Zentrum freigelegt. Es entsteht die enzymatisch aktive Transglutaminase, die Peptidketten über ϵ -(γ -Glutamyl)lysyl-Isopeptidbindungen verbindet. Die bekannte Funktion des Faktor XIII ist die Fibrinmonomere durch eine Dimerisation der γ -Ketten und eine Polymerisation der α -Ketten zu einem stabilen Thrombus zu vernetzen [78]. Zur weiteren Stabilität des Thrombus wird α_2 -Antiplasmin eingebaut und auf diese Weise vor dem Abbau durch Plasmin geschützt [79].

Darüber hinaus scheint Faktor XIII an der Zelladhäsion und Zellmigration, der Gewebereparatur und der Wundheilung, sowie dem Aufbau der extrazellulären Matrix beteiligt zu sein [80-84]. Diese Wirkungen werden auf die Eigenschaft des Faktor XIII zurückgeführt, eine Reihe von Komponenten in der extrazellulären Matrix zu vernetzen, wie zum Beispiel Vitronektin, Fibronektin und Kollagen [81, 85-86]. Dadurch mindert Faktor XIII die Permeabilität der endothelialen Schranke. Diese Proteinvernetzung bildet für Makromoleküle, die die Endothelzellschichten parazellulär durchqueren, ein Passagehindernis [87-88].

1.5 Sepsismodelle

Bei den Tiermodellen zur Induktion einer Sepsis unterscheidet man prinzipiell zwischen Modellen ohne infektiösen Fokus und Modellen mit infektiösem Fokus [89].

Bei Sepsismodellen ohne infektiösen Fokus werden Endotoxin (LPS) oder Bakterien parenteral verabreicht. LPS (Lipopolysaccharid) ist ein Zellmembranbestandteil gram-negativer Bakterien.

FREISE et al. unterteilen Sepsis-Modellen mit infektiösem Fokus in drei Gruppen:

1. Modelle mit kontrollierter Inokulation
2. faeciale Sepsis
3. Perforations-Modelle

Sepsis wird induziert durch:

1. Bakterienkulturen
2. intraperitoneal eingebrachte Faeces
3. Darmperforation

Die Bauchhöhle ist in der Regel der Ort für den experimentell erzeugten infektiösen Fokus. Dadurch kann das klinische Bild einer Peritonitis, eine der häufigsten Sepsis-Ursachen, simuliert werden.

Sepsismodelle mit Implantation von Faeces oder lebenden Erregern in die freie Bauchhöhle führen zu einer Peritonitis und beginnen oft wie beim Menschen mit einer hyperdynamen Phase.

Die häufig angewandte Methode „caecal ligation and puncture“ (CLP). wurde erstmals 1980 von *Wichterman* et al beschrieben [90]. Dabei wird das Caecum distal der Ileozökalklappe ligiert und durch Nadelstiche perforiert. So gelangen Darmbakterien in die Bauchhöhle und verursachen eine Peritonitis. Bei den meisten Tieren kommt es zum septischen Schock innerhalb von 24 bis 48 Stunden. Die starke Ähnlichkeit zum klinischen Verlauf einer Sepsis ist der Vorteil dieser Methode. Die Nachteile sind eine schlechte Standardisierung der Ausprägung der Sepsis, schlechte Quantifizierbarkeit der exakten Dosis und der Art sepsisauslösender Mikroorganismen sowie die lange Versuchszeiten.

Endotoxin wird in den Sepsismodellen ohne infektiösen Fokus parenteral verabreicht. Dabei unterscheidet man zwischen bolusartiger und kontinuierlicher Applikation. TRABER et al.

(1989) untersuchten in einer Studie mit Schafen die kardiopulmonalen Effekte von LPS in steigenden Dosierungen. Eine kontinuierliche LPS-Infusion mit Dosierungen von 6 bis 24 ng/kgKG/h ergab eine stabile hyperdynamie kardiopulmonale Situation. Im Gegensatz dazu führte eine Bolusinjektion zu einer hypodynamen Kreislaufsituation [91].

Um kurzfristig verschiedene Sepsis-Phasen zu modellieren ist die intravenöse LPS-Infusion am besten geeignet. Die Arbeitsgruppe Fink et al. zeigte in einem Sepsismodel an Kaninchen, dass es durch eine intravenöse LPS-Infusion, je nach Höhe der Dosierung, zu einem hyperdynamen oder hypodynamen Stadium der Sepsis kommen kann. Bei einer LPS Dosierung von 5 mg/kgKG kam es zu einer hypodynamen Antwort mit einem erniedrigten Herzzeitvolumen und einem erhöhten peripheren Widerstand. Eine Dosisreduktion auf 1-3 µg/kgKG LPS führte zu einer hyperdynamen Antwort, ähnlich dem frühen Stadium der humanen Sepsis [92].

Bei dem Endotoxin-Modell gibt es aber auch Einschränkungen. Es ist zu beachten, dass die Sensitivität gegenüber Endotoxin bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich ist. Uneinheitliche Reaktionen auf LPS gibt es auch innerhalb der Spezies, was von vielen Faktoren wie z.B. Geschlecht, Alter, Fütterung oder auch bestehenden Infektionen beeinflusst wird [89, 93]. Nachteilig ist auch, dass kein vollwertiges Bakterium als Agens dient, sondern nur ein Bakterienbestandteil. Die Vorteile des Endotoxin-Modells sind die genauere Quantifizierbarkeit des Agens und ein genau reproduzierbarer Symptom-Zeit-Verlauf. Schon 30 - 45 Minuten nach Applikation des Endotoxins werden pathophysiologische Veränderungen erzielt, die denen der Sepsis ähnlich sind [94].

Durch Versuche an freiwilligen Probanden wurde bereits gezeigt, dass durch intravenöse Verabreichung von LPS in sogar geringen Dosen von 4 ng/kg KG ähnliche hämodynamische, hämatologische und metabolische Veränderungen hervorgerufen werden, wie sie während der frühen Phase eines an Sepsis erkrankten Patienten zu beobachten sind [95-96]

II Fragestellung

Der Darm spielt eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Multiorganversagens bei Sepsis und wird als „Motor des Multiorganversagens“ bezeichnet [97].

Im Rahmen einer Endotoxinämie kommt es zur Aktivierung des Komplementsystems, des Kontaktsystems und des Gerinnungs-Fibrinolyse-Systems. Eine wichtige pathophysiologische Bedeutung haben dabei Störungen der Mikrozirkulation, wie verstärkte Leukozyten-Endothel-Interaktion und die Störung der endothelialen Integrität mit anschließender Ödembildung und Organfunktionsstörung.

Wir untersuchen den Einfluss der Kombination von C1-Esterase-Inhibitor mit Faktor XIII auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion und die Plasmaextravasation im Mesenterium.

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden.

1. Welchen Einfluss hat die Kombination von C1-Esterase-Inhibitor mit Faktor XIII auf die endotoxininduzierte Plasmaextravasation sowie Leukozyten-Endothel-Interaktionen?
2. Welchen Einfluss hat die Kombination von C1-Esterase-Inhibitor mit Faktor XIII auf die Plasmaspiegel der TNF- α , IL-10, IL-6 und IL-1 β bei Endotoxinämie?
3. In welchem Maß beeinflusst die Therapie mit der Kombination von C1-Esterase-Inhibitor mit Faktor XIII die Leukozytenzahl im peripheren Blut?

III Material und Methodik

3.1 Tiere und Tierhaltung

Die Studie wurde an 30 männlichen, Wistar Ratten im Alter von 6-7 Wochen mit einem mittleren Körpergewicht von 230 ± 30 g durchgeführt. Die Versuchsreihen unterlagen den Richtlinien für die Durchführung von Tierversuchen nach § 2 sowie §8 des Tierschutzgesetzes und wurden von der zuständigen Senatsbehörde für Gesundheit des Landes Berlin genehmigt (G 0133/00). Die Versuche wurden in der Zeit von September 2002 bis Dezember 2002 im Labor für Intravitalmikroskopie der anästhesiologischen Forschungsabteilung der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin, Campus Charité Mitte, Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die Tiere wurden in einem klimatisierten Raum (Raumtemperatur: 25°, Luftfeuchtigkeit: 55-60%) in Standardkäfigen auf entstaubter Holzgranulateinstreu gehalten. Die künstliche Beleuchtung erfolgte im 12-Stunden-Rhythmus. Futter (Altromin[®], Altromin GmbH, Lage, Deutschland) und Wasser stand ihnen ad libitum zur Verfügung. Eine Woche nach Anlieferung wurden die Tiere im Versuch eingesetzt. Die Tiere wurden 12 Stunden vor Versuchsbeginn nüchtern gesetzt mit freiem Zugang zu Wasser

3.2 Gruppeneinteilung

Die Tiere wurden in 3 randomisierte Gruppen zu je zehn Tieren eingeteilt.

1. Kontroll-Gruppe: NaCl 0,9% als Placeboinfusion
2. Endotoxin-Gruppe: LPS 10 mg/kg Körpergewicht (KG)
3. C1-INH+FXIII-Gruppe: LPS 10 mg/kg KG + C1-Esterase-Inhibitor 100 I.E./kg KG + Faktor XIII 50 I.E./kg KG

3.3 Versuchsablauf

Alle Versuche wurden nach einem einheitlichen Protokoll durchgeführt. Die gesamte Präparationsdauer betrug ca. 30 Minuten. Sie beinhaltete das Einlegen der intravasalen Katheter, die Tracheotomie und die mediane Laparotomie. Nach Beendigung der Präparation folgte eine Ruhephase von 15 Minuten. Anschließend erfolgte die erste Intravitalmikroskopie

(IVM) mit Videoaufzeichnung. Danach wurde die Endotoxinämie durch Dauerinfusion von LPS über 2 h induziert.

Die intravitalmikroskopische Untersuchung wurde zu drei Zeitpunkten durchgeführt.

- Zeitpunkt 1: kurz vor LPS-Applikation
- Zeitpunkt 2: 60 Minuten nach LPS-Applikation
- Zeitpunkt 3: 120 Minuten nach LPS-Applikation

Die Applikation der Medikamente wurde 30 Minuten nach LPS-Applikation als Bolusinjektion vorgenommen. Blutentnahmen erfolgten zu drei Zeitpunkten kurz vor LPS – Applikation und 90-, 180-Minuten danach. Am Ende der Versuche wurden die Tiere in tiefer Narkose mit einer intravenösen Überdosis Chloralhydrat euthanasiert.

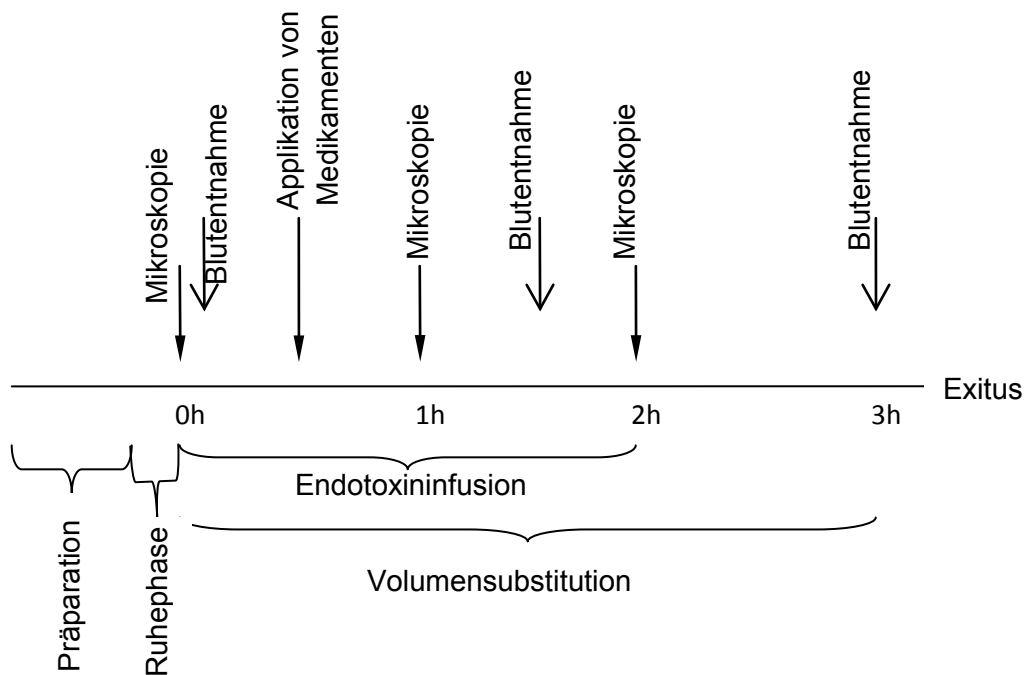


Abbildung 4: Schematischer Versuchsablauf

3.4 Narkoseführung und Monitoring

Die Narkose wurde durch eine intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg KG Pentobarbital (Pentobarbital Natrium, Synopharm GmbH, Barsbüttel) eingeleitet. Der Analgesiezustand wurde dann als adäquat angesehen, wenn Corneal- und Beugereflexe nicht auslösbar waren [98]. Die Überprüfung erfolgte durch Betupfen der Cornea mit einem Wattestäbchen bzw. durch Kneifen in die Pfoten und den Schwanz. Die Tiere wurden nach ca. 10 Minuten in Rückenlage auf einer Wärmematte fixiert. Körpertemperatur wurde mittels einer Rektalsonde (Thermistorsonde, W 233, RFT, Stassfurt) gemessen und durch eine thermostatgesteuerte Wärmematte bei $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ gehalten. Anschließend wurden die Tiere tracheotomiert und mit einem Kunststofftubus (Braunüle 14 G, Braun, Melsungen, Deutschland) intubiert, um eine Verlegung der oberen Atemwege auszuschließen. Die Tiere atmeten spontan Raumluft. Die Atemfrequenz wurde mittels eines Infrarotsensors gemessen und kontinuierlich überwacht. Das Katheterisieren der rechten Vena jugularis interna und der rechten Arteria carotis communis erfolgte mit Polyethylenkathetern (PE 50, ID 0,58 mm, OD 0,96 mm, Portex, Hythe, Kent, GB).

Über den arteriellen Zugang erfolgten:

- Kontinuierliches Monitoring von mittlerem arteriellen Blutdruck (MAP) und Herzfrequenz (HF) (BMT Biomonitor 5231; Druckmesswandler W112; RFT, Stassfurt, Deutschland).

Über den zentralvenösen Zugang erfolgten:

- Aufrechterhaltung der Narkose. (Adaptierte Erhaltungsdosis von etwa 20 mg/kg KG/h Pentobarbital.)
- Volumensubstitution mit einer Vollelektrolytlösung (Thomaejonin®, Biberach, Deutschland).
- Kontrastmittelverabreichung.
 1. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) - Albumin (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
 2. Rhodamin-6G (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
- Applikation von Pharmaka.
 1. C1-Esterase Inhibitor (Berinert® HS, Aventis Behring GmbH, Liederbach, Deutschland) mit einer Dosis von 100 I.E./kg KG

2. Faktor XIII (Fibrogammin® HS, Aventis Behring GmbH, Liederbach, Deutschland) mit einer Dosis von 50 I.E./kg KG

Beide Medikamente wurden 30 Minuten nach Endotoxingabe zusammen über 5 Minuten appliziert.

3.5 Operative Techniken

Alle Versuche wurden nach einem einheitlichen Protokoll durchgeführt.

Nach Eintritt der Anästhesie wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Wärmematte fixiert. Nach Rasur des Fells im Bereich des Halses und des Abdomens wurde die Haut am Hals in der Mittellinie mit einem Elektrokauter (BCH 50, TUR, Dresden, Deutschland) inzidiert. Danach wurde die Trachea aufgesucht, mit einer Mikroschere (Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) unterhalb des 6.-8. Ringknorpels tracheotomiert und mit einem Kunststofftubus intubiert. Anschließend wurde die rechte Vena jugularis interna und die rechte Arteria carotis communis freipräpariert, cranial ligiert und mit jeweils einem Polyethylenkatheter in Venae-section-Technik katheterisiert. Abschließend wurde die Halswunde mit einer fortlaufenden Naht (Ethibond, 3,5 metric, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen.

Nach einer medianen Laparotomie des Abdomens wurde das terminale Ileum aufgesucht und in no-touch-Technik auf eine spezielle Haltevorrichtung gebracht. Um Austrocknung zu vermeiden, wurden freiliegende Mesenterium- und Darmabschnitte mit einer 37°C warmen Thomaejonin® - Elektrolytlösung superfundiert. Nach Beendigung der Präparation und der Auslagerung des Darmes folgte eine Ruhephase von 15 Minuten.

3.6 Endotoxinmodell

Die Endotoxinämie wurde durch eine kontinuierliche intravenöse Infusion (über 2 Stunden) eines Lipopolysaccharides von Escherichia coli (Serotyp O55: B5; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in einer Dosis von 10 mg/kgKG ausgelöst.

3.7 Intravitalmikroskopie

Die Betrachtung der Mesenterialgefäße erfolgte mit einem Intravital-Fluoreszenz-Mikroskop zu drei Zeitpunkten. 15 Minuten vor dem ersten Zeitpunkt (I.IVM) wurde einmalig zur Kontrastanhebung des Plasmas 50mg/kg KG einer FITC–Albumin-Lösung injiziert. Dadurch konnten der Gefäßdurchmesser und die Plasmaextravasation später beurteilt werden. Die Markierung der Leukozyten erfolgte mittels einer 0,05 % Rhodamin-6G Lösung: 0,1ml vor I.IVM und 0,05ml jeweils vor II. u. III.IVM. Es wurde zu jedem Zeitpunkt je eine Videosequenz für 30 sek. in Rhodamin- und FITC-Kontrast von Venolen mit einem Durchmesser 25-40 μm aufgezeichnet. Die effektive Mikroskopierzeit betrug für die beiden Aufnahmen insgesamt ca. 15 Minuten. Die Videosequenzen wurden später an einem Personalcomputer "off-line" analysiert.

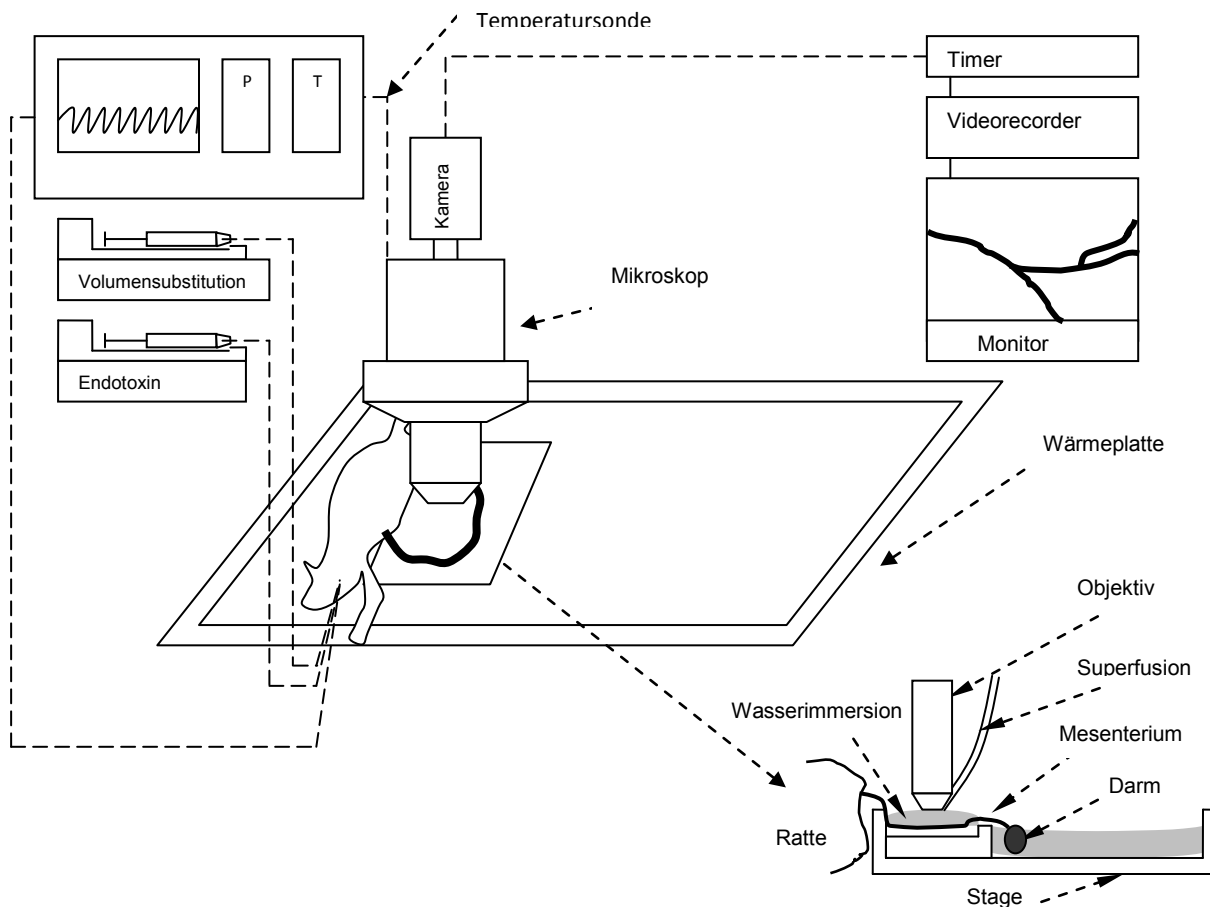


Abbildung 5: Versuchsaufbau

Für die intravitalmikroskopische Untersuchung wurden folgende technische Hilfsmittel verwendet:

- Mikroskop: Axiotech Vario, Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland
- Lichtquelle: HBO 50, Osram, Berlin, Deutschland
- Okulare - 10x; Zeiss Stage
- Objektive - 40x / 0,5; Achroplan, Zeiss
- Filtersatz Nr.20, Zeiss, (Anregung: BP 546/12; Frequenzteiler:560; Emission: BP 575-640)
- Filtersatz Nr.10, Zeiss, (Anregung: BP450-490; Frequenzteiler:510; Emission: BP 515-565)
- Videokamera: Panasonic S-VHS, AG-7355 E, Matsushita Electric Ind. Co. Ltd., Tokio Japan
- Video Timer: VTG-22, For-A-Company, Tokyo, Japan
- Videorecorder: Panasonic S-VHS, AG-7355 E, Mitsushita Electric Ind. Co. Ltd., Japan
- Monitor: JVC, TM-122EG, Tokyo, Japan

3.7.1 Leukozyten – Endothel – Interaktion

Um die Zahl der temporär und fest am Endothel adhärenen Leukozyten zu bestimmen wurden die postkapillären Mesenterialvenolen mit einem Durchmesser von 25–40µm ausgewertet. Der betreffende Abschnitt wurde 30 Sekunden lang in Rhodamin-Kontrast auf Videoband aufgenommen und später an einem Personalcomputer "off-line" analysiert.

3.7.1.1 Temporär adhärenente Leukozyten (Roller)

Definition: Leukozyten, die in einem Beobachtungszeitraum von 30 Sekunden ein festgelegtes Gefäßsegment mit einer Geschwindigkeit von ca. 50 µm/s [30] rollend an der Gefäßwand passieren.

Temporär mit dem Endothel interagierende Leukozyten wurden an zwei durch den jeweiligen Gefäßabschnitt gesetzten Linien gezählt und der Mittelwert bestimmt. Ermittelt wurde die Anzahl pro Minute, ausgedrückt als Roller-Flow (n/min).

3.7.1.2 Fest adhärenente Leukozyten (Sticker)

Definition: Leukozyten, die während des Beobachtungszeitraums für mindestens 30 Sekunden am Endothel haften.

Die Anzahl der fest adhärenenten Leukozyten wurde auf die jeweilige Endothelfläche bezogen. Für die Berechnung der Endothelfläche wurde eine Zylinderstruktur des Gefäßes angenommen.

Zylinderfläche: $A = l \cdot U$ (l = Länge des Gefäßes)

Zylinderumfang: $U = \pi \cdot d$ (d = Durchmesser des Gefäßes)

Sticker pro Fläche: $= n/\text{mm}^2$

3.7.2 Plasmaextravasation

Der Austritt des FITC-Albumin in das Interstitium führt zu einer Kontrastveränderung zwischen Gefäß und Gewebe und wird als Parameter für die Plasmaextravasation densitometrisch gemessen und berechnet. Die aufgenommene Videosequenzen von postkapillären Mesenterialvenolen mit einem Durchmesser von 25–40 μm wurden am Computer digitalisiert und unter Verwendung der Software Capi Scope (Version 3.2.2.6, Medizinelektronik Lawrenz GmbH, Bad Soden, Deutschland) ausgewertet. Es wurde die Fluoreszenzintensität innerhalb der Venole (I_{iv}) und im direkt angrenzenden Interstitium (I_{ev}) gemessen und als Fluoreszenzintensitätsquotient I_{ev}/I_{iv} angegeben. I_{ev}/I_{iv} -Quotient galt als Maß für die Extravasation von FITC-Albumin und wurde zu drei Zeitpunkten 0, 60 und 120 min ermittelt. Die Fluoreszenzintensität reichte von 1 (schwarz, keine Fluoreszenz) bis 255 (weiß, maximale Fluoreszenz).

3.8 Laborparameter

Alle Blutentnahmen erfolgten über den arteriellen Gefäßzugang zu drei Zeitpunkten:

Messzeitpunkt 0 (vor LPS – Applikation)

Messzeitpunkt 1 (1,5 Stunden nach LPS – Applikation)

Messzeitpunkt 2 (3 Stunden nach LPS – Applikation)

3.8.1 Leukozytenzahl

Für die Bestimmung der Anzahl der Leukozyten, wurden eine Kunststoff- Einmal Kapillarpipette, EDTA behandelt, (Kabe, Labortechnik, Deutschland) mit 50 µl Blut gefüllt und am Zellcounter ausgewertet (Zell- Counter: Technicon H*1, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland; die Eichung dieses Gerätes erfolgte gegen Standards von Paratech (Streck Laboratories, Inc., Omaha, USA). Die Messung erfolgte spätestens 12 Stunden nach Gewinnen der Probe und Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4 °C.

3.8.2 TNF- α , IL-10, IL-1 β , IL-6

Für die Konzentrationsbestimmung von Interleukin 10, 1 β , 6 und TNF- α wurde eine EDTA-Microvette (500KE, Ka- EDTA, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland) mit 500 µl Blut gefüllt, anschließend bei 6000 Umdrehungen/15min zentrifugiert (Tischzentrifuge, Janetzki TH 12, Janetzki, Ilmenau, Deutschland), der Plasmaüberstand (200 µl) abpipettiert und 1:1 mit 200 µl NaCl verdünnt. Anschließend wurde die Probe gleichmäßig auf 6 Eppendorfgefäße zu je 60 µl verteilt und bei -80°C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren. Die Konzentrationsermittlung der oben angegebenen Parameter erfolgte mit Hilfe von standardisierten rattenspezifischen Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) Kits (Quantikine Rat, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstedt, Germany). Die Konzentrationswerte wurden auf Grund der Verdünnung mit 2 multipliziert.

3.9 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte mithilfe der Statistikpakete SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) und SAS 8.2. Alle Daten wurden als Median mit der 25. und 75. Perzentile, Minimum und Maximum dargestellt.

Da kleine Fallzahlen, eine unregelmäßige Verteilung und Ausreißer vorlagen, wurden nichtparametrische Maßzahlen und Methoden zur Darstellung und Auswertung benutzt.

Eine Signifikanz wurde bei einem $p < 0,05$ angenommen.

Gruppenvergleiche an bestimmten Zeitpunkten wurden durch den Kruskal-Wallis-Test und den Mann-Whitney-U-Test untersucht. Für die Untersuchung der Unterschiede zwischen zwei Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe wurde der Wilcoxon Test durchgeführt.

Bei mehrfaktoriellen Design (wiederholte Messungen, mehrere Gruppen) führten wir eine 2-faktorielle nichtparametrische Varianzanalyse für Daten mit Messwiederholung nach Brunner durch (Statistikprogramm SAS 8.2).

Die Darstellung der Daten erfolgte mit Hilfe von SigmaPlot 7.0 (Systat Software Inc., Point Richmond,USA).

IV Ergebnisse

4.1 Intravitalmikroskopie

4.1.1 Leukozytenadhärenz

4.1.1.1 Temporär adhärenente Leukozyten (Roller)

In keiner Gruppe gab es signifikante Veränderungen der Anzahl der Roller über die Versuchszeit. Im Gruppenvergleich fand sich kein signifikanter Unterschied der Anzahl der Roller.

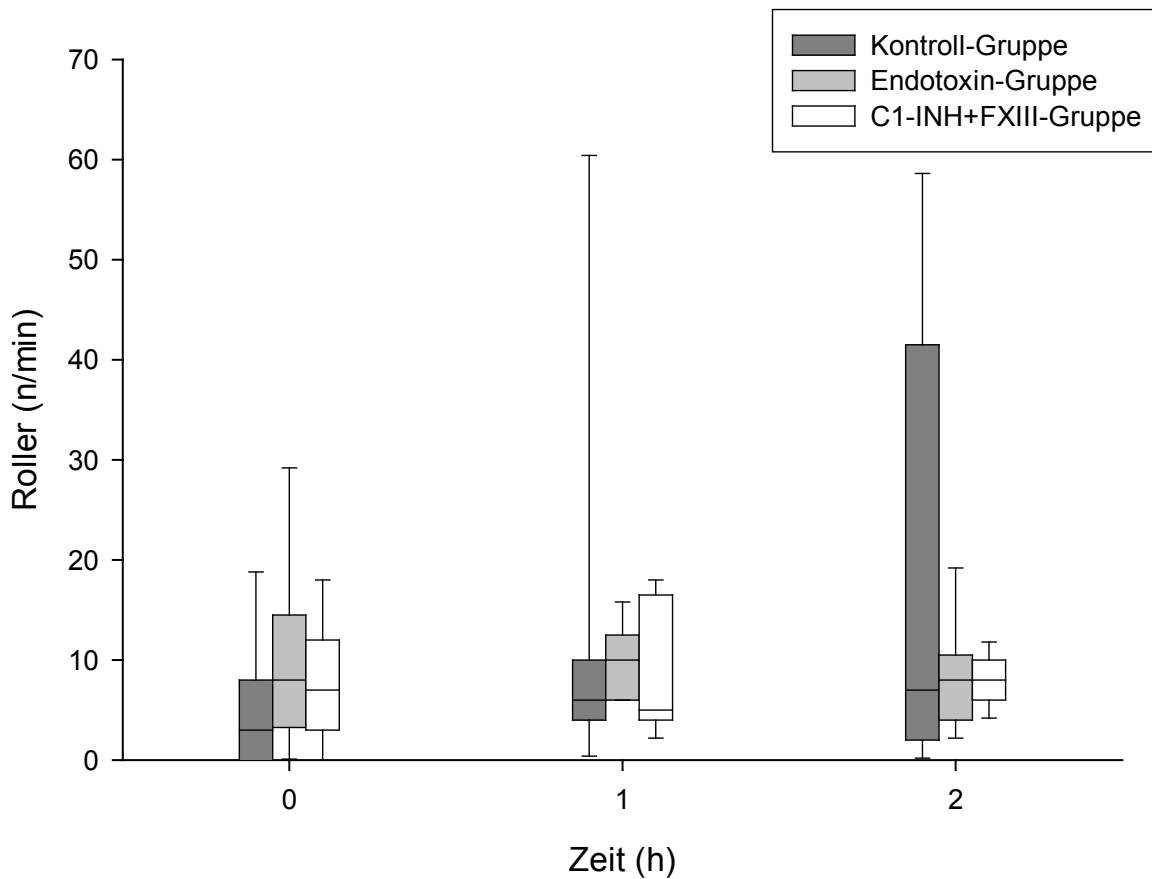


Abbildung 6: Temporär adhärenente Leukozyten (Roller) in n/min.

4.1.1.2 Fest adhärenente Leukozyten (Sticker)

In der Endotoxin-Gruppe kam es zu einer signifikanten Zunahme der Anzahl der fest adhärenente Leukozyten gegenüber der Kontroll-Gruppe und der C1-INH+FXIII-Gruppe, sowie gegenüber den Ausgangswerten. In der C1-INH+FXIII-Gruppe war die Anzahl der adhärenente Leukozyten signifikant geringer als in der Endotoxin-Gruppe.

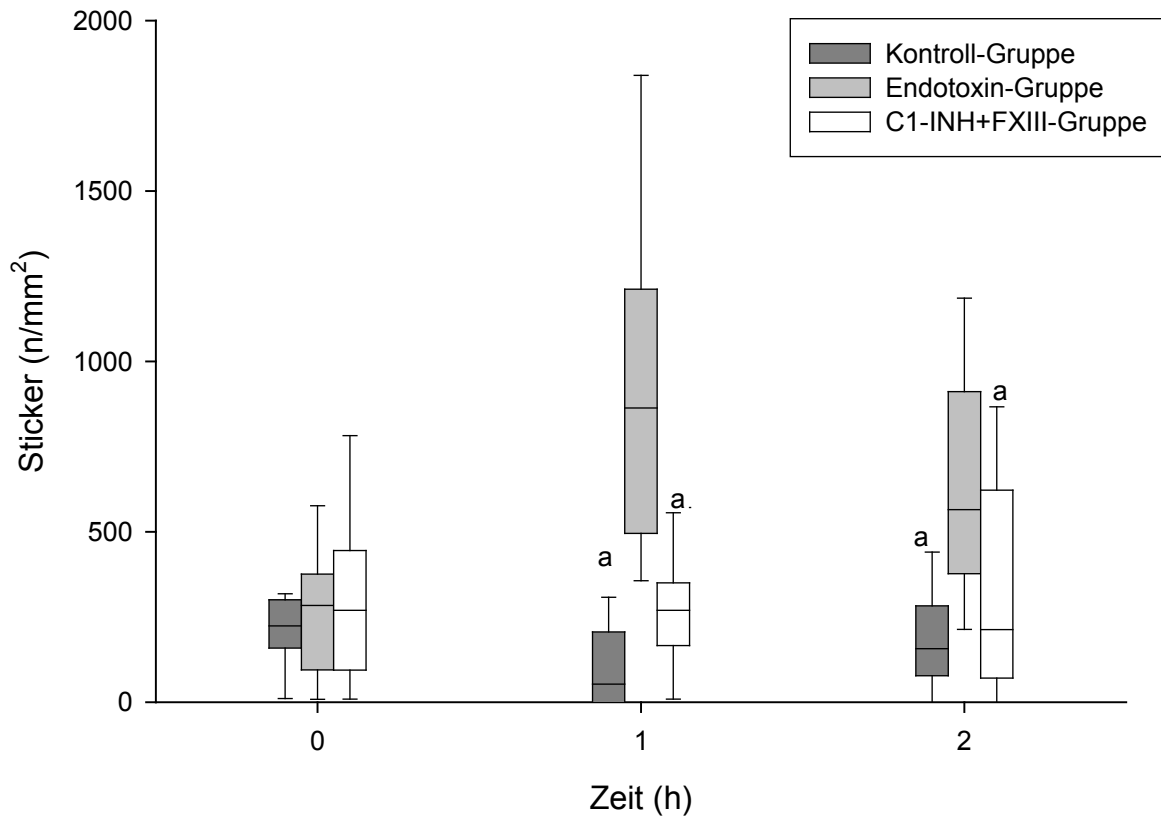


Abbildung 7: Fest adhärenente Leukozyten (Sticker) in n/mm^2 . a $p < 0.05$ vs. Endotoxin-Gruppe

4.1.2 Extravasation

In keiner Gruppe gab es signifikante Unterschiede der Plasmaextravasation über einen Versuchszeitraum von 2 Stunden. Es konnte aber ein Trend zu einem Anstieg der Plasmaextravasation in allen Gruppen beobachtet werden. In der C1-INH+FXIII-Gruppe lag die Plasmaextravasation am Messzeitpunkt 2 h niedriger gegenüber dem Messzeitpunkt 1h, dies war aber statistisch nicht signifikant.

Im Gruppenvergleich traten keine signifikanten Unterschiede der Plasmaextravasation auf.

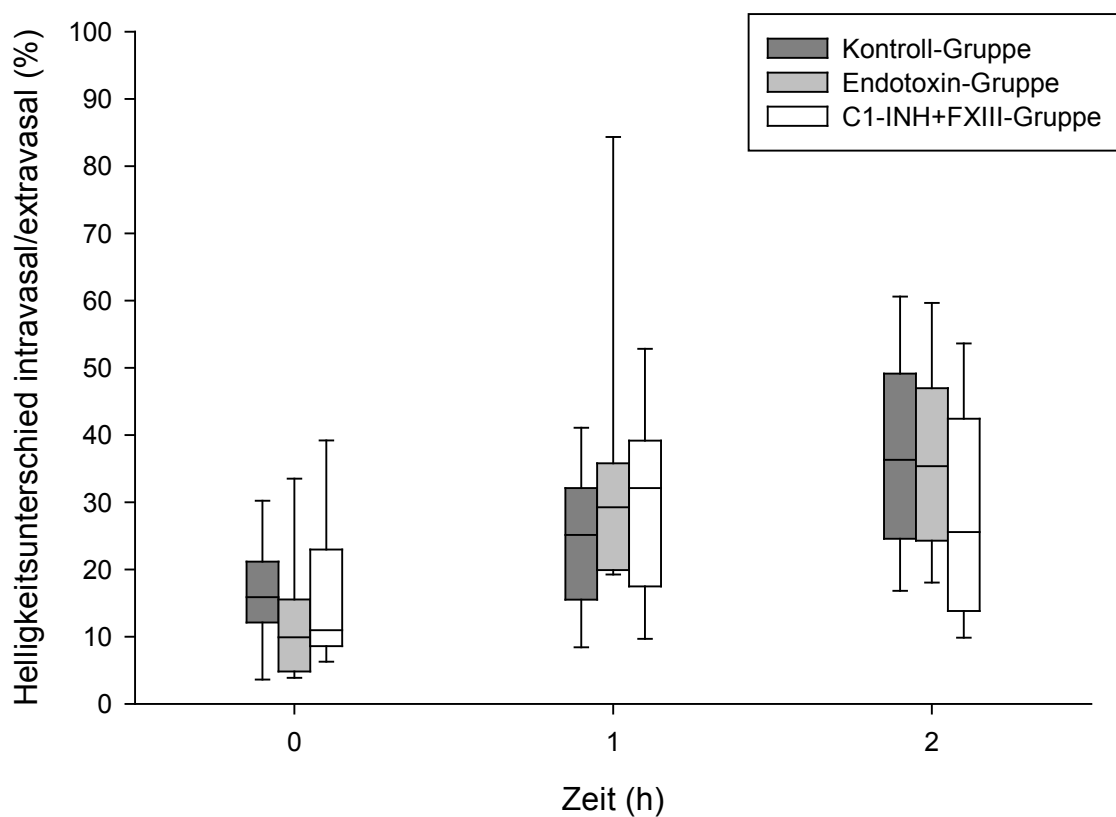


Abbildung 8: Plasmaextravasation.

4.2 Laborparameter

4.2.1 Leukozyten

In beiden mit Endotoxin behandelten Gruppen kam es zu einer signifikanten Reduktion der Leukozyten im peripheren Blut gegenüber der Kontroll-Gruppe. Nach 1,5 Stunden lag die Leukozytenzahl in der Kontroll-Gruppe signifikant höher gegenüber dem Ausgangswert. Am Versuchsende war die Leukozytenzahl in der Kontroll-Gruppe wieder bei Werten des Ausgangsniveaus. Zwischen der C1-INH+FXIII-Gruppe und der Endotoxin-Gruppe bestanden keine signifikanten Unterschiede. Nach 3 Stunden lag in der C1-INH+FXIII-Gruppe und in der Endotoxin-Gruppe eine signifikante Reduktion der Leukozyten im Vergleich zu ihren jeweiligen Ausgangswerten vor.

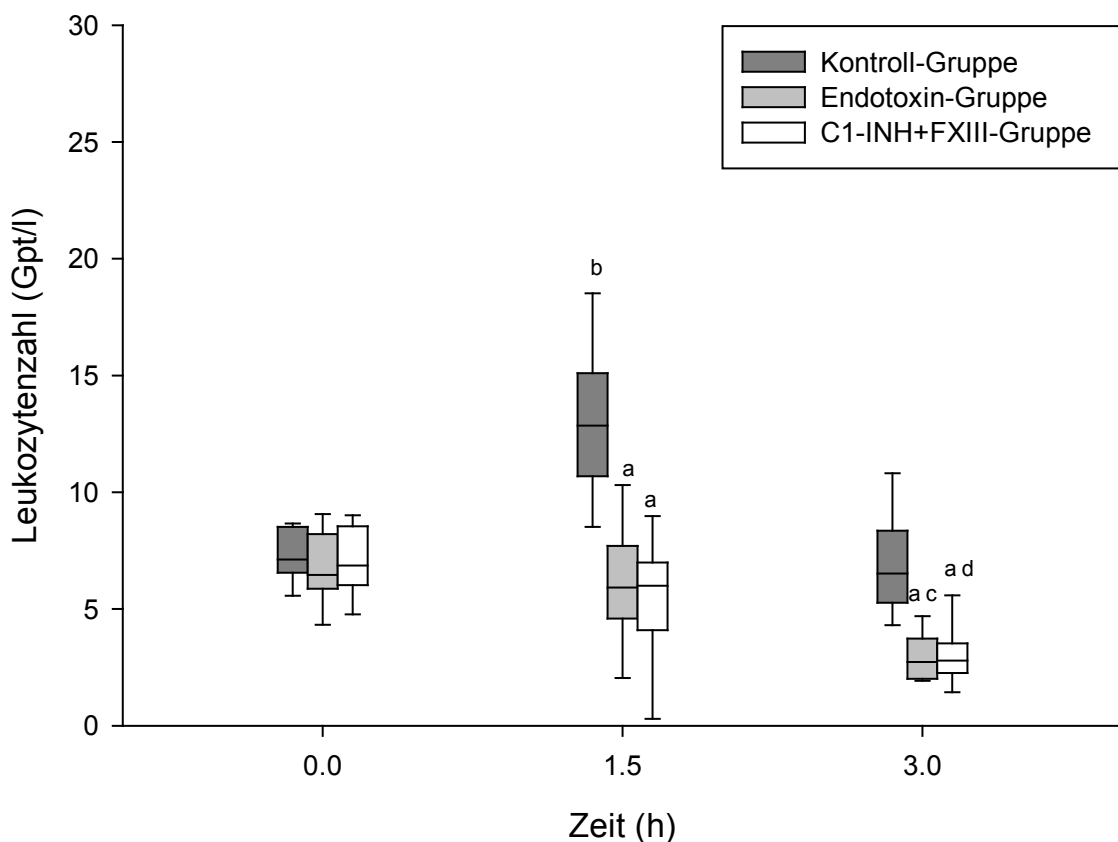


Abbildung 9: Leukozytenzahl im peripheren Blut (Gpt/l). a $p < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe, b $p < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe 0h, c $p < 0.05$ vs. Endotoxin-Gruppe 0h, d $p < 0.05$ vs. C1-INH+FXIII-Gruppe 0h.

4.2.2 TNF- α

In beiden mit Endotoxin behandelten Gruppen kam es zu einer signifikanten Zunahme der TNF- α Konzentration im Verhältnis zum jeweiligen Ausgangswert und im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe. Die maximale TNF- α Konzentration wurde nach 1,5 Stunden erreicht und fiel im Verlauf zum Messzeitpunkt 3 Stunden wieder signifikant ab. Zwischen der Endotoxin-Gruppe und der C1-INH+FXIII-Gruppe bestanden keine signifikanten Unterschiede. Nach 1,5 Stunden lag die TNF- α Konzentration in der Kontroll-Gruppe signifikant höher im Vergleich zu dem Ausgangswert, aber signifikant niedriger gegenüber der Konzentration mit Endotoxin behandelten Gruppen.

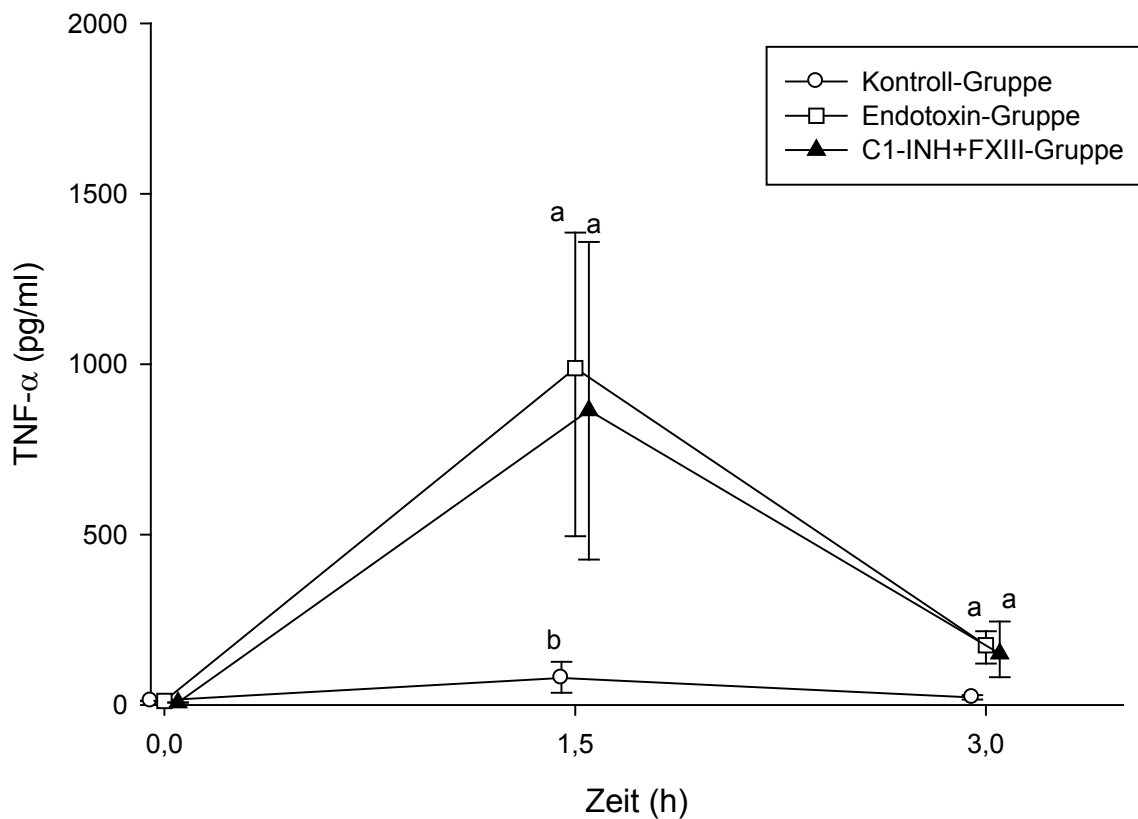


Abbildung 10: TNF- α Konzentration in (pg/ml). a $p < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe, b $p < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe 0h

4.2.3 Interleukin-10

In der Endotoxin- und der C1-INH+FXIII-Gruppe zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Interleukin-10 Konzentration im Vergleich zum jeweiligen Ausgangswert und im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe. Zwischen der Endotoxin-Gruppe und der C1-INH+FXIII-Gruppe bestanden keine signifikanten Unterschiede. Zum Messzeitpunkt 1,5 Stunden kam es in der Kontroll-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der Interleukin-10 Konzentration gegenüber dem Ausgangswert. Nach 3 Stunden lagen die Interleukin-10 Konzentrationen in allen Gruppen signifikant höher im Verhältnis zum jeweiligen Ausgangswert.

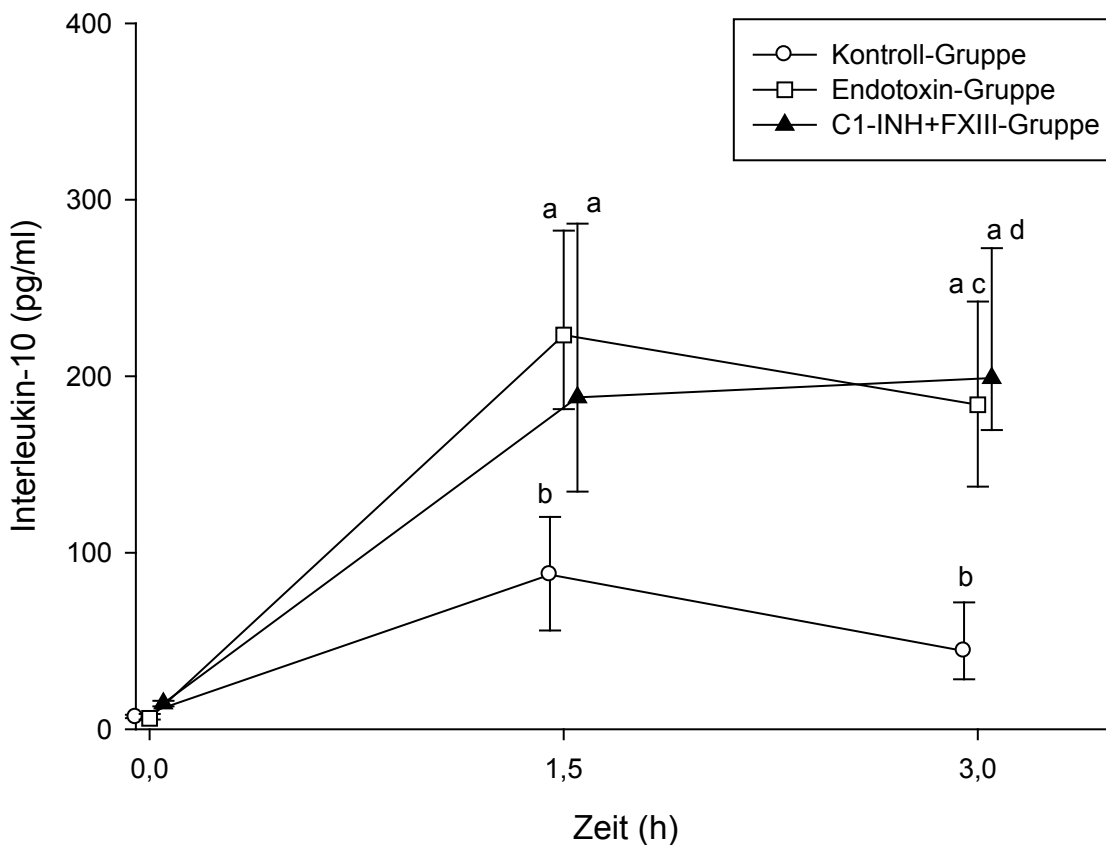


Abbildung 11: Interleukin-10 Konzentration in (pg/ml). a $p < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe, b $p < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe 0h, c $p < 0.05$ vs. Endotoxin-Gruppe 0h, d $p < 0.05$ vs. C1-INH+FXIII-Gruppe 0h.

4.2.4 Interleukin-1 β

In beiden mit Endotoxin belasteten Gruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 β -Konzentration im Vergleich zu der Kontroll-Gruppe und gegenüber den Ausgangswerten. In der Kontroll-Gruppe traten keine signifikanten Veränderungen der IL-1 β -Konzentration auf. Die Werte der C1-INH+FXIII-Gruppe lagen zu den Messzeitpunkten 1,5 und 3 Stunden signifikant niedriger im Vergleich zu der Endotoxin-Gruppe.

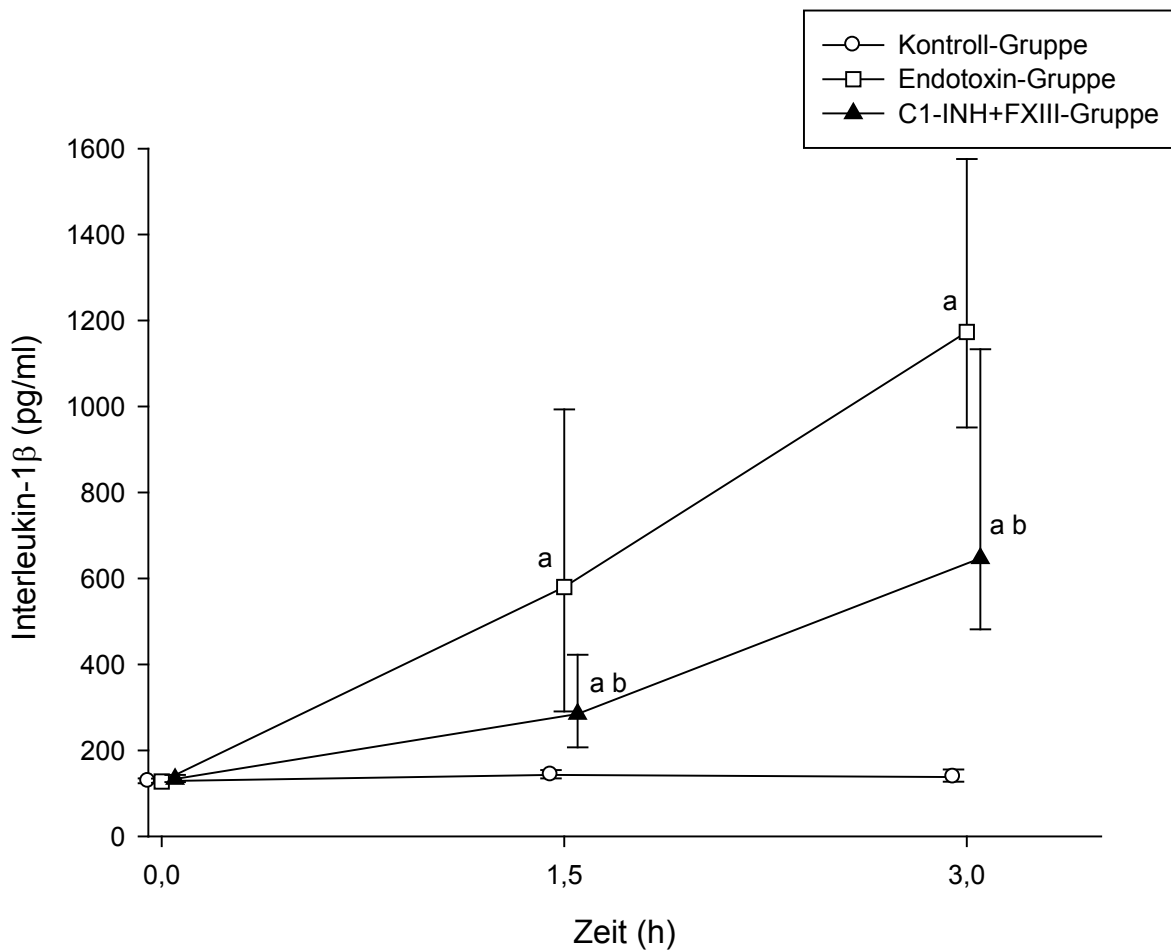


Abbildung 12: Interleukin-1 β Konzentration in (pg/ml), a $p < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe, b $p < 0.05$ C1-INH+FXIII-Gruppe vs. Endotoxin-Gruppe.

4.2.5 Interleukin-6

In beiden mit Endotoxin behandelten Gruppen zeigte sich ein jeweils signifikanter Anstieg der IL-6-Konzentration im Verhältnis zum jeweiligen Ausgangswert. Zu beiden Messzeitpunkten 1,5 und 3 Stunden war in diesen Gruppen ein signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe nachweisbar. Die IL-6-Konzentration in der C1-INH+FXIII-Gruppe lag zu den Messzeitpunkten 1,5 und 3 Stunden signifikant höher als in der Endotoxin-Gruppe. In der Kontroll-Gruppe stieg die IL-6-Konzentration über die Versuchszeit geringer im Vergleich zu beiden mit Endotoxin behandelten Gruppen, aber signifikant an.

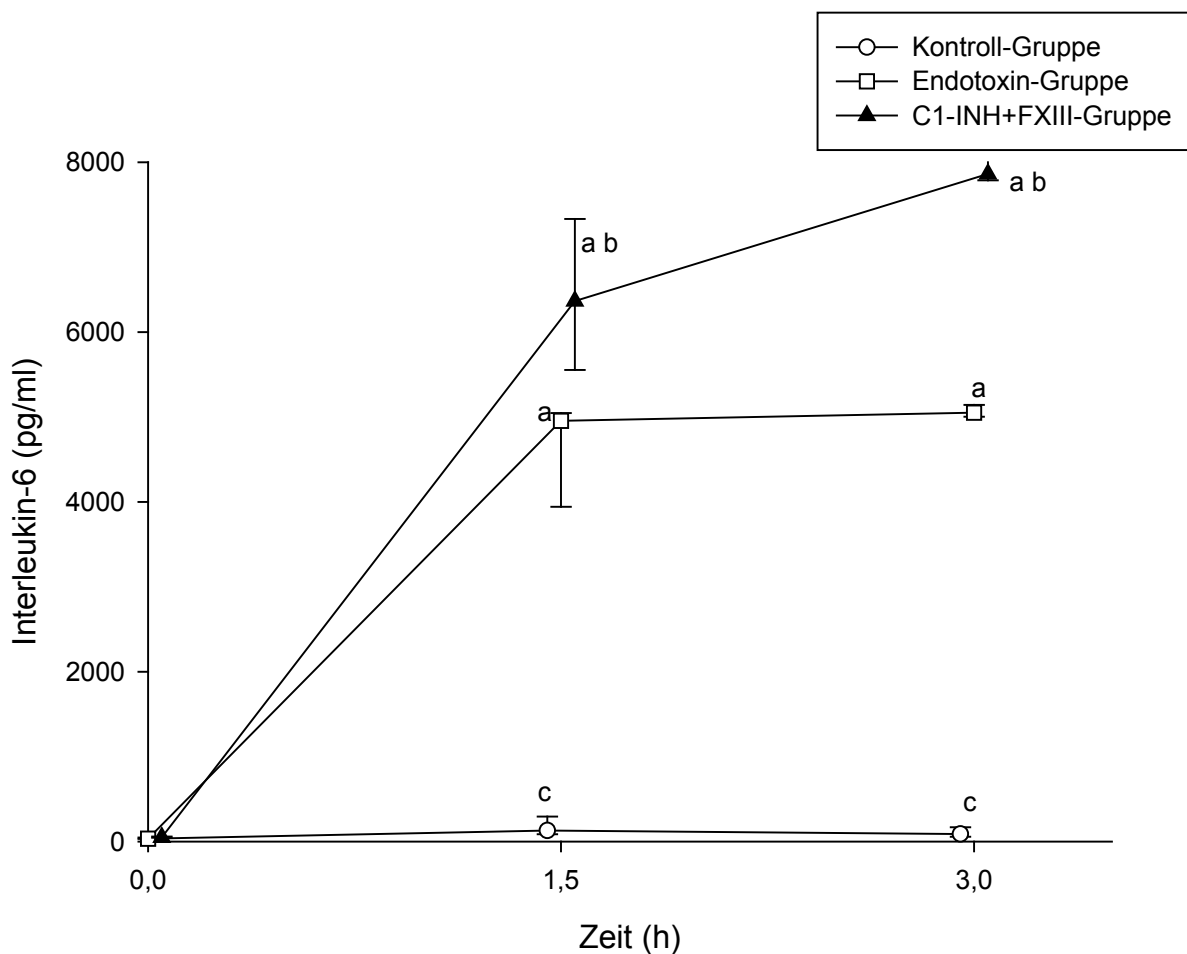


Abbildung 13: Interleukin-6 Konzentration in (pg/ml). a $p < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe, b $p < 0.05$ C1-INH+FXIII-Gruppe vs. Endotoxin-Gruppe, c $p < 0.05$ vs. Kontroll-Gruppe 0h

4.3 Hämodynamik

4.3.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) blieb sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Endotoxin- und C1-INH+FXIII-Gruppe über einen Zeitraum von 3 Stunden weitergehend stabil. Auch im Gruppenvergleich traten keine signifikanten MAP Veränderungen auf. In der Endotoxin-Gruppe war der mittlere arterielle Blutdruck im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nicht signifikant verändert. Ebenso bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen der C1-INH+FXIII-Gruppe und der Kontroll-Gruppe.

Tabelle 2: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) mmHg

Gruppe / Zeit	0 h	1 h	2 h	3 h	p
Kontroll-Gruppe	129 (112-140)	129 (117-137)	119 (111-127)	99 (84-117)	n.s.
Endotoxin-Gruppe	121 (109-123)	112 (105-118)	106 (96-115)	107 (102-113)	n.s.
C1-INH+FXIII-Gruppe	123 (116-135)	117 (110-127)	110 (105-120)	109 (106-122)	n.s.

Messungen zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h und 3h nach Beginn der Endotoxin-Infusion.

p für ANCOVA. n.s.: nicht signifikant ($p > 0.05$).

$p > 0.05$ C1-INH+FXIII-Gruppe vs. Endotoxin-Gruppe, $p > 0.05$ Endotoxin-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe, $p > 0.05$ C1-INH+FXIII-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe

4.3.2 Herzfrequenz

In allen Gruppen, die Endotoxin erhalten hatten, kam es zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch im Vergleich zu den Ausgangswerten lag eine signifikante Erhöhung vor. Am Versuchsende war die Herzfrequenz bei allen mit Endotoxin behandelten Tieren signifikant höher als bei den Kontrolltieren. In der Kontrollgruppe wurden im Verlauf des Versuches tendenziell niedrigere Werte gemessen, dieser Abfall der Herzfrequenz war jedoch statistisch nicht signifikant.

Tabelle 3: Herzfrequenz in x/min

Gruppe / Zeit	0 h	1 h	2 h	3 h	p
Kontroll-Gruppe	360 (329-394)	377 (356-394)	369 (338-381)	342 (325-364)	n.s.
Endotoxin-Gruppe	351 (325-364)	386 (342-411)	394 (377-411)	403 (386-411)	P<0.05 vs. Kontroll- Gruppe
C1-INH+FXIII-Gruppe	342 (312-360)	377 (360-394)	394 (377-411)	394 (369-411)	P<0.05 vs. Kontroll- Gruppe

Messungen zu den Zeitpunkten 0h, 1h, 2h und 3h nach Beginn der Endotoxin-Infusion.

p für ANCOVA. n.s.: nicht signifikant ($P > 0.05$).

p<0.05 C1-INH+FXIII-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe, p<0.05 Endotoxin-Gruppe vs. Kontroll-Gruppe, p>0.05 Kontroll-Gruppe 3h vs. Kontroll-Gruppe 0h

V Diskussion

5.1 Methodik

In der Sepsisforschung werden verschiedene Tiermodelle verwendet, um pathophysiologisch der Sepsis ähnliche Veränderungen zu erzielen. Im Allgemeinen wird zwischen Modellen ohne infektiösen Fokus und Modellen mit infektiösem Fokus unterschieden [89].

Aus Sepsis-Modellen mit infektiösem Fokus wird das CLP-Modell am häufigsten angewandt. Dieses Modell benötigt bis zur Entwicklung der Symptomatik einen längeren Zeitraum. Der Zeitpunkt des Entstehens der Sepsis ist nicht exakt definierbar. Sowohl die exakte Dosis als auch der Art sepsisauslösender Mikroorganismen ist schlecht quantifizierbar. Diese Methode ist mit einem erhöhten Aufwand verbunden und schwer standardisierbar. Der Vorteil des CLP-Modells liegt darin, dass der Verlauf und das klinische Bild einer Sepsis abdomineller Genese sehr nahe kommt [89].

Das Endotoxin-Modell ist das etablierte Tiermodell in der Sepsisforschung und wird sehr häufig angewendet. Der große Vorteil des Endotoxin-Modells liegt in der einfachen und sicheren Handhabung des LPS. Der Untersucher kann die Art des Endotoxins und die genaue Dosierung des auslösenden Agens bestimmen. Damit wird ein exakt reproduzierbarer Symptom-Zeit-Verlauf erreicht. Schon 30 - 45 Minuten nach Applikation des Endotoxins werden pathophysiologische Veränderungen erzielt, die denen der Sepsis ähnlich sind [94]. Durch diese Vorteile wird ein standardisierter Versuchsaufbau gewährleistet [89].

Deshalb entschieden wir uns in unserem Versuchsaufbau für das Endotoxin-Modell.

Als Nachteil des Endotoxin-Modells gilt die Tatsache, dass kein vollwertiges Bakterium sondern nur ein Bakterienbestandteil als Agens dient. Nachteilig ist auch, dass die Sensitivität gegenüber Endotoxin bei den verschiedenen Spezies unterschiedlich ist.

Durch eine kontinuierliche intravenöse Gabe von Endotoxin in einer Dosierung von 10 mg/kgKG beobachteten wir in unseren Versuchsgruppen pathophysiologische Veränderungen, die dem Verlauf der Sepsis ähneln. Veränderungen der Herzfrequenz und des mittleren arteriellen Blutdruckes diente als Effektivitätskriterium der Endotoxinämie. In allen Gruppen die Endotoxin erhielten kam es zu einem signifikanten Anstieg der Herzfrequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ein Anstieg von TNF- α und Interleukin-1 β unter Endotoxinämie verdeutlicht in unserer Studie die Wirksamkeit des applizierten LPS.

Da Zwischen einzelnen Chargen desselben Serotyps Lipopolysaccharid Wirkunterschiede auftreten können, verwendeten wir für alle Versuche dieselbe Charge eines Lipopolysaccharides von *Escherichia coli* Serotyp O55:B5 [99]. In der Literatur ist es ein häufig verwendeter Serotyp [100-102].

Bei der Erforschung der Leukozyten-Endothel-Interaktion infolge Endotoxinämie ist es wichtig ein normotensives Endotoxin-Modell zu haben, um die Vorgänge unabhängig vom MAP beurteilen zu können [103]. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) beeinflusst die Blutflussgeschwindigkeit, welche die Scherkräfte nach der Newtonschen Formel bestimmt. Die Scherkräfte beeinflussen die Leukozyten-Endothel-Interaktion [104]. Je nach Höhe der applizierten Dosis von Endotoxin kommt es zu einem hypo- oder hyperdynamen Kreislaufstadium der Sepsis. Fink et al. beobachteten in einem Sepsis-Modell an Kaninchen, dass eine intraperitonealer Bolusgabe von Endotoxin in hoher Dosierung (5 mg/kg KG) eine hypodynamie und in niedriger Dosierung (1,3 µg/kg KG) hyperdynamie Kreislaufsituation auslöste [105].

Eine intravenöse Dauerinfusion von Endotoxin führt bei Ratten in hoher Dosierung (40 mg/kg KG) zu einem hypodynamen Bild mit einem erniedrigten kardialen Auswurf bei erhöhten peripheren Widerständen [106]. Xu et al. konnten in einem Sepsis-Modell an Ratten durch eine kontinuierliche Gabe von Endotoxin (5 mg/kg KG) eine hyperdynamie Kreislaufsituation hervorrufen. Sie beobachteten eine Tachykardie bei einem unveränderten MAP [107].

Durch eine kontinuierliche intravenöse Gabe von Endotoxin in einer Dosierung von 10 mg/kgKG erreichten wir in unseren Versuchsgruppen einen normotensiven Zustand.

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Anästhetika die Mikrozirkulation und somit Leukozyten-Endothel-Interaktion und Plasmaextravasation beeinflussen können [108-110]. Schmidt et al. beobachteten eine Verringerung der Leukozytenadhärenz bei Anwendung von Ketamin [108]. Janssen et al. zeigten, dass Pentobarbital keinen Einfluss auf Leukozytenadhärenz hat [111]. Deshalb wählten wir für unsere Versuche Pentobarbital als Anästhetikum. Auch andere Arbeitsgruppen benutzten Pentobarbital zur Narkoseführung bei Untersuchungen der Mikrozirkulation in Sepsis-Modellen an Ratten [112-113].

Der Einfluss von Rhodamin-6G und der Fluoreszenzmikroskopie wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Steinbauer et al. untersuchten die Phototoxizität von Rhodamine-6G und FITC-Dextran in Abhängigkeit von der Lichtdosis in einer intravitalmikroskopischen

Studie am Hamstermodell. Phototoxische Effekte wie eine erhöhte Leukozyten-Endothel-Interaktion, Gefäßkonstriktion und Thrombusformation wurden nur bei deutlich höheren Lichtdosen beobachtet.

Die Anwendung von Rhodamin-6G als Markersubstanz für die Darstellung der Leukozyten während der Intravitalmikroskopie konnten in Versuchsmodellen wie dem unseren in der Literatur keine signifikanten Beeinträchtigungen der Leukozyten-Endothel-Interaktion festgestellt werden [114-115].

Hauptziel unserer Arbeit war die Endotoxin-charakteristische Veränderungen der Mikrozirkulation im Mesenterium zu untersuchen. In unserem Sepsis-Modell konnten wir durch eine kontinuierliche intravenöse Gabe von Endotoxin klinische Symptome, laborchemische Veränderungen und Organdysfunktionen induzieren, wie sie auch bei der Sepsis zu beobachten sind.

5.2 Intravitalmikroskopie

Wir verwendeten in unserer Studie die Technik der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie zur quantitativen Analyse der Mikrozirkulation.

Diese beinhaltet die Quantifizierung der Leukozytenadhärenz in postkapillären Venolen und die Extravasation von FITC-Albumin in den perivaskulären Raum.

5.2.1 Leukozytenadhärenz

Einen wichtigen Bestandteil des inflammatorischen Prozesses repräsentiert die Leukozyten-Endothel-Interaktion. Es kommt in einem mehrstufigen Prozess zur Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel, dem letztlich die Migration der Leukozyten aus dem Intravasalraum ins Gewebe folgen kann [25].

Die Adhäsionskaskade läuft in folgenden Schritten ab:

1. Margination der Leukozyten aus der Blutstrommitte in den Randstrom im Zuge der Mikrozirkulationsstörungen.
2. Leukozyten, welche intermittierend mit dem Gefäßendothel interagieren "Rolling"
3. Adhärenz Leukozyten, die fest am Endothel anhaften " Sticking "
4. Der aktive Auswanderungsprozeß von Leukozyten durch die Gefäßwand " Diapedese "

Die durch aktivierte Leukozyten freigesetzten Sauerstoffradikale und andere reaktive Mediatoren treten in hohen Konzentrationen an der Endothelzellwand auf. Das führt zur Schädigung der Endothelzellen, erhöht die Gefäßpermeabilität und aktiviert weitere Kaskadensysteme [116-117].

Die erhöhte Gefäßpermeabilität führt zum unkontrollierten Eiweißverlust in das Gewebe. Dies führt zu lokalen Ödemen und Zellschädigungen vor allem in den parenchymatösen Organen wie Lunge, Leber, Niere und in der Darmwand.

Während der Sepsis kommt es zu einer überschießenden Aktivierung der Leukozyten. Eine Suppression der Leukozytenadhärenz ist somit ein mögliches therapeutisches Konzept in der Sepsistherapie.

Um die Leukozyten-Endothel-Interaktion beurteilen zu können, wurden Leukozyten in unserer Studie selektiv mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin-6G markiert. Diese Methode zeigte sich bei den verschiedensten tierexperimentellen Modellen zur Quantifizierung der Leukozyten-Endothel-Interaktion als geeignet [103, 118]. Durch die selektive Ansammlung des Rhodamin 6G in den Mitochondrien werden alle Subpopulationen der Leukozyten markiert ohne die Erythrozyten anzufärben.

Ein Nachteil der Intravitalmikroskopie liegt in der Invasivität der Methode und einer daraus resultierenden Störanfälligkeit. Ein spontanes Leukozyten-Rolling wird durch die Darmauslagerung verstärkt [119-120]. Durch eine Stabilisierungsphase nach der Auslagerung des Darms wird der Einfluss auf die Mikrozirkulation jedoch minimiert.

Nachteilig ist auch, dass der Einsatz von Markersubstanzen wie Rhodamin-6G in Kombination mit fluoreszierendem Licht durch phototoxische Reaktionen einen Einfluss auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion ausüben kann. Relevant ist dies jedoch nur bei einer wesentlich längeren Bestrahlung mit fluoreszierendem Licht als sie normalerweise für die Intravitalmikroskopie benötigt wird [121]

5.2.1.1 Temporär adhärente Leukozyten (Roller)

Ein spontanes Leukozyten-Rolling kann schon unter physiologischen Bedingungen beobachtet werden und kann bis 45 % der Gesamtleukozyten betragen [122]. Dieses Phänomen kann als ständige immunprotektive Bereitschaft der Leukozyten interpretiert werden [123]. Das Ausmaß des Leukozyten-Rolling ist von der Art des untersuchten

Gewebes abhängig. Die Arbeitsgruppe Mayrovitz et al. beobachteten ähnlichen Phänomene an der intakten Haut von haarlosen Mäusen [124].

Ein verstärktes spontanes Leukozyten-Rolling (Baseline-Rolling) durch die versuchsbedingte Manipulation des untersuchten Gewebes haben zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen gezeigt. Fiebig et al. beobachteten einen Anstieg des spontanen Leukozyten-Rolling in den mesenterialen Venolen bereits 5 Minuten nach Auslagerung des Mesenteriums (durchschnittlich 8 Leukozyten pro Minute) und auch nach 30 Minuten (durchschnittlich 24 Leukozyten pro Minute) wurde dieses Phänomen noch beobachtet [119]. Scalia et al. fanden in intestinalen Venolen ca. 20 Minuten nach der Auslagerung des Darmes ein Baseline-Rolling bis zu 20 Leukozyten pro Minute [120].

Wir begannen unsere Intravitalmikroskopische Untersuchung ca. 15 Minuten nach der Auslagerung des Darmes und beobachteten in allen Versuchsgruppen ein spontanes Leukozyten-Rolling. Dieses lag im Durchschnitt bei 7 Leukozyten pro Minute.

Ein niedrigeres Baseline-Rolling im Vergleich zu den Ergebnissen von Scalia et al. könnte durch die kürzere Stabilisierungsphase nach der Auslagerung erklärt werden.

In unserem Versuch konnten wir in allen Gruppen keine signifikante Veränderung der Anzahl der temporär adhärenen Leukozyten (Roller) über die Versuchszeit beobachten.

Dagegen berichten andere Autoren über einen Anstieg der temporär adhärenen Leukozyten nach Endotoxin-Gabe [112, 125].

In einer intravitalmikroskopischen Studie an Ratten fanden Schmidt et al. eine Verminderung der Anzahl der temporär adhärenen Leukozyten (Roller) nach LPS-Applikation, bei gleichzeitigen Erhöhung von fest adhärenen Leukozyten (Sticker) [126].

In der Endotoxin-Gruppe fanden wir eine signifikante Zunahme der Anzahl der fest adhärenen Leukozyten bei einer gleichbleibenden Anzahl der temporär adhärenen Leukozyten.

Dieser Effekt kann begründet werden durch eine überproportionale Ausprägung der fest adhärenen Leukozyten in der Mikrozirkulation. Die Endotoxingabe führt zu einer starken Adhärenz der Leukozyten am Endothel, so dass kaum noch Roller beobachtet werden können. Die Gleichzeitig beobachtete Endotoxin-verursachte Reduktion der Leukozytenzahl im peripheren Blut festigt unsere Interpretation. Die Arbeitsgruppe Baatz et al. machten ähnliche Beobachtungen in einer intravitalmikroskopischen Untersuchung an Gefäßen der

Uvea von Ratten. Zwei Stunden nach LPS-Applikation kam es zu einem bis zu 30 % verminderten Leukozyten-Rolling sowie zu einer Reduktion der Leukozytenzahl im peripheren Blut [127].

Bei längerer Beobachtungszeit (ca. 6 h nach LPS-Applikation) fanden Baatz et al. einen Wiederanstieg der Leukozytenzahl im peripheren Blut [127]. Dieser Ablauf kann durch die verzögerte Freisetzung aus dem Knochenmark im Rahmen eines Entzündungsgeschehens erklärt werden. Baatz et al. zeigten vier bis sechs Stunden nach LPS-Applikation eine Zunahme des Leukozyten-Rollings bei konstant erhöhter Anzahl der fest adhärenen Leukozyten. Die Zunahme der Anzahl der Roller war daher durch ein Nachliefern von Leukozyten und nicht durch ein Ablösen schon fest adhärenen Leukozyten verursacht [127].

In unserer Studie kam es zu einer signifikanten Reduktion der Leukozyten im peripheren Blut in beiden mit Endotoxin behandelten Gruppen. Einen späteren Anstieg der Leukozytenzahl konnten wir aufgrund einer kürzeren Beobachtungszeit nicht feststellen.

Die Gabe der Kombination des C1-Esterase-Inhibitors mit Faktor XIII bewirkte keine signifikante Reduktion der temporär adhärenen Leukozyten im Vergleich zu der Endotoxin-Gruppe.

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnten Birnbaum et al. keine signifikante Reduktion der temporär adhärenen Leukozyten durch die Behandlung mit Faktor XIII zeigen [128]. Lehmann et al. zeigten in einem ähnlichen Modell, dass die C1-Esterase-Inhibitor Verabreichung keinen Einfluss auf die temporär adhärenen Leukozyten hatte [129].

Birnbaum et al. beobachteten in einer späteren Studie durch die Gabe der Kombination des C1-Esterase-Inhibitors mit Faktor XIII keine signifikanten Veränderungen der temporär adhärenen Leukozyten am Endothel der submukösen Venolen der Ratten [130].

5.2.1.2 Fest adhärenen Leukozyten (Sticker)

In unserer Studie konnten wir in allen Versuchsgruppen am Messzeitpunkt 0 Stunden ein erhöhtes Baseline-Sticking beobachten. Dies kann durch die versuchsbedingte Manipulation des untersuchten Gewebes erklärt werden. Fest adhärenen Leukozyten werden unter physiologischen Bedingungen in der Regel nicht beobachtet [124].

Die Anzahl der fest adhärenen Leukozyten blieb sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der C1-INH+FXIII-Gruppe im Verlauf des Versuches weitergehend konstant etwa bei Baseline-Werten.

Schmidt et al. untersuchten den Einfluss von C1-Esterase-Inhibitor auf die Leukozytenadhärenz in einem ähnlichen Modell an mesenterialen Venolen von Ratten. Auch hier wurde sowohl in der Kontroll- als auch in den mit C1-Esterase-Inhibitor behandelten Gruppen (Dosis C1-INH 7,5 U/kg KG oder 15 U/kg KG) eine unveränderte feste Adhärenz der Leukozyten auf dem Baseline-Niveau beobachtet, dagegen kam es in der Endotoxin-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der fest adhärenen Leukozyten [131].

In unserer Studie war die Anzahl der fest adhärenen Leukozyten in der Endotoxin-Gruppe zum Messzeitpunkt 1 h viermal höher als in der Kontroll-Gruppe. Der Anstieg der Adhärenz von Leukozyten war nicht auf hämodynamische Veränderungen zurückzuführen, da es keine signifikanten Unterschiede im mittleren arteriellen Blutdruck zwischen den Kontroll- und den mit Endotoxin belasteten Gruppen zum Mikroskopiezeitpunkt gab. Zahlreiche andere Studien beschrieben auch eine Zunahme der fest adhärenen Leukozyten unter Endotoxinämie. Unter der Berücksichtigung unterschiedlichen Maßeinheiten und LPS-Dosierungen ähneln unsere Ergebnisse den anderen Studien. Massberg et al. beobachteten nach LPS-Applikation (5 mg/kg KG) eine vierfache Zunahme der fest adhärenen Leukozyten in den submukösen Venolen der Ratten [132]. Kurose et al. beobachteten in mesenterialen Venolen von Ratten 1 Stunde nach Endotoxinämie (2 mg/kg/h) einen Anstieg der fest adhärenen Leukozyten auf 12 Leukozyten/4000 μm^2 [133]. Schmidt et al. zeigten an mesenterialen Venolen von Ratten einen Anstieg der Sticker auf ca. 1268 Zellen/ mm^2 nach 2 Stunden Endotoxinämie (2 mg/kg/h) [134].

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe Birnbaum et al. zeigten keine Reduktion der Anzahl der fest adhärenen Leukozyten in den submukösen Venolen nach Faktor XIII Verabreichung [128]. Lehmann et al. zeigten in einem ähnlichen Modell nach C1-Esterase-Inhibitor Verabreichung eine signifikante Reduktion der festen Adhärenz der Leukozyten um 35 % in den submukösen Venolen gegenüber der Endotoxin-Gruppe [129].

Die Applikation der Kombination des C1-Esterase-Inhibitors mit Faktor XIII bewirkte in unserer Studie eine signifikante Reduktion (- 69%) der fest adhärenen Leukozyten in den

mesenterialen Venolen gegenüber der Endotoxin-Gruppe. Dies könnte auf eine synergistische Wirkung von der Medikamentenkombination hindeuten.

Birnbaum et al. verabreichten in einer späteren Studie die Medikamentenkombination des C1-Esterase-Inhibitors (100E / kgKG) mit Faktor XIII (50E / kgKG) und erreichten damit ebenfalls eine signifikante Reduktion der festen Adhärenz der Leukozyten in den submukösen Venolen [130].

5.2.2 Extravasation

Die Störung der Mikrozirkulation und der endothelialen Integrität spielt eine zentrale Rolle während der Sepsis. Im Verlauf der Endotoxinämie kommt es zu einer Schädigung der Schrankenfunktion des Gefäßendothels mit einer Permeabilitätssteigerung der Gefäßwände und damit zur Ausbildung eines interstitiellen Gewebeödems. Die Ödembildung kann einerseits zu einer massiven Organdysfunktion führen, andererseits eine weitere Beeinträchtigung endothelialer Funktionen hervorrufen [135].

Zur Quantifizierung einer mikrovaskulären Permeabilität ist die Extravasation von FITC-markiertem Albumin ein Standardverfahren in vielen Versuchsmodellen.

Das Ausmaß der Extravasation hängt u.a. von der LPS-Dosierung ab. Außerdem kann die Extravasation aber auch durch die chirurgische Manipulation der Tiere, im Sinne einer operativ induzierten Inflammationsreaktion, beeinflusst werden.

In unserer Studie konnten wir in beiden mit Endotoxin behandelten Gruppen keine Zunahme der Plasmaextravasation im Vergleich zur Kontrollgruppe in den mesenterialen, postkapillären Venolen feststellen. Es konnte aber eine tendenzielle Erhöhung der Plasmaextravasation in allen Gruppen beobachtet werden.

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten Birnbaum et al. in einem ähnlichen Modell mit niedrigerer LPS-Dosierung von 2.5 mg/Kg/h ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede der Plasmaextravasation zwischen Endotoxin- und Kontroll-Gruppe [128].

In einer anderen Studie mit einer LPS-Dosierung von 2.5 mg/Kg/h beobachteten Lehmann et al. eine Zunahme der Plasmaextravasation über die Versuchszeit in der Kontroll- und in der Endotoxin-Gruppe, aber ohne Unterschied zwischen den beiden Gruppen [129].

Diverse Studien zeigen den auslösenden Effekt der Leukozyten-Endothel-Interaktionen für die Permeabilitätsstörungen des Endothels während der Endotoxinämie. Durch die aktivierten

Leukozyten freigesetzte Sauerstoffradikale und andere Mediatoren führen zu einer Schädigung des Endothelzellverbundes mit einer Erhöhung der endothelialen Permeabilität [116-117, 136]. Yi et al. beobachteten nach LPS-Gabe bei Tieren mit Neutropenie keine nennenswerte Steigerung der Permeabilität und zeigten damit einen direkten Zusammenhang zwischen der durch Endotoxin verursachte Leukozytenadhärenz und der erhöhten Gefäßpermeabilität [137]. Die Arbeitsgruppe von Kurose et al. zeigte in einem endotoxininduzierten Sepsis-Modell eine Korrelation zwischen der Erhöhung der Gefäßpermeabilität und der Zunahme der Leukozytenadhärenz [136]. Schmidt et al. beobachteten ebenfalls in einem Sepsismodell eine Korrelation zwischen der Anzahl permanent adhärenter Leukozyten und der Plasmaextravasation [138].

Allerdings es gibt auch Hinweise auf eine leukozytenunabhängige Extravasation. Walther et al. konnten in einem Sepsismodell an Ratten durch die Gabe von Fucoidin, einem Selektin-bindenden Polysaccharid, die Leukozytenadhärenz signifikant vermindern, während die Plasmaextravasation gegenüber der LPS-Gruppe nicht niedriger war [139]. Der Autor interpretierte dies als eine frühe leukozytenunabhängige Plasmaextravasation nach Induktion der Endotoxinämie.

Diese Annahme, dass sowohl leukozytenabhängige Mechanismen als auch leukozyten-unabhängige Faktoren für die Dysfunktion der Endothelbarrieren während der Endotoxinämie verantwortlich sind, wird auch durch unsere Ergebnisse unterstützt.

In unserer Studie konnte durch die Gabe von C1-Esterase-Inhibitor in Kombination mit Faktor XIII eine signifikante Reduktion der fest adhärenter Leukozyten erzielt werden, während die Plasmaextravasation gegenüber der Endotoxin-Gruppe nicht signifikant vermindert werden konnte.

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten Lehmann et al. eine Reduktion der Plasmaextravasation mit der C1-Esterase-Inhibitor Verabreichung [129]. In einer anderen Studie konnten Birnbaum et al. keine statistisch signifikante Reduktion der Plasmaextravasation nach Verabreichung von Faktor XIII zeigen, obwohl es einen Trend zu Reduktion der Plasmaextravasation im Vergleich zu Endotoxin-Gruppe gab [128].

5.3 Laborparameter

5.3.1 Leukozytenzahl

Zu den diagnostischen Kriterien der Sepsis gehört eine Leukozytenzahl entweder unter 4000/ μ l oder über 12.000/ μ l [140].

In experimentellen Sepsismodellen zeigt die Infusion von Endotoxin initial eine ausgeprägte Leukozytopenie [131, 141]. Der initialen Leukozytopenie kann bei längerer Beobachtungszeit eine reaktive Leukozytose folgen [91, 127]. Dieser Ablauf kann durch die verzögerte Freisetzung aus dem Knochenmark im Rahmen eines Entzündungsgeschehens erklärt werden. Baatz et al. beobachteten nach einem initialen Leukozytensturz einen Wiederanstieg der Leukozytenzahl im peripheren Blutbild ca. 6 h nach LPS-Applikation [127]. Aufgrund einer kürzeren Beobachtungszeit in unserem Versuch konnten wir keinen Wiederanstieg der Leukozytenzahl feststellen. Als Grund für die initiale Leukozytopenie wird die endotoxininduzierte Leukozytenadhärenz in der Peripherie angesehen. Hierbei stehen die im peripheren Blut vorhandenen Leukozyten im Gleichgewicht mit der Leukozytenbildung und der Leukozytenadhärenz [141].

In unserer Studie kam es in beiden mit Endotoxin behandelten Gruppen zu einer signifikanten Reduktion der Leukozyten im peripheren Blut gegenüber der Kontroll-Gruppe. Zum Messzeitpunkt 0 Stunden lag die Leukozytenzahl in allen Gruppen auf dem gleichen Niveau. In der Endotoxin- Gruppe korrelierte Leukozytopenie mit der Zunahme der fest adhärennten Leukozyten in unseren intravitalmikroskopischen Beobachtungen.

Schmidt et al. fanden in einem ähnlichen Modell in der Endotoxingruppe neben einem signifikanten Anstieg der fest adhärennten Leukozyten in mesenterialen Venolen, eine signifikante Reduktion der Leukozyten im peripheren Blut. In der Kontrollgruppe sowie in den mit C1-Esterase-Inhibitor behandelten Gruppen (7,5 U/kg KG oder 15 U/kg KG) blieb die Leukozytenzahl stabil, während eine unveränderte feste Adhärenz der Leukozyten auf dem Baseline-Niveau beobachtet wurde [131].

Die Gabe der Kombination des C1-Esterase-Inhibitors mit Faktor XIII zeigte in der C1-INH+FXIII-Gruppe keinen signifikanten Einfluss auf die periphere Leukozytenzahl gegenüber der Endotoxin-Gruppe.

Lehmann et al. zeigten eine signifikante Reduktion der Leukozyten im peripheren Blut in der Endotoxin- und der mit C1-Esterase-Inhibitor behandelten Gruppe im Vergleich zu der

Kontrollgruppe. Die Leukozytopenie korrelierte mit einer Zunahme der fest adhärenen Leukozyten in den submukösen Venolen von Ratten [129].

In der Kontroll-Gruppe kam es zu einem Anstieg der Leukozytenzahl nach 1,5 Stunden. Am Versuchsende lag die Leukozytenzahl wieder bei Werten des Ausgangsniveaus. Dies kann durch die versuchsbedingte Manipulation des untersuchten Gewebes mit nachfolgender Aktivierung des Immunsystems erklärt werden. Aufgrund der Entleerung der Leukozytenpools (z.B. Milz, Lymphknoten, Knochenmark) kommt es zuerst zu einem Anstieg der Leukozytenzahl gefolgt von einer Migration der Leukozyten in das Gewebe. Durch Erschöpfung der Leukozyten-Reservoirs kommt es wieder zu einem Abfall der Leukozytenzahl im peripheren Blut.

5.3.2 Interleukine

5.3.2.1 TNF- α

TNF- α gehört zu den ersten proinflammatorischen Zytokinen, das auf einen bakteriellen Reiz hin hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen freigesetzt wird. TNF- α wird innerhalb von Minuten nach Infektion ausgeschüttet und ein Peak findet sich in der Regel nach 1 – 2 Stunden und bereits nach 4 – 6 h kann kein nachweisbarer Serumspiegel mehr gefunden werden [142]. TNF- α führt u.a. zur Produktion und Ausschüttung von weiteren proinflammatorisch wirkenden Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und IL-8.

TNF- α initiiert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen. Dies begünstigt die Adhärenz von Granulozyten und ermöglicht die Einwanderung dieser Zellen aus dem Blutstrom ins Gewebe an den Entzündungsort [30, 48].

In Studien an Hunden zeigten sich nach einer Applikation von TNF- α allgemeine endotoxininduzierte Symptome wie Tachykardie, Hypotension, Tachypnoe, metabolische Azidose und multiplen Organschädigungen [143].

In unserer Untersuchung konnten wir im Rahmen der Endotoxinämie erhöhte TNF- α Werte im Serum mittels eines rattenspezifischen ELISA bestimmen. In der Endotoxin-Gruppe fanden wir einen signifikanten Anstieg der TNF- α Konzentration mit einem maximalen Wert von ca. 1000 pg/ml nach 1,5 Stunden. Dieser Wert fiel im Verlauf zum Messzeitpunkt 3 Stunden wieder signifikant ab. Die abfallende TNF- α Konzentration lässt sich durch die kurze

Halbwertszeit des TNF- α erklären. Die LPS induzierte TNF- α Freisetzung mit seinem Maximum nach 1 – 2 Stunden wird in vielen Arbeiten demonstriert [142, 144-145].

In unserer Studie lag die TNF- α Konzentration in der Endotoxin-Gruppe signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe. Der TNF- α Anstieg unter Endotoxinämie verdeutlicht in unserer Studie die Wirksamkeit des applizierten LPS.

In der Kontroll-Gruppe beobachteten wir einen leichten, aber signifikanten Anstieg der TNF- α -Konzentration auf ca. 80 pg/ml. Ähnliche Werte wurden bei gesunden menschlichen Probanden beschrieben [146]. Dies interpretierten wir als einen Einfluss unserer invasiven Methodik (Gefäßpräparation, Laparotomie und Darmmanipulation) im Sinne einer operativ induzierten Inflammationsreaktion.

Die TNF- α Werte der C1-INH+FXIII-Gruppe waren nach 1.5 Stunden bei ca. 870 pg/ml und lagen damit nicht signifikant unter denen der Endotoxin-Gruppe.

5.3.2.2 Interleukin-10

Interleukin-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, welches bei der Stimulation der Immunantwort durch Makrophagen, Monozyten und TH-2-Lymphozyten produziert wird. Es führt zu einer Hemmung der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen u.a. TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-8 durch eine Inhibierung des nukleären Faktors-kB (NF-kB) auf der Ebene der Transkription [147-148]. In einigen Sepsismodellen konnte exogen appliziertes IL-10 die Produktion von TNF- α und IL-1 unterdrücken, die inflammatorische Reaktion begrenzen und das Überleben verbessern. Die Applikation von IL-10 Antikörpern hingegen steigerte die Mortalität durch Endotoxinämie [149-151]. Bei Patienten mit septischem Schock wurden deutlich erhöhte IL-10 Werte gemessen. In gesunden Patienten war IL-10 dagegen nicht messbar [152].

In unserer Studie stiegen die IL-10 Konzentrationen in beiden mit Endotoxin behandelten Gruppen über die Versuchszeit und im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant an.

Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten ebenfalls einen signifikanten Anstieg der IL-10-Werte während der Endotoxinämie [153].

In der Endotoxin-Gruppe fanden wir nach 1,5 Stunden einen signifikanten Anstieg der IL-10 Konzentration auf 223 pg/ml von ca. 6 pg/ml zum Messzeitpunkt 0 Stunden. In der C1-

INH+FXIII-Gruppe kam es nach 1,5 Stunden zu einer signifikanten Erhöhung der IL-10-Konzentration von ca. 15pg/ml auf ca.190 pg/ml.

Die Applikation von C1-INH+FXIII hatte keinen signifikanten Einfluss auf IL-10-Spiegel.

Lehmann et al. beschrieben eine signifikante Erhöhung der IL-10-Konzentration durch Applikation des C1- INH in einem ähnlichen Versuchsmodell [129].

In der Kontroll-Gruppe beobachteten wir einen signifikanten Anstieg der IL-10 Konzentration, die Werte lagen aber im Vergleich zu den beiden mit Endotoxin behandelten Gruppen signifikant niedriger. Wir interpretierten dies als Folge einer durch operative, invasive Methodik induzierte Inflammationsreaktion.

5.3.2.3 Interleukin-1 β

Interleukin-1 β und TNF- α stehen am Anfang der inflammatorischen Kaskade und gehören zu den wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen. Die Produktion von IL-1 β wird besonders durch bakterielle Endotoxine angeregt und wird hauptsächlich von Monozyten, aktivierten Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildet [154-155]. IL-1 β wirkt synergistisch mit TNF- α und stimuliert die Sekretion anderer Zytokine, darunter IL-6 und IL-8 [156]. Es stimuliert T-Helferzellen zur Bildung von IL-2 und Expression von IL-2 Rezeptoren, steigert die Proliferation von B-Lymphozyten, unterstützt die Zellentwicklung im Knochenmark, wirkt als endogenes Pyrogen und aktiviert die Akute-Phase-Reaktion [156-158]. Des Weiteren steigert IL-1 β durch granulozytäre und endotheliale Effekte die Adhärenz von Polymorphonuclear Neutrophils (PMN) an das Endothel und induziert sekundäre Mediatoren [156].

In unserer Studie traten in der Kontroll-Gruppe keine signifikanten Veränderungen der IL-1 β -Konzentration auf. Als Zeichen der entzündlichen Aktivität waren die IL-1 β -Werte in beiden mit Endotoxin behandelten Gruppen signifikant höher als in der Kontroll-Gruppe.

Cannon et al. beobachteten bei gesunden menschlichen Probanden nach Infusion von Endotoxin einen Anstieg der IL-1 β Werte, welche aber ca.15fach unter der max. TNF- α Konzentration lagen [159].

Durch die Gabe von C1-Esterase-Inhibitor mit Faktor XIII konnten wir eine signifikante Reduktion der IL-1 β Konzentration zu den Messzeitpunkten 1,5 und 3 Stunden im Vergleich zu der Endotoxin-Gruppe beobachten.

Untersuchungen mit C1-Esterase-Inhibitor mit Faktor XIII in Bezug auf Endotoxin induzierte IL-1 β -Produktion liegen in der Literatur nicht vor.

5.3.2.4 Interleukin-6

IL-6 nimmt in der Sepsis eine besondere Stellung ein. Bereits vor Auftreten der ersten klinischen Symptome einer Sepsis steigt IL-6 an und ist damit ein früher Marker bei Entzündungen. Anders als TNF- α und IL-1 β weist IL-6 neben proinflammatorischen auch antiinflammatorische Effekte (u.a. Hemmung der endotoxinstimulierten IL-1- und TNF- α -Synthese, Stimulierung von Adrenocorticotropen Hormon (ACTH) Synthese und damit die Bildung von Glukokortikoiden) auf [160]. IL-6 wird in Monozyten/Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten und vielen anderen Zellen gebildet [160-161]. Ebenso wie TNF- α führt IL-6 zu einer verstärkten Bildung von Adhäsionsmolekülen und einer gesteigerten Diapedese von Granulozyten aus dem Blutstrom ins Gewebe an den Entzündungsort. Erhöhte Blutspiegel von IL-6 korrelierten mit dem Schweregrad der Sepsis und eignen sich als Prognosemarker [162-163]. Die IL-6 Konzentrationen können bei Sepsis bis zu 1000-fach erhöht sein [164].

In unserer Studie beobachteten wir in beiden mit Endotoxin behandelten Gruppen einen jeweils signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration im Verhältnis zum jeweiligen Ausgangswert und zur Kontroll-Gruppe.

In der Endotoxin-Gruppe wurde der maximale IL-6 Spiegel zum Messzeitpunkt 3 Stunden erreicht und lag bei ca. 5050 pg/ml. In der C1-INH+FXIII-Gruppe lag der Peak der IL-6-Konzentration am Messzeitpunkt 3 Stunden bei ca. 7860. Auch Sadeghi et al. beobachteten in einem Endotoxinmodell an Mäusen einen Peak der IL-6 Plasmakonzentration ungefähr 3 Stunden nach LPS Applikation [165].

Tassani et al. zeigten eine Reduktion der IL-6-Konzentration durch die prophylaktische Anwendung von C1-Esterase-Inhibitor in Neonaten die sich einer herzchirurgischen Intervention unterziehen müssten [166]. Wir fanden allerdings in der C1-INH+FXIII-Gruppe signifikant höhere IL-6-Konzentration zu den Messzeitpunkten 1,5 und 3 Stunden im Vergleich zu der Endotoxin-Gruppe.

In unserem Tiermodell gab es keine getrennte Tiergruppe, die den alleinigen Einfluss des Faktors XIII auf die IL-6- Ausschüttung zeigen konnte. Dennoch Marin et al. beobachteten in

Patienten mit Val34Leu Polymorphismus im Gen der F XIII-A-Untereinheit, der zu einer erhöhten F XIII-Aktivität führt, höhere Plasmakonzentration von IL-6 im Vergleich zu Kontrolle [167].

Die Verstärkte Ausschüttung von IL-6 in der C1-INH+FXIII-Gruppe deutet auf eine mögliche proinflammatorische Wirkung der Therapie mit der Medikamentenkombination C1-Esterase-Inhibitor mit Faktor XIII hin.

In der Kontroll-Gruppe kam es zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration über die Versuchszeit. Diese Erhöhung der IL-6-Spiegel in der Kontroll-Gruppe kann auf das Gewebetrauma durch unsere invasive Methodik (Gefäßpräparation, Laparotomie und Darmmanipulation) zurückgeführt werden. IL-6 wird nach jeder Art von Gewebeerstörung freigesetzt und korreliert hierbei mit dem Ausmaß der Gewebeschädigung [168-169].

5.4 Häodynamik

Bei der Untersuchung von Vorgängen in der Endstrombahn infolge Endotoxinämie ist es wichtig eine Abgrenzung von makrohäodynamischen Veränderungen (z.B. systemische Hypotension) auf die Mikrozirkulation zu haben [103]. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) hat über seinen Einfluss auf die Scherkräfte eine modulierende Wirkung auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion [104]. Hauptziel unserer Arbeit war die Endotoxin-spezifischen Veränderungen der mesenterialen Mikrozirkulation zu untersuchen. Um die Vorgänge unabhängig vom MAP beurteilen zu können wählten wir ein Studiendesign, in dem durch eine kontinuierliche, begrenzte Endotoxingabe und adäquate Volumensubstitution ein normotensiver Zustand der Versuchstiere beibehalten werden konnte.

In unserer Studie blieb der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Endotoxin- und C1-INH+FXIII-Gruppe im Verlauf von 3 Stunden weitergehend stabil. Zwischen den einzelnen Gruppen existierten im Versuchsverlauf, besonders zum Zeitpunkt der Mikroskopie keine signifikanten Unterschiede bezüglich des MAP.

Veränderungen der Herzfrequenz und des mittleren arteriellen Blutdruckes dienen in Studien mit Endotoxin-Modellen als Effektivitätskriterium der Endotoxinämie. Bereits unmittelbar nach Induktion einer Endotoxinämie kann eine Kontrolle des Wirkungseintritts anhand des Herzfrequenzanstieges vorgenommen werden.

Xu et al. beschrieben in einem Endotoxin-Modell an Ratten mit einer LPS-Dosis von 5 mg/kg KG einen Anstieg der Herzfrequenz bei unveränderten MAP und ein erhöhtes Herzminutenvolumen. Damit zeigten sie, dass die Ratten sich in einer hyperdynamen Kreislaufphase befanden [170]. Andere Arbeitsgruppen fanden auch einen Anstieg der Herzfrequenz nach Endotoxin-Applikation [131, 141].

In unserer Studie beobachteten wir in allen Gruppen die Endotoxin erhielten einen signifikanten Anstieg der Herzfrequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe war bezüglich der Herzfrequenz weitergehend stabil.

Die Kombination des C1-Esterase-Inhibitors mit Faktor XIII hatte wie erwartet keinen Einfluss auf die Herzfrequenz und den mittleren arteriellen Blutdruck.

VI Zusammenfassung

Trotz erheblicher Fortschritte in der Intensivmedizin und Forschung stellt die Sepsis aufgrund stetig steigender Inzidenz und unverändert hoher Letalität ein immer wichtiger werdendes Problem auf der Intensivstation dar.

Eine generalisierte Entzündungsreaktion steht im Mittelpunkt der Sepsis. Die pathophysiologische Endstrecke beinhaltet eine exzessive Aktivierung von humoralen und zellulären Kaskadensystemen. Die Folgen sind Störungen der Mikrozirkulation, verstärkte Leukozyten-Endothel-Interaktion und Schädigung der endothelialen Integrität mit nachfolgender Ödembildung und Organfunktionsstörung.

Weiterhin kommt es zu einer Aktivierung des Komplementsystems, des Kontaktphasensystems und der Gerinnung. Die überschießende Aktivierung dieser plasmatischen Kaskadensysteme führt zu einem Verbrauch der Faktoren.

Eine mögliche therapeutische Option zur Behandlung der Sepsis besteht in medikamentöser Beeinflussung dieser Kaskaden.

C1-Inhibitor ist der wichtigste Inhibitor des klassischen Aktivierungswegs des Komplementsystems, des Kontaktphasensystems und der intrinsischen Gerinnung.

Gerinnungsfaktor XIII hat neben seiner gerinnungsaktiven Wirkung noch andere Funktionen, wie die Beeinflussung der Zelladhäsion / Zellmigration und Stabilisierung der Endothelbarriere.

Die Störung der Mikrozirkulation des Darmes spielt in der Pathogenese der Sepsis und des Multiorganversagens eine zentrale Rolle. Daher wurde in der vorgestellten Studie in einem etablierten Sepsis-Modell an Ratten mittels Intravitalmikroskopie der Einfluss der Medikamentenkombination von C1-Esterase-Inhibitor und Gerinnungsfaktor XIII auf die mesenteriale Mikrozirkulation untersucht. Die Leukozyten-Endothel-Interaktionen dienten dabei als Maß für die Leukozytenaktivierung. Die Plasmaextravasation wurde als Parameter für die Schädigung der endothelialen Integrität quantitativ erfasst.

Im Rahmen dieser Studie konnten wir zeigen, dass die Medikamentenkombination von C1-Esterase-Inhibitor und Gerinnungsfaktor XIII eine signifikante Reduktion der fest adhärenen Leukozyten in den mesenterialen Venolen gegenüber der Endotoxin-Gruppe bewirkt. Wir

konnten aber keinen Einfluss der Medikamentenkombination auf die temporär adhärenen Leukozyten oder die Plasmaextravasation zeigen.

Die Gabe der Medikamentenkombination C1-Esterase-Inhibitor mit Gerinnungsfaktor XIII konnte den Endotoxin induzierten Anstieg der plasmatischen Konzentration an IL-1 β signifikant verringern. Jedoch kam es zu einer verstärkten Ausschüttung von IL-6 in der C1-INH+FXIII-Gruppe, was auf eine mögliche proinflammatorische Wirkung der Medikamentenkombination hindeuten könnte.

Weitere Studien sind erforderlich, um die Wirkungen der Kombination von C1-Esterase-Inhibitor und Gerinnungsfaktor XIII während der Sepsis, zum Beispiel in anderen Dosierungen, zu untersuchen.

Schlüsselwörter:

Sepsis, Intravitalmikroskopie, Plasmaextravasation Leukozytenaktivierung, Leukozyten-Endothel-Interaktion, C1-Esterase-Inhibitor, Faktor XIII.

Literaturverzeichnis

1. Engel, C., et al., *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Med, 2007. **33**(4): p. 606-18.
2. Reinhart, K., et al., *Diagnose und therapie der sepsis: S2-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)*. Anaesthesist, 2006. **55 Suppl 1**: p. 43-56.
3. Davies, A., et al., *Severe Sepsis: A European estimate of the burden of disease in ICU. Oral presentation "Costing the septic patient"*. Int Care Med, 2001. **27(Suppl)**: p. S284.
4. Sands, K.E., et al., *Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group*. JAMA, 1997. **278**(3): p. 234-240.
5. Angus, D.C., et al., *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. Crit Care Med, 2001. **29**(7): p. 1303-10.
6. Schottmüller, H., *Wesen und Behandlung der Sepsis*. Verhandl dt Kongress Inn Med, 1914. **31**: p. 257-280.
7. Bone, R.C., 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): p. 1644-1655.
8. Levy, M.M., et al., *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. Crit Care Med, 2003. **31**(4): p. 1250-6.
9. Zeni, F., B. Freeman, and C. Natanson, *Anti-inflammatory therapies to treat sepsis and septic shock: a reassessment*. Crit Care Med, 1997. **25**(7): p. 1095-100.
10. Lehr, H.A., F. Bittinger, and C.J. Kirkpatrick, *Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenetic basis for therapy?* J Pathol., 2000. **190**(3): p. 373-386.
11. Rademacher, P., T. Scheeren, and M. Weiss, *Treatment of Sepsis: A Look at Prostacyclin in Vincent JL (ed.)*. Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine Berlin Heidelberg New-York, Springer-Verlag, 1994: p. 48-56.
12. Bone, H.G., A. Sielenkamper, and M. Booke, *Sauerstoffangebot in der Sepsis. Seit 10 Jahren mehr Fragen als Antworten*. 1999. **48**(2): p. 63-79.
13. Paterson, R.L. and N.R. Webster, *Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome*. J R Coll Surg Edinb, 2000. **45**(3): p. 178-82.
14. Williams, T.J. and P.G. Hellewell, *Endothelial cell biology. Adhesion molecules involved in the microvascular inflammatory response*. Am Rev Respir Dis, 1992. **146**(5 Pt 2): p. S45-50.
15. Poxton, I.R., *Antibodies to lipopolysaccharide*. J Immunol Methods, 1995. **186**(1): p. 1-15.
16. Schuster, H.P. and K. Werdan, *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen*. 3. Auflage ed. 2000, Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio: Springer.
17. Frey, E.A., et al., *Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1992. **176**(6): p. 1665-1671.
18. Ulevitch, R.J. and P.S. Tobias, *Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 437-57.
19. Chow, J.C., et al., *Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction*. J Biol Chem, 1999. **274**(16): p. 10689-92.
20. Kirschning, C.J., et al., *Human toll-like receptor 2 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharide*. J Exp Med, 1998. **188**(11): p. 2091-7.
21. Gray, P.W., et al., *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): p. 188-190.

22. Springer, T.A., *Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 827-72.
23. Butcher, E.C., *Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity*. Cell, 1991. **67**(6): p. 1033-6.
24. Bevilacqua, M.P., et al., *Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines*. J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 2003-11.
25. Carlos, T.M. and J.M. Harlan, *Leukocyte-endothelial adhesion molecules*. Blood, 1994. **84**(7): p. 2068-101.
26. Ley, K., et al., *Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo*. Blood, 1991. **77**(12): p. 2553-5.
27. Lawrence, M.B. and T.A. Springer, *Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins*. Cell, 1991. **65**(5): p. 859-73.
28. Mayadas, T.N., et al., *Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice*. Cell, 1993. **74**(3): p. 541-54.
29. Konstantopoulos, K. and L.V. McIntire, *Effects of fluid dynamic forces on vascular cell adhesion*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S19-23.
30. Ley, K., *Leukocyte adhesion to vascular endothelium*. J Reconstr Microsurg, 1992. **8**(6): p. 495-503.
31. Bevilacqua, M.P. and R.M. Nelson, *Selectins*. J Clin Invest, 1993. **91**(2): p. 379-87.
32. Berg, E.L., et al., *L-selectin-mediated lymphocyte rolling on MAdCAM-1*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 695-8.
33. Melrose, J., et al., *IFN-gamma inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2457-64.
34. Billups, K.L., et al., *Expression of E-selectin mRNA during ischemia/reperfusion injury*. J Lab Clin Med, 1995. **125**(5): p. 626-33.
35. Seekamp, A. and P.A. Ward, *Ischemia-reperfusion injury*. Agents Actions Suppl, 1993. **41**: p. 137-52.
36. von Asmuth, E.J., et al., *Evidence for endocytosis of E-selectin in human endothelial cells*. Eur J Immunol, 1992. **22**(10): p. 2519-26.
37. Kuijpers, T.W., et al., *Cytokine-activated endothelial cells internalize E-selectin into a lysosomal compartment of vesiculotubular shape. A tubulin-driven process*. J Immunol, 1994. **152**(10): p. 5060-9.
38. von Andrian, U.H., et al., *L-selectin mediates neutrophil rolling in inflamed venules through sialyl LewisX-dependent and -independent recognition pathways*. Blood, 1993. **82**(1): p. 182-91.
39. Bevilacqua, M.P., et al., *Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins*. Science, 1989. **243**(4895): p. 1160-1165.
40. Geng, J.G., et al., *Rapid neutrophil adhesion to activated endothelium mediated by GMP-140*. Nature, 1990. **343**(6260): p. 757-60.
41. Moore, K.L., et al., *Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells*. J Cell Biol, 1992. **118**(2): p. 445-56.
42. McEver, R.P., *Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis*. Glycoconj J, 1997. **14**(5): p. 585-91.
43. Subramaniam, M., J.A. Koedam, and D.D. Wagner, *Divergent fates of P- and E-selectins after their expression on the plasma membrane*. Mol Biol Cell, 1993. **4**(8): p. 791-801.
44. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion*. J Leukoc Biol, 1994. **55**: p. 662-675.
45. Sanchez-Mateos, P., C. Cabanas, and F. Sanchez-Madrid, *Regulation of integrin function*. Semin Cancer Biol, 1996. **7**(3): p. 99-109.
46. Stewart, M., M. Thiel, and N. Hogg, *Leukocyte integrins*. Curr Opin Cell Biol, 1995. **7**(5): p. 690-6.

47. Lorant, D.E., et al., *Coexpression of GMP-140 and PAF by endothelium stimulated by histamine or thrombin: a juxtacrine system for adhesion and activation of neutrophils*. J Cell Biol, 1991. **115**(1): p. 223-34.
48. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
49. Berg, R.D., *Bacterial translocation from the gastrointestinal tract*. Adv Exp Med Biol, 1999. **473**: p. 11-30.
50. Michel, C.C. and F.E. Curry, *Microvascular permeability*. Physiol Rev, 1999. **79**(3): p. 703-61.
51. Dejana E, P.J.-L., *Molecular organization of endothelial cell to cell junctions*. In: *Vascular endothelium: Responses to injury*. Catravas JD (ed). New York: Plenum Press, 1996: p. 167-71.
52. Renkin EM, C.C., *Microcirculation and capillary exchange*. In: *Comprehensive human physiology*. Greger B, Windhorst U (eds). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1996: p. 1995-79.
53. Trappe, U. and H. Riess, *Pathophysiologische Grundsätze bei Sepsis*. Hamostaseologie, 2005. **25**(2): p. 175-82.
54. Reinhart, K., et al., *Pravention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. Erste Revision der S2k-Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)*. Anaesthesist, 2010. **59**(4): p. 347-70.
55. Bernard, G.R., et al., *Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis*. N Engl J Med, 2001. **344**(10): p. 699-709.
56. Kramer, J., et al., *Synthesis of C1 inhibitor in fibroblasts from patients with type I and type II hereditary angioneurotic edema*. J Clin Invest, 1991. **87**(5): p. 1614-20.
57. Makrides, S.C., *Therapeutic inhibition of the complement system*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(1): p. 59-87.
58. Zeerleder, S., et al., *Aktivierung der plasmatischen Kaskadensysteme bei Sepsis: Rolle von C1-Inhibitor*. Schweiz Med Wochenschr, 1999. **129**(39): p. 1410-7.
59. Frick, I.M., L. Bjorck, and H. Herwald, *The dual role of the contact system in bacterial infectious disease*. Thromb Haemost, 2007. **98**(3): p. 497-502.
60. Hack, C.E., et al., *Elevated plasma levels of the anaphylatoxins C3a and C4a are associated with a fatal outcome in sepsis*. Am J Med, 1989. **86**(1): p. 20-6.
61. Jansen, P.M., et al., *Inhibition of factor XII in septic baboons attenuates the activation of complement and fibrinolytic systems and reduces the release of interleukin-6 and neutrophil elastase*. Blood, 1996. **87**(6): p. 2337-44.
62. Walport, M.J., *Complement. First of two parts*. N Engl J Med, 2001. **344**(14): p. 1058-66.
63. Walport, M.J., *Complement. Second of two parts*. N Engl J Med, 2001. **344**(15): p. 1140-4.
64. Moore, F.D., Jr., *Therapeutic regulation of the complement system in acute injury states*. Adv Immunol, 1994. **56**: p. 267-99.
65. Quezado, Z.M., et al., *The third component of complement protects against Escherichia coli endotoxin-induced shock and multiple organ failure*. J Exp Med, 1994. **179**(2): p. 569-78.
66. Stevens, J.H., et al., *Effects of anti-C5a antibodies on the adult respiratory distress syndrome in septic primates*. J Clin Invest, 1986. **77**(6): p. 1812-6.
67. Jansen, P.M., et al., *Effect of C1 inhibitor on inflammatory and physiologic response patterns in primates suffering from lethal septic shock*. J Immunol, 1998. **160**(1): p. 475-484.
68. Wuillemin, W.A., et al., *Activation of the intrinsic pathway of coagulation in children with meningococcal septic shock*. Thromb Haemost, 1995. **74**(6): p. 1436-41.
69. Nuijens, J.H., et al., *Quantification of plasma factor XIIa-C1(-)-inhibitor and kallikrein-C1(-)-inhibitor complexes in sepsis*. Blood, 1988. **72**(6): p. 1841-8.
70. Voss, R., et al., *Activation and inhibition of fibrinolysis in septic patients in an internal intensive care unit*. Br J Haematol, 1990. **75**(1): p. 99-105.

71. DeLa Cadena, R.A., et al., *Activation of the kallikrein-kinin system after endotoxin administration to normal human volunteers*. Blood, 1993. **81**(12): p. 3313-7.
72. Pixley, R.A., et al., *The contact system contributes to hypotension but not disseminated intravascular coagulation in lethal bacteremia. In vivo use of a monoclonal anti-factor XII antibody to block contact activation in baboons*. J Clin Invest, 1993. **91**(1): p. 61-8.
73. Pixley, R.A., et al., *Activation of the contact system in lethal hypotensive bacteremia in a baboon model*. Am J Pathol, 1992. **140**(4): p. 897-906.
74. Nuijens, J.H., et al., *Proteolytic inactivation of plasma C1- inhibitor in sepsis*. J Clin Invest, 1989. **84**(2): p. 443-50.
75. de Boer, J.P., et al., *Activation of the complement system in baboons challenged with live Escherichia coli: correlation with mortality and evidence for a biphasic activation pattern*. Infect Immun, 1993. **61**(10): p. 4293-301.
76. McDonagh J, S.R., Egbring R, *Biochemistry of fibrin-stabilizing factor (XIII)*. In: *Factor XIII*. New York: Schattauer, 1993: p. 2-8.
77. Musbek, L., Vivien C. Yee, Zsuzsa Hevessy, *Blood Coagulation Factor XIII: Structure and Function*. Thromb. Res., 1999. **94**: p. 271.
78. Siebenlist, K.R., et al., *Orientation of the carboxy-terminal regions of fibrin gamma chain dimers determined from the crosslinked products formed in mixtures of fibrin, fragment D, and factor XIIIa*. Thromb Haemost, 1995. **74**(4): p. 1113-9.
79. Devine, D.V. and P.D. Bishop, *Platelet-associated factor XIII in platelet activation, adhesion, and clot stabilization*. Semin Thromb Hemost, 1996. **22**(5): p. 409-13.
80. Wozniak, G. and T. Noll, *Faktor XIII und Wundheilung. [Factor XIII and wound healing]*. Hamostaseologie, 2002. **22**(1): p. 59-62.
81. Sane, D.C., et al., *Vitronectin is a substrate for transglutaminases*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **157**(1): p. 115-20.
82. Knox, P., S. Crooks, and C.S. Rimmer, *Role of fibronectin in the migration of fibroblasts into plasma clots*. J Cell Biol, 1986. **102**(6): p. 2318-23.
83. Ueki, S., J. Takagi, and Y. Saito, *Dual functions of transglutaminase in novel cell adhesion*. J Cell Sci, 1996. **109 (Pt 11)**: p. 2727-35.
84. Mosher, D.F., et al., *Assembly of fibronectin into extracellular matrix*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **614**: p. 167-80.
85. Barry, E.L. and D.F. Mosher, *Factor XIIIa-mediated cross-linking of fibronectin in fibroblast cell layers. Cross-linking of cellular and plasma fibronectin and of amino-terminal fibronectin fragments*. J Biol Chem, 1989. **264**(7): p. 4179-85.
86. Matsuka, Y.V., M.M. Migliorini, and K.C. Ingham, *Cross-linking of fibronectin to C-terminal fragments of the fibrinogen alpha-chain by factor XIIIa*. J Protein Chem, 1997. **16**(8): p. 739-45.
87. Noll, T., et al., *Effect of factor XIII on endothelial barrier function*. J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1373-1382.
88. Noll, T. and G. Wozniak, *FXIII und endotheliale Barrierenfunktion*. Hamostaseologie, 2002. **22**(1): p. 28-31.
89. Freise, H., U.B. Bruckner, and H.U. Spiegel, *Animal models of sepsis*. J Invest Surg, 2001. **14**(4): p. 195-212.
90. Wichterman, K.A., A.E. Baue, and I.H. Chaudry, *Sepsis and septic shock - A review of laboratory models and a proposal*. J Surg Res, 1980. **29**: p. 189-200.
91. Traber, D.L., et al., *Comparison of the cardiopulmonary responses to single bolus and continuous infusion of endotoxin in an ovine model*. Circ Shock, 1989. **27**(2): p. 123-38.
92. Fink, M.P. and S.O. Heard, *Laboratory models of sepsis and septic shock*. J Surg Res, 1990. **49**(2): p. 186-196.

93. Parker, S.J. and P.E. Watkins, *Experimental models of gram-negative sepsis*. Br J Surg, 2001. **88**(1): p. 22-30.
94. Yoshikawa, T., et al., *Changes in tissue antioxidant enzyme activities and lipid peroxides in endotoxin-induced multiple organ failure*. 1994. **42**(1): p. 53-58.
95. Revhaug, A., et al., *Inhibition of cyclo-oxygenase attenuates the metabolic response to endotoxin in humans*. Arch Surg, 1988. **123**(2): p. 162-170.
96. Martich, G.D., A.J. Boujoukos, and A.F. Suffredini, *Response of man to endotoxin*. Immunobiology, 1993. **187**(3-5): p. 403-16.
97. Carrico, C.J., et al., *Multiple-organ-failure syndrome*. Arch Surg, 1986. **121**(2): p. 196-208.
98. Ammons, W.S. and A.H. Kung, *Recombinant amino terminal fragment of bactericidal/permeability-increasing protein prevents hemodynamic responses to endotoxin*. Circ Shock, 1993. **41**: p. 176-184.
99. de-Carvalho, H., et al., *Vascular permeability increase and plasma volume loss induced by endotoxin was attenuated by hypertonic saline with or without dextran*. Shock, 1999. **12**(1): p. 75-80.
100. Young, J.D. and E.M. Cameron, *Dynamics of skin blood flow in human sepsis*. Intensive Care Med, 1995. **21**(8): p. 669-674.
101. Bouvier, C., et al., *Platelet activating factor impairs pressor responses to noradrenaline in the anaesthetized rat but does not mediate endotoxin-induced hyporeactivity*. Circ Shock, 1994. **42**(1): p. 14-19.
102. Schuster, J.M. and P.S. Nelson, *Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(6): p. 767-73.
103. Baatz, H., et al., *In Vivo Study of Leukocyte-Endothelium Interaction in Endotoxin-Induced Uveitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**: p. 1960-1967.
104. Moazzam, F., et al., *The leukocyte response to fluid stress*. Proc Natl Acad Sci USA, 1997. **94**(10): p. 5338-5343.
105. Fink, M.P. and S.O. Heard, *Laboratory models of sepsis and septic shock*. J Surg Res, 1990. **49**(2): p. 186-96.
106. Johnston, T.D., W.W. Hampton, and D.E. Fry, *Septic hemodynamics produced by infusion of endotoxin*. Curr Surg, 1989. **46**(2): p. 101-3.
107. Xu, D., et al., *Mechanisms of endotoxin-induced intestinal injury in a hyperdynamic model of sepsis*. J Trauma, 1993. **34**(5): p. 676-82; discussion 682-3.
108. Schmidt, H., et al., *Ketamine attenuates endotoxin-induced leukocyte adherence in rat mesenteric venules*. Crit Care Med, 1995. **23**(12): p. 2008-14.
109. Grundmann, U., et al., *In vivo effects of halothane, enflurane, and isoflurane on hepatic sinusoidal microcirculation*. Acta Anaesthesiol Scand, 1997. **41**(6): p. 760-5.
110. Miller, L.S., et al., *Suppression of cytokine-induced neutrophil accumulation in rat mesenteric venules in vivo by general anesthesia*. Int J Microcirc Clin Exp, 1996. **16**(3): p. 147-54.
111. Janssen, G.H., et al., *Different effects of anesthetics on spontaneous leukocyte rolling in rat skin*. Int J Microcirc Clin Exp, 1997. **17**(6): p. 305-13.
112. Miura, S., et al., *Endotoxin stimulates lymphocyte-endothelial interactions in rat intestinal Peyer's patches and villus mucosa*. Am J Physiol, 1996. **271**(2 Pt 1): p. G282-92.
113. Neviere, R.R., et al., *Microvascular perfusion deficits are not a prerequisite for mucosal injury in septic rats*. Am J Physiol, 1999. **276**(4 Pt 1): p. G933-40.
114. Lehmann, C., et al., *Reduction in intestinal leukocyte adherence in rat experimental endotoxemia by treatment with the 21-aminosteroid U-74389G*. Intensive Care Med, 2001. **27**(1): p. 258-63.
115. Nolte, D., et al., *Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice*. Am J Physiol, 1994. **267**(4 Pt 2): p. H1320-8.
116. Volk, T., et al., *Secretion of MCP-1 and IL-6 by cytokine stimulated production of reactive oxygen species in endothelial cells*. Mol Cell Biochem, 2000. **206**(1-2): p. 105-112.

117. Pulletz, S., et al., *Influence of heparin and hirudin on endothelial binding of antithrombin in experimental thrombinemia*. Crit Care Med, 2000. **28**(8): p. 2881-2886.
118. Abels, C., et al., *Leukocyte-endothelium-interaction in pial vessels following global, cerebral ischaemia*. Acta Neurochir (Wien), 2000. **142**(3): p. 333-9.
119. Fiebig, E., K. Ley, and K.E. Arfors, *Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery*. Int J Microcirc Clin Exp, 1991. **10**(2): p. 127-144.
120. Scalia, R., et al., *Essential role of P-selectin in the initiation of the inflammatory response induced by hemorrhage and reinfusion*. J Exp Med, 1999. **189**(6): p. 931-8.
121. Steinbauer, M., et al., *Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model*. Langenbecks Arch Surg, 2000. **385**(4): p. 290-8.
122. Boros, M., et al., *Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine*. Gastroenterology, 1998. **114**(1): p. 103-114.
123. Janssen, G.H., et al., *Spontaneous leukocyte rolling in venules in untraumatized skin of conscious and anesthetized animals*. Am J Physiol, 1994. **267**(3 Pt 2): p. H1199-H1204.
124. Mayrovitz, H.N., *Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice*. Am J Physiol, 1992. **262**(1 Pt 2): p. H157-61.
125. Hickey, M.J., et al., *Endogenous interleukin-10 regulates hemodynamic parameters, leukocyte-endothelial cell interactions, and microvascular permeability during endotoxemia*. Circ Res, 1998. **83**(11): p. 1124-31.
126. Schmidt, H., et al., *Intestinal formation of hypoxanthine and uric acid during endotoxemia*. J Surg Res, 1997. **71**(1): p. 61-6.
127. Baatz, H., et al., *In vivo study of leukocyte-endothelium interaction in endotoxin-induced uveitis*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1995. **36**(10): p. 1960-7.
128. Birnbaum, J., et al., *Effects of coagulation factor XIII on intestinal functional capillary density, leukocyte adherence and mesenteric plasma extravasation in experimental endotoxemia*. Crit Care, 2006. **10**(1): p. R29.
129. Lehmann, C., et al., *Effects of C1 esterase inhibitor administration on intestinal functional capillary density, leukocyte adherence and mesenteric plasma extravasation during experimental endotoxemia*. Intensive Care Med, 2004. **30**(2): p. 309-14.
130. Birnbaum, J., et al., *The combinations C1 esterase inhibitor with coagulation factor XIII and N-acetylcysteine with tirilazad mesylate reduce the leukocyte adherence in an experimental endotoxemia in rats*. Clin Hemorheol Microcirc, 2008. **40**(3): p. 167-76.
131. Schmidt, W., et al., *C1-esterase inhibitor and its effects on endotoxin-induced leukocyte adherence and plasma extravasation in postcapillary venules*. Surgery, 1999. **125**(3): p. 280-7.
132. Massberg, S., et al., *In vivo assessment of the influence of cold preservation time on microvascular reperfusion injury after experimental small bowel transplantation*. Br J Surg, 1998. **85**(1): p. 127-33.
133. Kurose, I., et al., *Oxyradical generation from leukocytes during endotoxin-induced microcirculatory disturbance in rat mesentery--attenuating effect of cetraxate*. Toxicol Appl Pharmacol, 1993. **120**(1): p. 37-44.
134. Schmidt, H., et al., *N-acetylcysteine attenuates endotoxin-induced leukocyte-endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo*. Crit Care Med, 1997. **25**(5): p. 858-63.
135. Aird, W.C., *The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome*. Blood, 2003. **101**(10): p. 3765-77.
136. Kurose, I., et al., *Oxyradical generation from leukocytes during endotoxin-induced microcirculatory disturbance in rat mesentery--attenuating effect of cetraxate*. Toxicol Appl Pharmacol, 1993. **120**(1): p. 37-44.
137. Yi, E.S. and T.R. Ulich, *Endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor cause neutrophil-dependent microvascular leakage in postcapillary venules*. Am J Pathol, 1992. **140**(3): p. 659-63.

138. Schmidt, H., et al., *Effect of the 21-aminosteroid tirilazad mesylate on leukocyte adhesion and macromolecular leakage during endotoxemia*. *Surgery*, 1997. **121**(3): p. 328-34.
139. Walther, A., et al., *Leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia*. *Crit Care Med*, 2000. **28**(8): p. 2943-8.
140. Bone, R.C., 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): p. 1644-55.
141. Barroso-Aranda, J., et al., *Polymorphonuclear neutrophil contribution to induced tolerance to bacterial lipopolysaccharide*. *Circ Res*, 1991. **69**(5): p. 1196-206.
142. Kitoh, K., et al., *Comparison of heartworm extract-induced shock and endotoxin-induced shock in dogs by determination of serum tumor necrosis factor concentrations*. *Am J Vet Res*, 2001. **62**(5): p. 765-9.
143. Tracey, K.J., et al., *Cachectin/tumor necrosis factor induces lethal shock and stress hormone responses in the dog*. *Surg Gynecol Obstet*, 1987. **164**(5): p. 415-22.
144. Boillot, A., et al., *Myocardial and vascular adrenergic alterations in a rat model of endotoxin shock: reversal by an anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody*. *Crit Care Med*, 1997. **25**(3): p. 504-11.
145. Jin, H., et al., *Protection against rat endotoxic shock by p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor immunoadhesin: comparison with anti-TNF monoclonal antibody*. *J Infect Dis*, 1994. **170**(5): p. 1323-6.
146. Pinsky, M.R., et al., *Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality*. *Chest*, 1993. **103**(2): p. 565-75.
147. Randow, F., et al., *Mechanism of endotoxin desensitization: involvement of interleukin 10 and transforming growth factor beta*. *J Exp Med*, 1995. **181**(5): p. 1887-92.
148. Wang, P., et al., *Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(16): p. 9558-63.
149. Howard, M., et al., *Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia*. *J Exp Med*, 1993. **177**(4): p. 1205-8.
150. Gerard, C., et al., *Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia*. *J Exp Med*, 1993. **177**(2): p. 547-50.
151. Berg, D.J., et al., *Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance*. *J Clin Invest*, 1995. **96**(5): p. 2339-47.
152. Marchant, A., et al., *Interleukin-10 production during septicemia*. *Lancet*, 1994. **343**(8899): p. 707-8.
153. Birnbaum, J., 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): p. 99-111.
154. Bänkler, H.-W., *Medizinische Immunologie*. Vol. Losebl.-Ausg. 1995, Landsberg/Lech Ecomed.
155. Loppnow, H., *Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen*. *Der Internist*, 2001(Volume 42, Number 1 / January, 2001): p. 13-27.
156. Dinarello, C.A., *Proinflammatory cytokines*. *Chest*, 2000. **118**(2): p. 503-8.
157. Dinarello, C.A., *Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism*. *Blood*, 1991. **77**(8): p. 1627-52.
158. Blackwell, T.S. and J.W. Christman, *Sepsis and cytokines: current status*. *Br J Anaesth*, 1996. **77**(1): p. 110-7.
159. Cannon, J.G., et al., *Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever*. *J Infect Dis*, 1990. **161**(1): p. 79-84.
160. Ibelgauts, H., *Dictionary of cytokines*. 1995, Weinheim [u.a.] VCH.
161. Barton, B.E., *IL-6: insights into novel biological activities*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1997. **85**(1): p. 16-20.

162. Waage, A., et al., *The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome.* J Exp Med, 1989. **169**(1): p. 333-8.
163. Steinmetz, H.T., et al., *Increase in interleukin-6 serum level preceding fever in granulocytopenia and correlation with death from sepsis.* J Infect Dis, 1995. **171**(1): p. 225-8.
164. Fraunberger, P. and A.K. Walli, *Biomarker bei Sepsis und Entzündung / Biomarkers in Sepsis and Inflammation.* LaboratoriumsMedizin, 2007. **31**(6): p. 294-309.
165. Sadeghi, S., F.A. Wallace, and P.C. Calder, *Dietary lipids modify the cytokine response to bacterial lipopolysaccharide in mice.* Immunology, 1999. **96**(3): p. 404-10.
166. Tassani, P., et al., *Effect of C1-esterase-inhibitor on capillary leak and inflammatory response syndrome during arterial switch operations in neonates.* J Cardiothorac Vasc Anesth, 2001. **15**(4): p. 469-73.
167. Marin, F., et al., *Factor XIII Val34Leu polymorphism modulates the prothrombotic and inflammatory state associated with atrial fibrillation.* J Mol Cell Cardiol, 2004. **37**(3): p. 699-704.
168. Hack, C.E., et al., *Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis.* Blood, 1989. **74**(5): p. 1704-10.
169. Oka, Y., et al., *Circulating interleukin 6 as a useful marker for predicting postoperative complications.* Cytokine, 1992. **4**(4): p. 298-304.
170. Xu, D., et al., *Mechanisms of endotoxin-induced intestinal injury in a hyperdynamic model of sepsis.* J Trauma, 1993. **34**(5): p. 676-682.

Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
BPI	Bactericidal Permeability-Increasing protein
CD	Cluster of Differentiation
CLP-Modell	Cecal Ligation and Puncture-Modell
CRP	C-reaktives Protein
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
DIVI	Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensivmedizin und Notfallmedizin
DSG	Deutsche Sepsis-Gesellschaft
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ESICM	European Society for Intensive Care Medicine
FXIII	Faktor XIII
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GPI	Glycophosphatidylinositol
h	Stunde
HDL	High Density Lipoprotein
HF	Herzfrequenz
ICAM	Intercellular Adhasion Molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin

IVM	Intravitalmikroskopie
KG	Körpergewicht
LBP	Lipopolysaccharid Binding Protein
LDL	Low Density Lipoprotein
LFA	Lymphocyte Function Associated Antigen
LPB	Lipopolysaccharide Binding protein
LPS	Lipopolysaccharid
Mac-1 Antigen	Macrophagen-1 Antigen
MAP	Mean arterial blood pressure
mCD	molecular Cluster of Differentiation
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrom
MOV	Multiorganversagen
NaCl	Natriumchlorid
paCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PAF	Platelet Activating Factor
PGI ₂	Prostazyklin
PMN	Polymorphonuclear Neutrophils
s	Sekunde
SCCM	Society of Critical Care Medicine
sCD	soluble Cluster of Differentiation

ScvO ₂	Zentralvenöse Sauerstoffsättigung
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SLex	Sialyl-Lewisx-Antigen
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
ZVD	Zentraler Venendruck

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Leukozytenrolling
- Abbildung 2: Selektin-Domänen
- Abbildung 3: Leukozytensticking
- Abbildung 4: Schematischer Versuchsablauf
- Abbildung 5: Versuchsaufbau
- Abbildung 6: Temporär adhärenente Leukozyten (Roller) in n/min.
- Abbildung 7: Fest adhärenente Leukozyten (Sticker) in n/mm². a p<0.05 vs. Endotoxin-Gruppe
- Abbildung 8: Plasmaextravasation.
- Abbildung 9: Leukozytenzahl im peripheren Blut (Gpt/l). a p<0.05 vs. Kontroll-Gruppe, b p<0.05 vs. Kontroll-Gruppe 0h, c p<0.05 vs. Endotoxin-Gruppe 0h, d p<0.05 vs. C1-INH+FXIII-Gruppe 0h.
- Abbildung 10: TNF- α Konzentration in (pg/ml). a p<0.05 vs. Kontroll-Gruppe, b p<0.05 vs. Kontroll-Gruppe 0h
- Abbildung 11: Interleukin-10 Konzentration in (pg/ml). a p<0.05 vs. Kontroll-Gruppe, b p<0.05 vs. Kontroll-Gruppe 0h, c p<0.05 vs. Endotoxin-Gruppe 0h, d p<0.05 vs. C1-INH+FXIII-Gruppe 0h.
- Abbildung 12: Interleukin-1 β Konzentration in (pg/ml), a p<0.05 vs. Kontroll-Gruppe, b p<0.05 C1-INH+FXIII-Gruppe vs. Endotoxin-Gruppe.
- Abbildung 13: Interleukin-6 Konzentration in (pg/ml). a p<0.05 vs. Kontroll-Gruppe, b p<0.05 C1-INH+FXIII-Gruppe vs. Endotoxin-Gruppe, c p<0.05 vs. Kontroll-Gruppe 0h

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Professor Dr. Claudia Spies, Direktorin der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin am Campus Charité Mitte und Campus Virchow Klinikum, für die Überlassung des Themas und die Förderung der wissenschaftlichen Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank geht an Oberarzt PD Dr. Jürgen Birnbaum für seine hervorragende Betreuung, jederzeit gewährte fachliche und kritisch-konstruktive Unterstützung in meiner Arbeit. Für seine Mühe und Geduld sowie die mir entgegengebrachte freundschaftliche Verbundenheit danke ich Ihm besonders.

Großer Dank gilt Frau Dr. Edda Klotz für ihre wertvolle Unterstützung in der Korrekturphase meiner Arbeit.

Mein weiterer Dank gilt meiner Kollegin Julia Müller, ohne die die Durchführung der tierexperimentellen Abschnitte nicht in dieser Qualität und Kürze möglich gewesen wäre. Ebenfalls danke ich Daniel Luther und Nina Polze für die hervorragende Einarbeitung in die Methodik.

Frau Tania Schink danke ich für ihre Hilfestellung bei der statistischen Auswertung. Ebenso danke ich Frau Barbara Egerer für ihre Hilfe bei der biochemischen Bestimmung der Laborparameter. Desweiteren danke ich dem Team der Tierpfleger für die sorgsame Betreuung der Versuchstiere.

Meiner Familie danke ich für ihre Liebe, ihre Kraft und ihre Unterstützung aller meiner Pläne.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Jewgenij Feller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von C1-Esterase Inhibitor in Kombination mit Blutgerinnungsfaktor XIII auf die mesenteriale Mikrozirkulation bei experimenteller Endotoxinämie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum 27.11.2012

Jewgenij Feller

Lebenslauf

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

Publikationsliste

1. Birnbaum J, Klotz E, Spies CD, Mueller J, Vargas Hein O, Feller J, Lehmann C.

Impact of combined C1 esterase inhibitor/coagulation factor XIII or Nacetylcysteine/ tirilazad mesylate administration on leucocyte adherence and cytokine release in experimental endotoxaemia. J Int Med Res. 2008 Jul-Aug; 36(4):748-59.