

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III  
des Universitätsklinikums Halle (Saale)  
Direktor: Prof. Dr. med. Karl Werdan

## **Der Einfluss von C1-Esterase-Inhibitor und von Heparin auf den septischen Schock am Tiermodell**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Von:  
Frederic Putzschke  
geboren am 31.07.1987  
in Karl-Marx-Stadt

Betreuer: Prof. Dr. med. Michael Buerke

Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Buerke  
Prof. Dr. med. Ulf Sibelius  
Prof. Dr. med. Michael Bucher

Eröffnungsdatum: 16.01.2014

Verteidigungsdatum: 17.12.2014

*Für meine Eltern*

### Referat

Der septische Schock als eine komplexe, systemische Entzündungsreaktion auf dem Boden einer Infektion weist noch immer eine hohe Mortalität von über 50 % auf. Neue Behandlungsansätze konnten in den vergangenen Jahren dieses Risiko kaum senken. Allein klassische Strategien wie die Antibiotikatherapie oder die Fokussanierung zeigen nach wie vor die besten Effekte. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, ein Medikament zu finden, das die Letalität eines Endotoxin-induzierten, septischen Schocks am Rattenmodell reduziert, um somit neue Ansätze für die klinische Therapie zu liefern.

Dafür wurde männlichen Wistar Ratten mittels LPS (10 mg/kg KG) ein septischer Schock induziert. Entsprechend des Versuchsprotokolls wurden die Tiere gewichtsadaptiert mit den Medikamenten C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH; 100 units/kg KG), unfractioniertem Heparin (200 units/kg KG) oder Vehicle (Kochsalz) vorbehandelt und das Outcome bezüglich Überlebenszeit und verschiedener hämodynamischer Parameter verglichen. Nach Versuchsende erfolgte die Entnahme von Herz, Lunge, Leber und Niere, um die Expressionsänderung verschiedener Proteine und die MPO-Aktivität zu untersuchen. Zusätzlich wurden histologische Schnitte angefertigt.

Für die Tiere, die neben LPS mit C1-INH behandelt wurden, zeigte sich mit 152,6 min ( $p \leq 0,01$ ) ein fast verdoppeltes mittleres Überleben gegenüber der LPS Shock + Vehicle Gruppe (77,1 min). Die Tiere, denen zusätzlich zum Endotoxin Heparin verabreicht wurde, überlebten im Durchschnitt 157,7 min ( $p \leq 0,01$ ). In den SHAM Gruppen, die allein das Medikament erhielten, kam es zu keinem wesentlichen Einfluss auf die Überlebenszeit. Die hämodynamischen Parameter waren in der Gruppe, die LPS + Heparin erhielt, am instabilsten. Bei dem Vergleich der Expressionsänderung verschiedener am Entzündungsprozess beteiligter Proteine, wie z.B. VEGF oder MFG-E8, zeigten sich diese vor allem in der Niere für die LPS Shock + Medikamenten Gruppen signifikant vermindert. Auch in den histologischen Präparaten fanden sich weniger Entzündungszeichen verglichen mit den Tieren, die allein mit LPS behandelt wurden. Die MPO-Aktivität als Maß für die Entzündung zeigte in der LPS Shock + Heparin Gruppe höhere Werte als in der LPS Shock + Vehicle Gruppe. Bei den LPS Shock + C1-INH Tieren konnten im Vergleich geringere MPO-Werte gemessen werden. Bei Betrachtung aller Ergebnisse lassen sich vor allem für C1-INH günstige Effekte auf das Outcome des septischen Schocks erkennen, die weiter untersucht werden sollten. Aufgrund der teils widersprüchlichen Resultate für Heparin kann eine solche Empfehlung nicht ohne weiteres gegeben werden.

Putzschke Frederic: Der Einfluss von C1-Esterase-Inhibitor und von Heparin auf den septischen Schock am Tiermodell. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2014

## Inhaltsverzeichnis

		Seite
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....		<b>III</b>
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Sepsis</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Definition.....	1
1.1.2	Aktuelle Bedeutung.....	2
<b>1.2</b>	<b>Das Immunsystem</b> .....	<b>3</b>
1.2.1	Das angeborene Immunsystem.....	4
1.2.2	Das erworbene Immunsystem.....	7
<b>1.3</b>	<b>Pathophysiologie der Sepsis</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4</b>	<b>Aktuelle Therapierichtlinien</b> .....	<b>12</b>
<b>1.5</b>	<b>Experimentelle Sepsis-Therapie</b> .....	<b>14</b>
1.5.1	C1-Esterase-Inhibitor.....	14
1.5.2	Heparin.....	15
<b>2</b>	<b>Zielstellung der Arbeit</b> .....	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>18</b>
3.1.1	Tiermodell.....	18
3.1.2	Westernblot und Aktivitätsbestimmung der Myeloperoxidase.....	19
3.1.3	Histologie.....	20
3.1.4	Statistische Berechnungen und Analyseprogramme.....	20
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>21</b>
3.2.1	Tiermodell.....	21
3.2.2	Westernblot-Untersuchungen.....	24
3.2.3	Aktivitätsbestimmung der Myeloperoxidase.....	26
3.2.4	Histologische Untersuchung.....	28
3.2.5	Statistische Auswertungen.....	28
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1</b>	<b>Effekte von C1-INH im septischen Schock</b> .....	<b>29</b>
4.1.1	Überlebenszeit.....	29
4.1.2	Hämodynamische Parameter.....	30
4.1.3	Histologie.....	33
4.1.4	Proteinexpression.....	37
4.1.5	Myeloperoxidase-Aktivität.....	41

<b>4.2</b>	<b>Effekte von Heparin im septischen Schock</b>	<b>42</b>
4.2.1	Überlebenszeit	42
4.2.2	Hämodynamische Parameter	43
4.2.3	Histologie	45
4.2.4	Proteinexpression	49
4.2.5	Myeloperoxidase-Aktivität	52
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>53</b>
<b>5.1</b>	<b>Einfluss von C1-INH</b>	<b>53</b>
5.1.1	Überlebenszeit im Endotoxinschock	53
5.1.2	Hämodynamik im Endotoxinschock	54
5.1.3	Endotheldysfunktion im Endotoxinschock	55
5.1.4	Expression verschiedener Proteine im Endotoxinschock	57
5.1.5	Entzündungsreaktion im Endotoxinschock	60
<b>5.2</b>	<b>Einfluss von Heparin</b>	<b>61</b>
5.2.1	Überlebenszeit im Endotoxinschock	61
5.2.2	Hämodynamik im Endotoxinschock	62
5.2.3	Endotheldysfunktion im Endotoxinschock	63
5.2.4	Expression verschiedener Proteine im Endotoxinschock	65
5.2.5	Entzündungsreaktion im Endotoxinschock	67
<b>5.3</b>	<b>Vergleich C1-INH vs. Heparin</b>	<b>68</b>
<b>5.4</b>	<b>Limitationen und Methodenkritik</b>	<b>69</b>
<b>5.5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Thesen</b>	<b>80</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Ampere
ARDS	acute respiratory distress syndrom
c	Konzentration
C1-INH	C1-Esterase-Inhibitor
C3b, C5a...	Komplementfaktor 3b, aktivierter Komplementfaktor 5a, ...
CCT	craniale Computertomographie
CD	Cluster of Differentiation
DBP	diastolic blood pressure
DIC	disseminated intravascular coagulation
DIVI	Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin
DSG	Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V.
E. coli	Escherichia coli
EEG	Elektro-Enzephalogramm
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FiO <sub>2</sub>	inspiratorischer Sauerstoffanteil der Atemluft
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
HKT	Hämatokrit
HMGB1	high-mobility group box 1
HSP	Hitzeschockprotein
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
HZV	Herz-Zeit-Volumen
i.a.	intraarteriell
i.c.	intracardial
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IκBα	Inhibitor κBα
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharid
MABP	mean arterial blood pressure
MAC	Membrane-Attack-Complex
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MASP	Mannose-bindendes-Lektin assoziierte Serinprotease
MBL	Mannose-bindendes-Lektin
MFG-E8	milk-fat-globule-epidermal-growth-factor-8
MHC	major histocompatibility complex
MIF	Makrophagenmigrations-inhibierender-Faktor
min	Minuten
MODS	Multiorgan-Dysfunktionssyndrom
MOV	Multiorganversagen
MPO	Myeloperoxidase
MRT	Magnetresonanztomographie

---

NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NMH	niedermolekulares Heparin
NO	Stickstoffmonoxid
p	p-Wert
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
$p_aO_2$	arterieller Sauerstoffpartialdruck
$p_aCO_2$	arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PAMP	pathogen-associated Molecular pattern
PEEP	positive endexpiratory pressure
PRI	Pressure Rate Index
PTT	partielle Thromboplastinzeit
rcf	relative centrifugal force
rhAPC	rekombinantes aktiviertes Protein-C
s	Sekunde
SBP	systolic blood pressure
SDS	sodium dodecyl sulfate
SIRS	systemic Inflammatory response syndrome
S/min	Schläge pro Minute
spp.	Species
S. aureus	Staphylococcus aureus
TBS-T	Tris buffered saline-Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
t-PA	tissue-type plasminogen activator
TF	tissue factor
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
TLR	Toll-like Rezeptor
u.a.	unter anderem
UFH	unfraktioniertes Heparin
U/g	Units pro Gramm
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
z.B.	zum Beispiel
ZVD	zentraler Venendruck

# 1. Einleitung

## 1.1 Sepsis

### 1.1.1 Definitionen

Der Begriff „Sepsis“ [σηψις] nimmt seinen Ursprung im griechischen Sprachgebrauch und bedeutet soviel wie Verwesung bzw. Abbau von biologischen Material im Beisein von Bakterien. So begegnet man bereits in dem vor ungefähr 2500 Jahren verfassten Corpus Hippocraticum dem Wort „sepidon“ [σηπεδων], das in Bedeutung und Wortlaut unserem heutigen Begriff „Sepsis“ sehr ähnelt und sich über die Jahrhunderte kaum verändert hat. Allein die pathophysiologische Erklärung der Sepsis, entsprechend der ursprünglichen Wortbedeutung, war bis zum Ende des 19. Jahrhunderts nicht zufriedenstellend und konnte erst mit der Begründung der modernen Mikrobiologie neue Ansätze liefern. Schließlich kam die Definition von Herrn Ziegler 1885 dem heutigen Verständnis sehr nahe. Er ging dabei von einer Vergiftung des Organismus durch Toxine und anderen Produkten bakteriellen Ursprungs aus. Nach dem derzeitigen Wissensstand definiert sich die Sepsis als „die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Reaktion auf die Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen“ (Schuster und Müller-Werdan, 2005). (Kreymann und Wolf, 1996; Geroulanos and Douka, 2007)

Nach einer weitgehend bekannten Pathophysiologie musste der Sepsis eine einheitliche diagnostische Basis gegeben werden. Auf der Konsensuskonferenz der Thoracic Society und der Society of Critical Care Medicine von 1991 wurden schließlich die aktuell gültigen Begriffe SIRS und Sepsis klinisch definiert. Bei dem SIRS handelt es sich um eine allgemeine, entzündliche Abwehrreaktion, die sich durch mindestens zwei der folgenden Symptome äußert:

- Körpertemperatur > 38,0 °C oder < 36,0 °C
- Herzfrequenz > 90 /min
- Atemfrequenz > 20 /min oder  $p_a\text{CO}_2 < 32$  mmHg
- Leukozyten > 12000 /mm<sup>3</sup> oder < 4000 /mm<sup>3</sup> oder > 10 % unreife Formen

Bei der Sepsis (s. Abb. 1) muss neben den Kriterien eines SIRS eine mikrobiologisch oder klinisch gesicherte Infektion vorliegen. Die schwere Sepsis kennzeichnet, zusätzlich zu den Merkmalen einer Sepsis, das Vorliegen einer infektiösen

Organdysfunktion. Bei dem septischen Schock kommt es außerdem für mindestens eine Stunde zu einer ausgeprägten Hypotonie trotz ausreichender Volumensubstitution oder der Gabe von Vasopressoren, wie z.B. Adrenalin. (Schuster und Müller-Werdan, 2005; Reinhart et al., 2010)

Sepsis	schwere Sepsis	septischer Schock
<ul style="list-style-type: none"> <li>•SIRS +</li> <li>•mikrobiologisch (Blutkultur, Sputum, Urin) oder klinisch (z.B. perforierter Darm) gesicherte Infektion</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Sepsis +</li> <li>•ein Zeichen von Organdysfunktion, Minderperfusion oder Hypotonie (z.B. ARDS, Laktatazidose, Oligurie/Anurie, Enzephalopathie, Thrombozytopenie)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•schwere Sepsis und eines der folgenden Kriterien, trotz ausreichender Volumensubstitution:</li> <li>•SBP <math>\leq</math> 90 mmHg oder</li> <li>•MABP <math>\leq</math> 65 mmHg oder</li> <li>•Einsatz von Vasopressoren</li> </ul>

**Abb. 1:** Übersicht über die klinischen Diagnosekriterien der einzelnen Sepsis-Stadien

**1.1.2 Aktuelle Bedeutung**

Trotz eines hohen medizinischen Standards in der westlichen Welt und zahlreicher therapeutischer Fortschritte in den letzten Jahrzehnten spielt die Sepsis in Bezug auf Erkrankungshäufigkeit, Mortalitätsrisiko und Behandlungskosten immer noch eine sehr wichtige Rolle. Dies konnte eindrucksvoll in einer Studie von Martin et al. gezeigt werden. In ihr wurden retrospektiv über 750.000.000 Hospitalisierungen über den Zeitraum von 1979 bis 2000 auf die Diagnose Sepsis untersucht. Dabei stellte sich im Beobachtungszeitraum ein jährlicher Inzidenzanstieg von 8,6 % auf eine Fallzahl von knapp 660.000 (2,4/1000 Einwohner pro Jahr) im Jahr 2000 dar. Im selben Jahr konnte eine Inzidenz für die Diagnose schwere Sepsis von etwas mehr als 250.000 Fällen (0,93/1000 Einwohner pro Jahr) ermittelt werden. Damit ist die Sepsis die zweithäufigste Todesursache bei Intensivpatienten auf nicht-kardialen Intensivstationen in den USA. Außerdem gehört sie zu den zehn häufigsten Todesursachen in diesem Land überhaupt. Es kann davon ausgegangen werden, dass nicht nur jedes Jahr ungefähr 18 Millionen Menschen weltweit betroffen sind, sondern auch bis zu 14.000 davon täglich sterben. Die durchschnittlichen Behandlungskosten bei Sepsis-Patienten betragen dabei in den USA ungefähr 50.000 US-\$ pro Fall, was die Gesamtkosten für die Behandlung auf schätzungsweise 6,7 Mrd. US-\$ pro Jahr summiert. Daraus lässt sich die große finanzielle Belastung für den amerikanischen Gesundheitssektor erkennen. In verschiedenen europäischen Ländern konnten bei ähnlichen Studien

niedrigere Inzidenzraten ermittelt werden (s. Tab. 1). Trotzdem wird damit auch die Bedeutung der Sepsis für die Gesundheitssysteme in Europa deutlich. Schätzungen gehen beispielsweise in Deutschland davon aus, dass jährlich ca. 70.000 Menschen an einer schweren Sepsis/septischen Schock erkranken. Hierbei entstehen durchschnittlich direkte Kosten von 23.000 € und indirekte Kosten von 60.000 € pro Patient. Dabei ist nicht nur das Risiko, an einer schweren Sepsis zu erkranken, sondern auch daran zu versterben, deutlich erhöht. So konnte in der SOAP-Studie, in der 3147 Intensivpatienten aus verschiedenen europäischen Ländern auf die Diagnose Sepsis untersucht wurden, oder in der Arbeit von Angus et al., das Letalitätsrisiko einer schweren Sepsis von ca. 30 % ermittelt werden. Noch höher war das Mortalitätsrisiko des septischen Schocks, welches bei über 50 % lag und sich damit deutlich von dem anderer Krankheiten unterscheidet. (Martin et al., 2000; Angus et al., 2001; Annane et al., 2003; Vincent et al., 2006; Moerer und Burchardi, 2006; Kauss et al., 2010; Cauwels and Brouckaert, 2011)

**Tab. 1:** verschiedene Studien zur Inzidenz der schweren Sepsis (Finfer et al., 2004; Engel et al., 2007; Karlsson et al., 2007; Blanco et al., 2008; Vesteinsdottir et al., 2011)

<b>Studie</b>	<b>Studienart</b>	<b>Studienpopulation</b>	<b>Fälle mit schwerer Sepsis</b>	<b>Inzidenz (pro Jahr und 1000 Einwohner)</b>	<b>Beobachtungszeitraum</b>
Spanien	prospektive, multizentrische Kohortenstudie	2619	311	0,25	3 Monate
Finnland	prospektive Studie	4500	472	0,38	4 Monate
Australien/ Neuseeland	prospektive Kohortenstudie	3543	691	0,77	3 Monate
Island	prospektive Beobachtungsstudie	1524	115	0,48	12 Monate
Deutschland	Querschnittsstudie	3877	415	0,76	24 Stunden

## **1.2 Das Immunsystem**

Das Immunsystem mit der angeborenen und erworbenen Abwehr stellt die Antwort des Organismus auf infektiöse Agenzien dar. Gleichzeitig nimmt es eine zentrale Position im pathophysiologischen Geschehen der Sepsis ein, sodass eine kurze Betrachtung folgt.

**Tab. 2:** Übersicht über die Bestandteile des Immunsystems

	<b>angeborenes Immunsystem</b>	<b>erworbenes Immunsystem</b>
<b>mechanische Barrieren</b>	- Haut - Schleimhaut	
<b>Zellen</b>	- Monozyten/Makrophagen - Granulozyten - NK-Zellen	- B-, T-Lymphozyten - B-, T-Gedächtniszellen - antigenpräsentierende Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen) - zytotoxische T-Zellen
<b>Faktoren</b>	- Eicosanoide - Zytokine - Sauerstoffspezies - Komplement - Akut-Phase-Proteine - Stickstoffmonoxid	- Immunglobuline - Zytokine

### 1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem weist eine geringe Erregerspezifität auf. Es kann jedoch eine schnelle Immunantwort generieren. Ein wichtiger Bestandteil dieser Reaktion sind verschiedene Faktoren (s. Tab. 2), die einerseits körperfremde Strukturen direkt zersetzen, andererseits als Botenstoff wirken und so Entzündungs- oder Gerinnungsvorgänge steuern. Sie sind der Lage Entzündungszellen anzulocken oder aber durch verschiedene Protease-Inhibitoren Gewebeschädigungen zu verhindern. (Ansorge, 2007)

Zu den zellulären Bestandteilen des nativen Immunsystems zählen die Makrophagen. Sie können nicht nur proinflammatorische Zytokine (u.a. IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) produzieren, sondern auch mittels spezieller Rezeptoren (u.a. Toll-like Rezeptoren) potenziell pathogene Strukturen phagozytieren. Sie stellen mit ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation einen wichtigen Brückenschlag zum adaptiven Immunsystem dar. (Ansorge, 2007; Kawai und Akira, 2010)

Die neutrophilen Granulozyten, als wichtigster Vertreter ihrer Zellklasse, können Bakterien binden oder phagozytieren und mittels einer Vielzahl von proteolytischen Proteinen und Sauerstoffspezies zersetzen. Sie werden ähnlich den Makrophagen durch Chemokine, Komplementfaktoren (C5a), Interleukine (IL-1 $\beta$ , IL-8), TNF- $\alpha$ , oder Endotoxine zum Ort der Entzündung gelockt. (Fox et al., 2010; Stone et al., 2010; Summers et al., 2010)

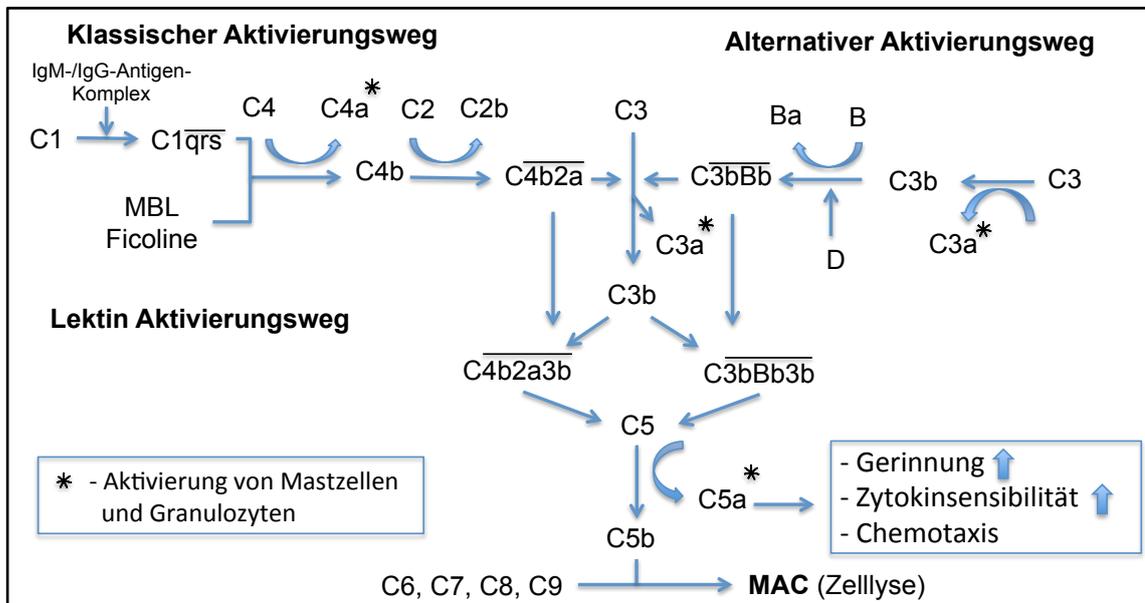
Ein weiterer Vertreter sind die natürlichen Killer-Zellen, die eine große Ähnlichkeit zu zytotoxischen T-Zellen besitzen. Sie sind in der Lage mittels verschiedener Perforine und Granzyme auffällige, körpereigene Zellen zu lysieren und mittels Mediatoren wie

Interferon- $\gamma$  das adaptive Immunsystem oder antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen anzulocken. (Heusel und Ballas, 2003; Jobim and Jobim, 2008; Benjamin et al., 2010)

**Komplementsystem**

Bei dem Komplementsystem handelt es sich um mehrere, in ihren Vorstufen im Blut zirkulierende, Proteine. Diese sind in der Lage bei Aktivierung eine Vielzahl von körpereigenen Abwehrmechanismen in Gang zu setzen oder zu beeinflussen. Man unterscheidet dabei grundsätzlich 3 Wege (s. Abb. 2):

- der klassische Aktivierungsweg
- der alternative Aktivierungsweg
- der Lektin-Aktivierungsweg



**Abb. 2:** Komplementkaskade mit klassischem, alternativem und Lektin Aktivierungsweg; Striche über den Molekülen zeigen Enzymaktivität an; MAC - membrane-attack-complex, MBL - Mannose-bindendes-Lektin; modifiziert nach Bhole and Stahl, 2003

Der klassische Aktivierungsweg kann nur durch Immunglobuline der Klasse G und M aktiviert werden. Somit ist dieser Weg vom erworbenen Immunsystem abhängig. Treffen in der Blutbahn zwei IgG-Antigen-Komplexe oder ein IgM-Antigen-Komplex auf das zirkulierende Protein C1q, vermag dieses, durch die Bindung an den Fc-Teil der Antikörper, die Aktivierung von C1r. C1r spaltet wiederum die Serin-Protease C1s. Letzteres ist nun in der Lage, entsprechend der Abb. 2, eine komplexe Abfolge verschiedener Proteine zu aktivieren, die zur Bildung der C5-Konvertase führt. Sie ist in allen drei Aktivierungswegen identisch und bewirkt, dass das erzeugte C5b mit

weiteren Faktoren (C6, C7, C8, C9) auf der Zielzelle den MAC bildet. Dieser kann, aufgrund seiner zylindrischen Struktur, einen Ionen- und Wasserfluss erzeugen, der letztendlich zur Lyse der Zielzelle führt. Verschiedene Spaltprodukte wie C5a können zusätzlich eine Chemotaxis von Leukozyten und Makrophagen auslösen oder ähnlich der bereits abgespaltenen Faktoren C3a oder C4a ihre Wirkung als Anaphylotoxin mit der Aktivierung von Mastzellen und Granulozyten entfalten. Außerdem hat C5a Einfluss auf die Gerinnung und die Zytokinsensibilität. (Ehrnthaller et al., 2011)

Der alternative Aktivierungsweg funktioniert unabhängig vom erworbenen Immunsystem. Dabei ist das hochreaktive C3 mittels spontaner Hydrolyse in der Lage, körperfremde Oberflächen wie die von Bakterien, Viren oder Hefen, aber auch körpereigene Strukturen wie CRP, Protein-A oder virusinfizierte Körperzellen zu erkennen. Hat eine solche Erkennung stattgefunden, entstehen C3a und C3b. Letzteres bindet auf der potentiell pathogenen Oberfläche. Jetzt ist Faktor B in der Lage sich anzulagern und mittels Faktor D den Bestandteil Ba abzuspalten. So entsteht die C3-Konvertase, welche noch mehr C3 spalten kann. Bindet ein weiteres C3b an diese Konvertase, entsteht die C5-Konvertase. Diese ist nun zu den bereits oben beschriebenen weiteren Reaktion in der Lage. (Bhole and Stahl, 2003; Ehrnthaller et al., 2011)

Der Lektin-Aktivierungsweg entspricht in seinem Ablauf stark dem klassischen Weg. Allerdings funktioniert auch dieser antikörperunabhängig. MBL ähnelt in seiner Struktur sehr dem Protein C1. Es enthält ebenfalls 2 Serin-Proteasen (MASP1, MASP2), deren Aktivierung zur Spaltung von C4 führt. Die folgenden Schritte entsprechen wiederum dem klassischen Aktivierungsweg. Unterschiede gibt es in der Aktivierung durch Mannose-haltige Strukturen und in der Reaktivität von MASP1, welches zusätzlich in geringerem Ausmaß C2 und C3 spalten kann. Aktuelle Forschungen haben weitere Proteine entdeckt, die einen MBL-homologen Aufbau aufweisen. Diese sogenannten Ficoline werden durch zuckerhaltige Strukturen auf körpereigenen und körperfremden Zellen aktiviert und lösen die gleiche Reaktionskaskade wie der Lektin-Aktivierungsweg aus. (Ehrnthaller et al., 2011)

Um eine überschießende Reaktion des Komplementsystems und damit eine mögliche Schädigung körpereigener, gesunder Zellen zu verhindern, existieren verschiedene Mechanismen, welche die Aktivität der Komplementfaktoren herabsetzen. So gibt es lösliche Faktoren, wie z. B. den C1-Esterase-Inhibitor, der die Serin-Proteasen von C1 und MBL inaktiviert, Faktor I und Faktor H, die den alternativen Aktivierungsweg hemmen, oder die Carboxypeptidase N, welche die in der Komplementreaktion

gebildeten Anaphylotoxine neutralisieren kann. Auch verschiedene Oberflächenproteine wie CD35 und CD46 auf Erythrozyten oder das ubiquitäre CD59 sind in der Lage in die verschiedenen Aktivierungswege des Komplementsystems einzugreifen und sie zu inhibieren. (Ehrnthaller et al., 2011)

### 1.2.2 Das erworbene Immunsystem

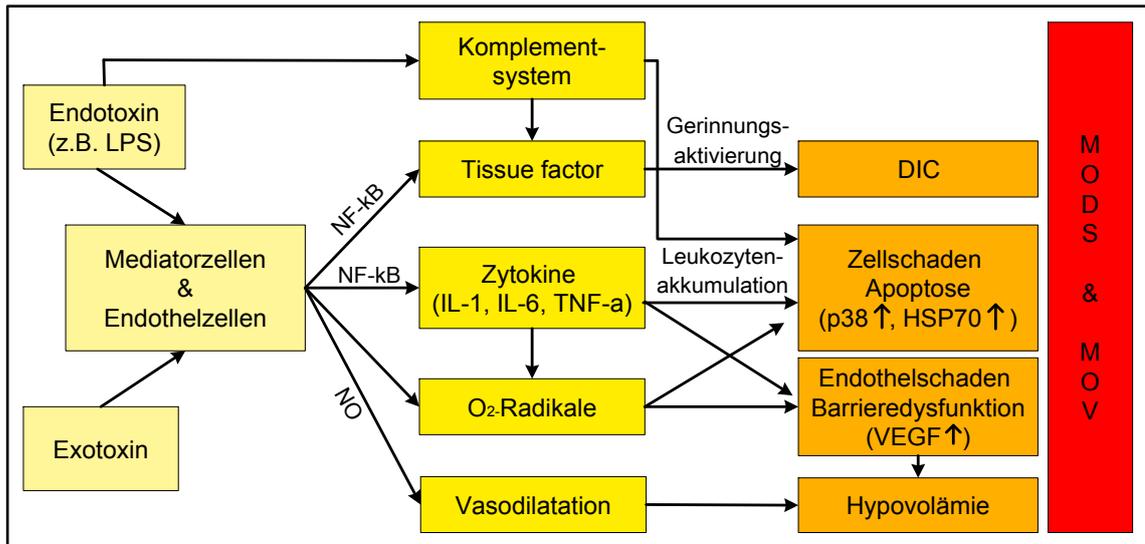
Die Zellen des erworbenen Immunsystems (s. Tab. 2) können durch die hohe Variabilität ihrer Rezeptoren spezifische Erregerstrukturen erkennen und bekämpfen. Dabei müssen Antigen-präsentierende Zellen Erregerstrukturen phagozytieren, prozessieren und über MHC-Proteine den T-Zellen präsentieren. Voraussetzung für die gegenseitige Stimulation von B- und T-Zellen ist die Präsentation des gleichen Antigens über die MHC-II-Moleküle der B-Zellen gegenüber den aktivierten T-Zellen. Hat die Erkennung durch die T-Zelle stattgefunden, sezerniert sie verschiedene Zytokine, welche die Zellproliferation der B-Zellen fördert. Über mehrere Reifungsstufen entsteht so die Plasmazelle, die befähigt ist, unterschiedliche Antikörper zu produzieren. Diese können wiederum an bestimmte Erregerstrukturen binden und so eine Phagozytose durch beispielsweise Makrophagen induzieren, das Komplementsystem aktivieren, oder die Anheftung an körpereigene Zellen verhindern. Eine weitere Zellart des adaptiven Immunsystems ist die zytotoxische T-Zelle, die den Befall von Zellen mit fremden Organismen, beispielsweise Viren, erkennen kann. Durch die Sekretion von Perforinen, Granzymen oder die Interaktion über den FAS-Liganden induziert sie die Apoptose in der Zielzelle. (Hof et al., 2009)

## 1.3 Pathophysiologie

Pathophysiologisch lassen sich 5 Säulen im septischen Prozess erkennen :

- der septische Fokus
- die Invasion pathogener Keime
- die Mediatorexplosion
- die Zellschädigung
- die Multiorgandysfunktion (MODS) und das Multiorganversagen (MOV)

Dabei wird der Tatsache Rechnung getragen, dass nicht nur die Eigenschaften des Erregers oder der Noxe den Krankheitsverlauf beeinflussen, sondern auch die Abwehrreaktion des Wirts, die, außer Kontrolle geraten, körpereigene Strukturen schädigen kann. (Schuster und Müller-Werdan, 2005)



**Abb. 3:** Übersicht über ausgewählte pathophysiologische Mechanismen des septischen Schocks

**a) Septischer Fokus und Keiminvasion**

Als Erreger einer Sepsis können sowohl Bakterien, Pilze als auch Viren in Frage kommen. Die häufigsten Vertreter dabei sind mit Abstand Bakterien mit einem Anteil gramnegativer und grampositiver Keime von jeweils rund 46 %. Die Erreger können beispielsweise über Wunden oder Katheter in den Organismus eindringen. Bei Intensivpatienten mit schwerer Sepsis und/oder septischem Schock wurde der Respirationstrakt mit über 60 % als einer der häufigsten Eintrittsorte für Infektionen ausgemacht. Es folgt der Bauchraum mit ca. 25 %, während Knochen-/Weichteilgewebe, Gastrointestinaltrakt und Urogenitaltrakt mit jeweils unter 10% eine geringere Bedeutung spielen. (Engel et al., 2007; Bodmann et al., 2010)

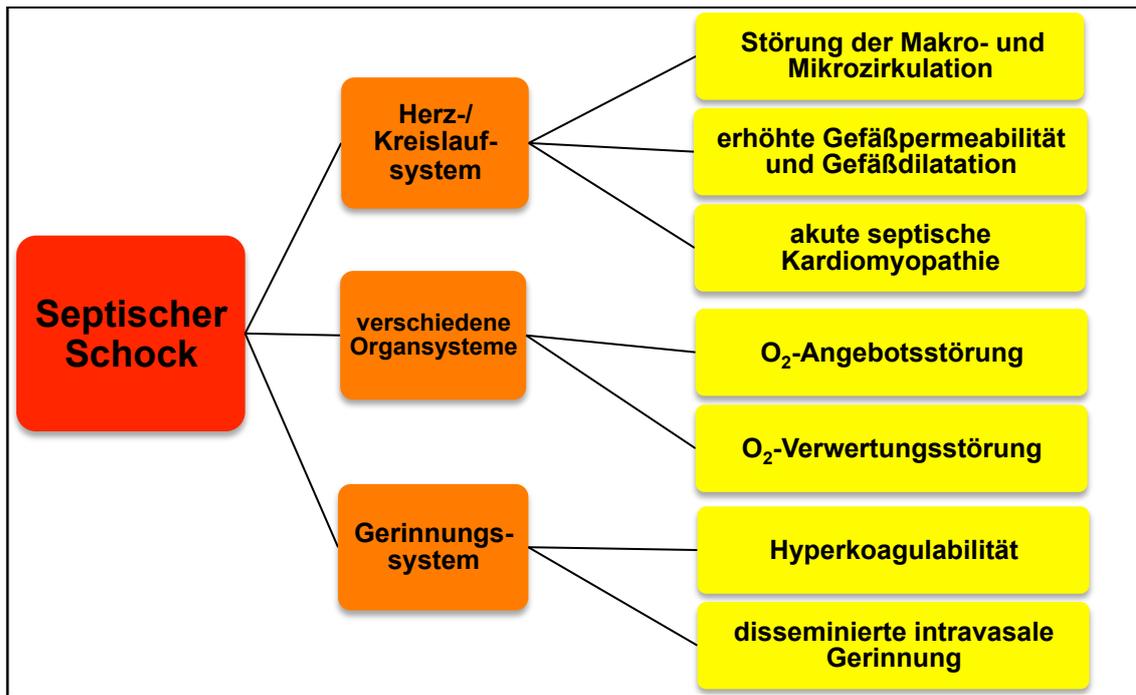
**b) Mediatorexlosion und Zellschädigung**

Ist der pathogene Keim in den Organismus eingedrungen, werden verschiedene Abwehrmechanismen aktiviert. Geschädigte Gewebszellen oder Epithelzellen, die über TLRs pathogen assoziierte Strukturen erkennen können, schütten Mediatoren aus, die neutrophile Granulozyten und Makrophagen anlocken. Diese sind in der Lage die Erreger zu phagozytieren oder mittels verschiedener Enzyme bzw. reaktiver Sauerstoffspezies zu bekämpfen. Die Aktivierung dieser Zellen bewirkt weiterhin eine Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Botenstoffe, welche die Immunantwort verstärken und weitere Abwehrcellen anlocken. Makrophagen sind außerdem befähigt, das erworbene Immunsystem zu aktivieren. Kommt es im Zuge einer schweren Infektion zur Bildung eines septischen Fokus mit kontinuierlicher Erregerproduktion, wird das angeborene Immunsystem überaktiviert. Somit werden

nicht nur Mediatoren, sondern auch toxische Stoffe, die primär der Keimbekämpfung dienen, in großen Mengen freigesetzt und schädigen körpereigenes Gewebe. Eine Steigerung der Apoptoserate mit erhöhter Aktivität von p38, welches vermehrt bei Zellstress freigesetzt wird, oder HSP-70, das eine verstärkte Proteinfehlfaltung kompensiert, sind die Folge. Neben der Überaktivierung in der frühen Phase der Sepsis ist außerdem ein Verlust von Kontrollmechanismen der Immunantwort zu beobachten. Es kommt bei Erreger- oder Zytokinkontakt durch Leukozyten zu einer vermehrten Bildung von MIF. Dieser Faktor verhindert die Apoptose von aktivierten Makrophagen, steigert die TLR4-Expression auf Makrophagen sowie deren Zytokin-sensibilität und antagonisiert die Wirkung von Glukokortikoiden. Weiterhin spielt das Komplementsystem, welches durch pathogene Erreger bzw. dessen Bestandteile aktiviert wird und an dessen Ende neben einer Zellyse noch verschiedene lösliche Komponenten stehen, eine wichtige Rolle bei der Überaktivierung des Immunsystems. Die bedeutendste dieser Komponenten ist das aktivierte C5 (C5a), das im Zuge eines septischen Geschehens in großen Mengen gebildet wird. Neben seiner Funktion als proinflammatorischer Mediator bewirkt es eine verstärkte Bildung von MIF und HMGB1, welches die Wirkung von Zytokinen erhöht. Außerdem führt C5a zu einer Apoptose von T-Zellen und einer Dysfunktion neutrophiler Granulozyten. Zusätzlich löst dieser Komplementfaktor, neben einer generell erhöhten Apoptoserate von Lymphozyten und dendritischen Zellen in der Spätphase der Sepsis, eine Immunsuppression aus. Weitere Effekte sind die Induktion einer DIC durch die vermehrte Ausschüttung von TF aus Endothelzellen, oder die Beteiligung an der septischen Kardiomyopathie mit Folge der Herzinsuffizienz. (Huber-Lang et al., 2001, 2002; Werdan et al., 2005; Hauber und Zabel, 2009; Ward, 2010)

### **c) MODS und MOV**

Im septischen Krankheitsgeschehen kann es durch die Überreaktion des Immunsystems bzw. durch die direkte Reaktion auf die Erreger und ihre Toxine zu einer Dysfunktion verschiedener Organsysteme kommen. Dazu gehören unter anderem das Herz-/Kreislaufsystem mit Störungen der Makro- und Mikrozirkulation, eine Funktionsstörung von Organen wie Lunge, Niere, Leber, Gehirn oder eine Dysregulation des Gerinnungssystems. Man spricht dabei von einem Multiorgandysfunktionssyndrom, wenn es zur insuffizienten Leistung von zwei oder mehr Organen kommt. Der Übergang zum Multiorganversagen, bei dem es sich um das in zeitlicher Abfolge rasche Versagen von zwei oder mehr Organsystemen handelt, ist dabei fließend. (Burchardi et al., 2004)



**Abb. 4:** Übersicht über die Ursachen der Dysfunktion von Herz-/Kreislaufsystem, verschiedener Organsysteme und Gerinnungssystem im septischen Schock

Im Herz-/Kreislaufsystem bewirken Toxine, aber auch körpereigene Mediatoren, eine Vasodilatation bis hin zur Vasoplegie. Zusätzlich führen Endothelschäden zu einem unkontrollierten Verlust von Flüssigkeit ins Interstitium mit Ödembildung. Diese Beeinflussungen der Makrozirkulation haben den typischen Blutdruckabfall im septischen Schock zur Folge. Das Herz reagiert zur Kompensation mit einer gesteigerten Herzfrequenz. Auch in der Mikrozirkulation zeigen sich Beeinträchtigungen. So nimmt nicht nur die Dichte kleiner Gefäße ab, auch deren Perfusion ist herabgesetzt. Das Herz wird im septischen Prozess nicht nur durch die Generierung erhöhter Herzzeitvolumina belastet. Im Rahmen der septischen Kardiomyopathie kommt es neben Störungen der Pumpfunktion auch zu Beeinträchtigungen in der Regulation der Herzfrequenz und deren Variabilität. Ursachen hierfür sind u.a. der direkte Einfluss von Endotoxinen auf Schrittmacherzellen im Sinusknoten oder die negative inotrope Wirkung von im Blut zirkulierenden Proteinen, zu dem z.B. der kardiodepressive Peptidfaktor zählt. Eine ähnliche Wirkung zeigt auch die durch verschiedene Bakterientoxine induzierte Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-1. Diese Faktoren hemmen über eine vermehrte Bildung von NO den Calcium-Einwärtsstrom in die Zelle. Zusätzlich bewirken chronisch erhöhte Katecholaminspiegel im Blutplasma über eine Downregulation von  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren eine Verschlechterung der Herzfunktion. (Reithmann et al., 1993; Kumar et al., 1996; Müller-Werdan et al. 1998; Ebelt und Werdan, 2012)

Bei der Dysfunktion der verschiedenen Organsysteme (s. Tab. 3) sind zwei Faktoren besonders bedeutend. Dazu gehört die O<sub>2</sub>-Angebotsstörung, die sich in der Makro- und Mikrozirkulationsstörung begründet. Zusätzlich spielt die, durch Bakterientoxine und zytotoxische Mediatoren ausgelöste, O<sub>2</sub>-Verwertungs- bzw. Zellfunktionsstörung eine entscheidende Rolle. Dabei kommt es zu Beeinträchtigungen in der mitochondrialen Atmungskette, welche trotz ausreichender Perfusion einen anaeroben Zellstoffwechsel mit Laktatanstieg zur Folge hat. Als Antwort auf diese Minderversorgung reagieren die Gewebe u.a. mit der vermehrten Freisetzung des Angiogenese-fördernden Proteins VEGF. Zusätzlich kann die Kommunikation und Feinabstimmung zwischen den Organen, zu der z.B. die kardio-respiratorische Regulation gehört, beeinträchtigt sein. (Müller-Werdan und Schuster, 2005; Karlsson et al., 2008)

**Tab. 3:** Ursachen und Merkmale für Dysfunktion oder Versagen verschiedener Organe (Marzi, 1994; Wilson and Young, 2003; Bellomo et al., 2004; Haller et al., 2006; Tsushima et al., 2009; Herold et al., 2010a; Matthay and Zemans, 2011; Hecker et al., 2012)

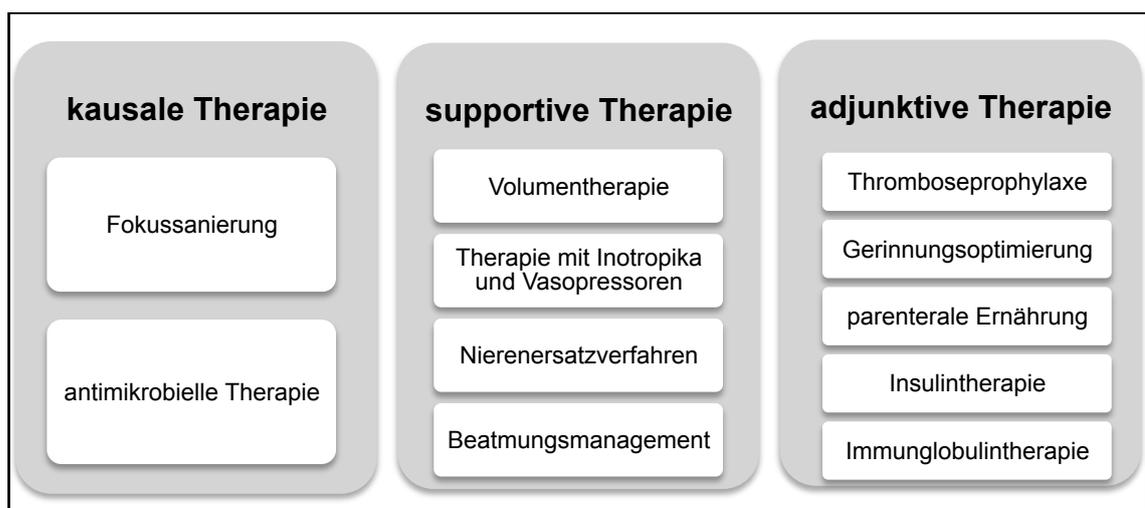
Organ	Ursache	Merkmale
<b>Lunge</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Entstehung einer entzündlichen Reaktion durch: Sepsis, Pneumonie, Aspiration etc.</li> <li>- Granulozyten-/Thrombozytenabhängige Schädigung von Endothel/Alveolarepithel</li> <li>- durch Barrierestörung Bildung eines Lungenödems</li> <li>- nicht ausschließlich durch Herzversagen, Volumenüberschuss erklärbar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Beginn ≤ 1 Woche</li> <li>- beidseitige Infiltrate im Thoraxröntgenbild (nicht anderweitig erklärt)</li> <li>- schweres ARDS bei p<sub>a</sub>O<sub>2</sub>/F<sub>i</sub>O<sub>2</sub> ≤ 100 mmHg mit PEEP ≥ 5 cm H<sub>2</sub>O (weitere Kategorien: mild, moderat)</li> </ul>
<b>Niere</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- prärenal (u.a. Herzinsuffizienz, Hypovolämie, Vasodilatation)</li> <li>- renal (Störung der Mikrozirkulation, Tubulusnekrosen, Ischämie, Sepsis)</li> <li>- postrenal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Oligurie bzw. Anurie</li> <li>- dreifach erhöhtes Serumkreatinin oder ≥ 4 mg/dl</li> <li>- GFR um 75 % gesunken</li> </ul>
<b>Leber</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lage im Abstromgebiet des schockanfälligen Intestinaltraktes</li> <li>- bei Reperfusionsschaden, Verlust der Barrierefunktion des Intestinums</li> <li>- Überschwemmung der Hepatozyten mit Toxinen, Entzündungsmediatoren</li> <li>- Zellschädigung durch Minderperfusion und Störung der Mikrozirkulation während Sepsis oder septischen Schocks</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Bilirubin, Transaminasen, Ammoniak erhöht</li> <li>- Quickwert &lt; 20 %</li> <li>- Alkalose</li> <li>- hepatische Enzephalopathie</li> <li>- Ikterus</li> </ul>
<b>Gehirn</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- reduzierter Blutfluss und Mikrozirkulationsstörung</li> <li>- Versagen anderer Organe (z.B. Leber)</li> <li>- Zellschädigung durch Entzündungsmediatoren und Toxine</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Veränderungen im EEG</li> <li>- CCT und MRT oft unauffällig</li> <li>- erhöhte Laborwerte für: Serum-Kreatinin, Harnstoff, Bilirubin etc.</li> </ul>

Einen weiteren wichtigen Aspekt in der Pathophysiologie der Sepsis stellt die Koagulopathie dar. Sie kann von einer Hyperkoagulabilität bis hin zur disseminierten intravasalen Gerinnung mit verstärkter Blutungsneigung reichen. Dabei spielen die Mechanismen der Gerinnungsaktivierung, Beeinträchtigung der Gerinnungshemmung und Hemmung der Fibrinolyse eine wichtige Rolle.

In der Gerinnungsaktivierung ist die Bildung von Tissue-Factor (TF) durch Granulozyten, Makrophagen und Endothelzellen entscheidend. Die Produzenten werden dabei von einer Vielzahl von Mediatoren wie Zytokinen, HMGB1, bakterielle Strukturen oder Akut-Phase Proteine aktiviert. TF kann nun über die Aktivierung des extrinsischen Gerinnungsweges die Bildung von Fibrinmonomeren bewirken, welche sich zu Thromben verbinden. Zusätzlich wird die Thrombusbildung noch über die Downregulation der physiologischen Gerinnungshemmung verstärkt. Im Rahmen der systemischen Entzündungsreaktion ist außerdem eine verminderte Expression von Thrombomodulin oder eine herabgesetzte Aktivierung von Protein C zu beobachten. Weiterhin hat die vermehrte Bildung von PAI-1 eine gerinnungsfördernde Wirkung, da es eine Fibrinolyse durch t-PA verhindert (Esmon, 2003; Semeraro et al., 2010; Wynn et al., 2010).

### **1.4 Aktuelle Therapierichtlinien**

Die Behandlung der Sepsis besteht aus den drei Säulen kausale, supportive und adjunktive Therapie (s. Abb. 5) und basiert dabei auf der aktuellen S-2k Leitlinie der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. von 2010. (Reinhart et al., 2010)



**Abb. 5:** Übersicht über die Therapiesäulen der Sepsis

### a) Kausale Therapie

Die Fokussanierung stellt eine Grundvoraussetzung zur erfolgreichen Therapie der Sepsis dar. Diese kann von der Entfernung von Implantaten, wie Katheter oder Osteosynthesematerial, bis hin zur Amputation der entsprechenden Körperregionen reichen. Entscheidend bei der antimikrobiellen Therapie ist der möglichst zeitnahe Beginn. Kumar et al. konnten zeigen, dass sich im Falle einer Verzögerung der Antibiotikatherapie bei Patienten im septischen Schock, ausgegangen vom Beginn der Hypotension, die Mortalität pro Stunde um 7,6 % erhöht. Zusätzlich lässt sich in Deutschland in den letzten Jahren eine zunehmende Resistenzentwicklung verschiedener Bakterienstämme beobachten. Zum Beispiel hat sich der Anteil Methicillin-resistenter Stämme von *S. aureus* auf 22,8 % erhöht. Bei *E. coli* sind die Resistenzen sogar auf 31,2 % und bei *Klebsiella pneumoniae* auf 17 % gegenüber Fluorchinolonen angestiegen. Infolgedessen muss die antimikrobielle Therapie von Beginn an adäquat, kalkuliert und wenn nötig auch kombiniert erfolgen. Durch die zunehmenden Antibiotikaresistenzen sollte die Therapie alle zwei bis drei Tage evaluiert werden, um sie bei Bedarf an das aktuelle Antibiogramm anzupassen, oder aber, wenn möglich, auch zu deeskalieren. (Kumar et al. 2006; Bodmann et al. 2010; Reinhart et al., 2010)

### b) Supportive Therapie

Ziel der supportiven Therapie ist die hämodynamische Stabilisierung, um ein ausreichendes zelluläres Sauerstoffangebot sicherzustellen. Dabei werden folgende Parameter empfohlen:

- ZVD  $\geq 8$  mmHg bzw.  $\geq 12$  mmHg bei mechanischer Beatmung
- MABP  $\geq 65$  mmHg
- Diurese  $\geq 0,5$  ml/kg/Stunde
- zentralvenöse Sauerstoffsättigung  $\geq 70$  %
- Laktat  $\leq 1,5$  mmol/l bzw. Abfall des Laktats

Um diese Zielkriterien zu erreichen, sollte zuerst die Volumentherapie erfolgen. Dabei werden kristalloide Lösungen oder Humanalbumin empfohlen. Zusätzlich, wie in Abb. 5 ersichtlich, können entsprechend der Indikation Inotropika und Vasopressoren wie beispielsweise Noradrenalin, Adrenalin oder Dobutamin zur Behandlung eingesetzt werden. Bei einem akuten Nierenversagen mit überproportionalen Kreatininanstieg und Oligo- bzw. Anurie sollte im Rahmen eines septischen Geschehens bei zusätzlicher hämodynamischer Instabilität ein kontinuierliches Nierenersatzverfahren durchgeführt

werden. Bei kreislaufstabilen Patienten sind intermittierende Verfahren gleichwertig. Ziel dieser Maßnahmen ist die Flüssigkeitsbilanzierung und Vermeidung von urämischen oder metabolischen Komplikationen. Beim Beatungsmanagement wird eine oximetrische Sauerstoffsättigung von  $> 90\%$  angestrebt. Dabei wird eine frühzeitige Beatmung im Falle einer schweren Sepsis oder septischen Schock empfohlen. (Reinhart et al., 2010)

### **c) Adjunktive Therapie**

Zusätzlich zu den beiden ersten Säulen der Sepsis-Therapie werden adjunktive Maßnahmen empfohlen. Hierzu zählt die Insulintherapie bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischen Schock, die einen Blutzuckerspiegel von  $> 8,3$  mmol/l aufweisen. Eine intensivierete Insulintherapie sollte jedoch aufgrund eines erhöhten Hypoglykämierisikos vermieden werden. Die Gabe von rekombiniertem, aktiviertem Protein C, welches antientzündliche und antikoagulatorische Wirkung besitzt, wird nur bei Patienten mit hohem Sterberisiko empfohlen. Die Therapie mit IgM-angereicherten Immunglobulinen sollte hingegen nur erwogen werden. Weitere Maßnahmen umfassen die Thromboseprophylaxe mit Heparinen, parentrale Ernährung, Stressulkusprophylaxe, Substitution von Blutprodukten und eine adäquate Analgesie und Sedierung. (Reinhart et al., 2010)

## **1.5 Experimentelle Sepsis-Therapie**

Es gibt verschiedene experimentelle Ansätze in der Sepsis-Therapie. Dabei untersucht diese Arbeit den Einfluss von C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) bzw. Heparin auf den septischen Schock. Ersteres nimmt dabei nicht nur Einfluss auf das Komplementsystem, das einen wesentlichen Pathomechanismus im septischen Prozess darstellt. Es kann u.a. auch das Gerinnungssystem beeinflussen. Dort wiederum liegt der primäre Ansatzpunkt von Heparin. Es konnten jedoch auch Einflüsse des Gerinnungshemmers auf Entzündungsreaktionen, sogar eine potenzierende Wirkung auf die Aktivität von C1-INH nachgewiesen werden. Es folgt eine kurze Übersicht beider Medikamente. (Zarychanski et al., 2008; Rajabi et al., 2011)

### **1.5.1 C1-Esterase-Inhibitor**

#### **a) Allgemeines**

Bei dem Protein C1-Esterase-Inhibitor (C1-INH) handelt es sich um ein stark glykosyliertes, einsträngiges Polypeptid, bestehend aus 478 Aminosäuren. Es besitzt eine Molekülmasse von 105 kDa und weist eine Konzentration von rund 0,24 mg/ml

(entspricht 1 U/ml) im Blutplasma auf. Das Protein gehört zu der Klasse der Serin-Protease-Inhibitoren, den sogenannten Serpinen. Die Synthese erfolgt von Zellen wie Hepatozyten, Fibroblasten, Monozyten oder Endothelzellen. C1-INH ist zusätzlich in den  $\alpha$ -Granula von Thrombozyten zu finden und zählt zu den Akut-Phase-Proteinen, dessen Produktion und Freisetzung durch Interferon- $\gamma$ , IL-1 und IL-6 stimuliert wird. (Caliezi et al., 2000)

**Tab. 4:** Fakten zu C1-INH (Beinrohr et al., 2007; Herold et al., 2010a; Craig et al., 2011; Fachinformation CSL Behring Berinert<sup>®</sup>, 2011)

<b>Physiologische Wirkung</b>	- Inhibition des klass. Aktivierungsweg des Komplementsystems - Eingriff in den Lektin-Aktivierungsweg des Komplementsystems - Inaktivator des Kontaktsystems (FIXa, FXIIa, Kallikrein $\Rightarrow$ Bradykinin, das vasodilatativ wirkt/Gefäßpermeabilität steigert) - Bindung verschiedener Moleküle wie Endotoxine, Selektine, C3b
<b>Unerwünschte Wirkung</b>	- selten (1 auf 1000): allergisch-anaphylaktische Reaktionen, Temperaturanstieg, bei nicht zugelassenen Dosierungen oder Indikationen Thrombosen - sehr selten (1 auf 10.000): Schockzustände
<b>Verwendung</b>	- Therapie des hereditären Angioödems I und II, dabei i.v. Gabe von 20 units/kg KG bei 4 ml/min (500 units auf 10 ml gelöst)

**b) Experimentelle Nutzung von C1-INH**

Trotz seiner Zulassung zur Behandlung des hereditären Angioödems scheinen durch die antientzündlichen Eigenschaften von C1-INH weitere Anwendungsgebiete möglich. In der Arbeit von Liu D et al. konnten die Überlebensraten von Mäusen, bei denen durch Caecumligation und anschließender Punktion ein septischer Schock induziert wurde, signifikant durch die Gabe von C1-INH erhöht werden. Bei Verbrennungen wurde durch Radke et al. am Schweinemodell die Komplementaktivierung und Ödembildung signifikant reduziert. Auch bei Ischämie-Reperfusionsschäden im Zuge eines Herzinfarktes konnte die Serin-Protease in den Untersuchungen von Buerke et al. signifikante Vorteile aufweisen. In weiteren Studien zeigten sich Vorteile bei Transplantationen, Meningitiden oder akuten Pankreatitiden. (Buerke et al., 1998; Singer und Jones, 2011; Liu D et al., 2007; Radke et al., 2000; Fattouch et al., 2007)

**1.5.2 Heparin**

**a) Allgemeines**

Bei Heparin handelt es sich um ein sulfatiertes Glukosaminoglykan, das zur Gruppe der Mucopolysaccharide gehört. Je nach Kettenlänge besitzt Heparin ein Molekulargewicht von 4000 - 40000 Dalton. Physiologisch ist das Mukopolysaccharid

in großen Mengen in Gewebs-Mastzellen enthalten und wird bei deren Aktivierung zusammen mit Histamin ausgeschüttet. Es kommt vor allem in Leber, Lunge und Dünndarmmukosa vor. (Lüllman et al. 2010)

**Tab. 5:** Fakten zu Heparin (Taube, 2002; Burgis, 2008; Herold et al., 2010b; Greinacher und Weber, 2010; Rajabi et al., 2011)

<b>Physiologische Wirkung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Antikoagulation durch Bindung/Aktivierung von Antithrombin III + Beschleunigung der Reaktion von Antithrombin mit FXa und FIIa ⇒ Wirkung von NMH vor allem auf Prothrombinase-Komplex (u.a. FXa), UFH zusätzlich auf FIIa</li> <li>- Hemmung der thrombinabhängigen Autoaktivierung der Gerinnungsfaktoren FV, FVIII</li> <li>- dosisabhängige Wirkung auf die Fibrinolyse</li> <li>- erhöht lipolytische Aktivität (verstärkte Freisetzung von Lipasen)</li> <li>- verstärkt die Wirkung von C1-INH</li> </ul>
<b>Unerwünschte Wirkung</b>	heparininduzierte Thrombozytopenie (HIT) Typ I (5-10 %) und Typ II (selten), Blutungen, Fieber, Schüttelfrost, allergische Reaktionen (häufig), Blutdruckabfall, Transaminasen-/LDH-Anstieg (häufig, reversibel), Hyperkaliämie, Hyperaldosteronismus (selten)
<b>Verwendung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Prophylaxe und Behandlung von Thrombosen und Embolien</li> <li>- Begleittherapie beim Myokardinfarkt</li> <li>- Antikoagulation bei der Hämodialyse</li> <li>⇒ Vorteile UFH: bessere Antagonisierbarkeit mit Protaminsulfat, fehlende Akkumulation bei Niereninsuffizienz, Gerinnungskontrolle durch PTT-Test möglich, Behandlungskosten niedriger</li> <li>⇒ Nachteile UFH zu NMH: kürzere Wirkdauer, höhere Blutungskomplikationsraten, HIT-Risiko erhöht</li> </ul>

**b) Experimentelle Nutzung von Heparin**

Neben seinem Einsatz als Antikoagulanz konnten zusätzlich antientzündliche Eigenschaften von Glykosaminoglykanen nachgewiesen werden. Daher erscheint ein Einsatz des Mukopolysaccharides bei anderen Indikationen wie der Sepsis, bei der es neben einer Entzündungsreaktion zur Gerinnungsaktivierung kommt, sinnvoll. Bei näherer Betrachtung ist die Datenlage zu diesem Thema jedoch nicht eindeutig. Während verschiedene tierexperimentelle Studien einen Überlebensvorteil bei der Gabe von UFH im septischen Schock zeigten, war bei anderen Studien keine erhöhte Überlebenswahrscheinlichkeit zu sehen. In klinischen Untersuchungen stellte sich zwar ein Vorteil bezüglich der Letalität gegenüber der Placebogruppe dar, doch könnte dieser auf eine fehlende Randomisierung zurückzuführen sein. (Lever et al., 2000; Polderman and Girbes, 2004; Zarychanski et al., 2008; Chuang et al., 2010)

## 2. Zielstellung der Arbeit

Die Mortalität für die schwere Sepsis oder den septischen Schock liegt je nach Studienlage bei ungefähr 50 % oder sogar darüber und hat sich ungeachtet zahlreicher therapeutischer Anstrengungen in den letzten 20 Jahren kaum verbessert. Trotz besserer Erkenntnisse in der Pathophysiologie konnten sich neue Therapiekonzepte, die beispielsweise eine Verminderung der systemischen Inflammation mittels Kortikosteroiden oder eine intensivierete Insulintherapie zum Ziel hatten, in klinischen Studien nicht durchsetzen. (Annane et al., 2003)

Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit neue medikamentöse Ansätze zur Behandlung des septischen Schocks zu finden. Am Tiermodell wurde der Einfluss von C1-INH bzw. Heparin auf einen LPS-induzierten Schock untersucht. Anschließend erfolgte die Auswertung von Überlebenszeit, hämodynamischen Parametern, histologischen Schnitten, Veränderung der Expression verschiedener Proteine oder MPO-Aktivität unter Berücksichtigung folgender Thesen:

- 1) Das von uns gewählte Tiermodell und die verwendete LPS-Dosierung sind geeignet, einen septischen Schock zu induzieren und zu untersuchen.
- 2) Die Therapie mit C1-INH bzw. Heparin bewirkt ein verlängertes Überleben im septischen Schock.

Speziell für C1-INH erwartete Ergebnisse im septischen Schock:

- 3) C1-INH reduziert das Ausmaß eines etwaigen Endothelschadens.
- 4) C1-INH verbessert die Mikrozirkulation.
- 5) C1-INH kann die Aktivität von Entzündungszellen reduzieren.
- 6) C1-INH stabilisiert im septischen Schock die Hämodynamik.

Speziell für Heparin erwartete Ergebnisse im septischen Schock:

- 7) Heparin gewährleistet eine suffiziente O<sub>2</sub>-Versorgung der Organe.
- 8) Heparin hat messbare antientzündliche Eigenschaften.
- 9) Heparin reduziert den Zellstress.
- 10) Heparin verbessert die Hämodynamik.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Tiermodell

###### a) Geräte

Sirecust 1281	Siemens AG	Erlangen
Ama-digit 15 <sup>th</sup> Thermometer	Amarell GmbH	Kreuzwertheim
Gefrierschrank öko-super	Liebherr-International Dtl. GmbH	Biberach a.d.Riss
Haematokrit Zentrifuge Typ 2010	Andreas Hettich GmbH	Tuttlingen
Heizmatte ER-Alaska P5	Metro Cash & Carry GmbH Deutschland	Düsseldorf
Lampe KL1500 compact	Schott AG	Mainz
Tiefkühlschrank NanoFreeze V616	Nanalytik	Düsseldorf
Vortexer Reax top	Heidolph Instruments GmbH	Schwabach
xtrans pvb (invasives Druckmessgerät)	Codan Medizinische Geräte GmbH	Lensahn

###### b) Instrumente und Gefäße

anatomische, chirurgische Pinzette	Medicon eG	Tuttlingen
Becherglas	Schott AG	Mainz
Einwegskalpelle	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Kathetereinführkanüle (gelb)	Becton Dickinson and Company	Heidelberg
Katheterschlauch Intramdeic Polyethylen Tubing (I.D. 0,58 mm; O.D. 0,9655 mm)	Becton Dickinson and Company	Heidelberg
Katheterschlauchadapter Intramedic Luer Stub Adapter	Becton Dickinson and Company	Heidelberg
Microschere nach Hepp-Scheidel	Medicon eG	Tuttlingen
Nelson-Präparierschere, gerade, 13, cm	Medicon eG	Tuttlingen
Pipette Reference 1000; 200	Eppendorf AG	Hamburg
Präparier-/Ligaturklemme, groß; klein	Medicon eG	Tuttlingen
Spatel	Labotec Labor Technik Vertriebs GmbH	Wiesbaden
Stickstoffbehälter Voyager Plus	AIR LIQUIDE Deutschland GmbH	Düsseldorf

###### c) Lösungen und Medikamente

Bacillol®	Bode Chemie GmbH	Hamburg
Beriner® P (C1 Esterase Inhibitor Concentrate, human, pasteurized)	CSL Behring GmbH	Hattersheim am Main
Fut-175	Torii Pharmaceutical	Japan
Heparin-Natrium (25000 I.U./5 ml)	Ratiopharm GmbH	Ulm
isotone Kochsalzlösung (0,9 %)	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
L5886 (LPS from Salmonella enterica serotype abortus equi)	Sigma-Aldrich Co.	USA
N <sub>2</sub> (flüssig)	Kardiologie, Uniklinikum Halle	Halle (Saale)
Narcoren® (Pentobarbital-Natrium)	Merial GmbH	Hallbergmoos
Xylonest® 2%	AstraZeneca GmbH	Wedel

###### d) Verbrauchsmaterialien

Kryoröhrchen mit Außengewinde	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Dreiwegehahn Discofix	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Haematokritkapillaren	Andreas Hettich GmbH	Tuttlingen
Kryoröhrchen 1,8 ml (2 ml)	Biochrom AG	Berlin
Monoject Magellan Safty Needles 5/8"	Covidien	USA
Omnifix 40 Solo (1 ml, 40 i.u.)	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Syringe (without needle) 10 ml	Terumo Europe N.V.	Belgien
Tips 50-1000 µl; Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg
unsterile Kompressen	Paul Hartmann AG	Heidenheim
Verschlusskitt	Andreas Hettich GmbH	Tuttlingen

### 3.1.2 Westernblot und Aktivitätsbestimmung der Myeloperoxidase

#### a) Geräte

Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG	Hamburg
Electronicrührer Variomag	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Elektrophorese-Kammer	Hoefer Inc.	USA
Labor-Waage SPB 42	Scaltec Instruments GmbH	Göttingen
pH-Meter CG 837	Schott AG	Mainz
Photometer S. 250	Secomam	Frankreich
Polimax 2040	Heidolph Instruments GmbH	Schwabach
Power PAC 200	Bio Rad Laboratories GmbH	München
Power-Supply	Amersham Biosciences	Großbritannien
Qualitron Mini-Zentrifuge	Krackeler Scientific Inc.	USA
Sorvall MX 120 Ultra	Fisher Thermo Scientific	USA
Thermomixer 5437	Eppendorf AG	Hamburg
Transferkammer	IDEA Scientific Company	USA
Ultra-Thurrrax T25	IKA-Werke GmbH & CO. KG	Steufen
Vortexer REAX 2000	Heidolph	Schwabach

#### b) Instrumente und Gefäße

Glassmesszylinder 1000 ml	Schott AG	Mainz
Pipette Reference	Eppendorf AG	Hamburg
Pipetus-standard; Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH	Eberstadt
Röntgenkassette	Kodak GmbH	Stuttgart

#### c) Chemikalien

2-Propranol	Sigma-Adrich Chemie GmbH	USA
Acrylamide/Bis Solution	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
Albumin	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Amersham ECL Westernblot Detection Reagents	GE Healthcare UK	Großbritannien
Amidoschwarz	Fisher Thermo Scientific	USA
Ammonium-Persulfat	Bio Rad Laboratories GmbH	München
APS	Bio Rad Laboratories GmbH	München
Aqua dest.	Kardiologie, Uniklinikum Halle	Halle (Saale)
Benzonase	Invitrogen/ Life Technologies	USA
BSA	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
CHAPS	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Complete Mini	F. Hoffmann-La Roche Ltd.	Schweiz
ECL Westernblotting Detection Reagents	GE Healthcare UK	Großbritannien
Eisessig 10 %ig	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Entwickler-/Fixierlösung	Kodak GmbH	Stuttgart
Glycin	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Harnstoff	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB)	Sigma-Aldrich Co.	USA
Kaleidoscope Prestained Standards	Bio Rad Laboratories GmbH	München
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck KG	Darmstadt
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Natronlauge 0,1 M	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
o-Dianisidine	Sigma-Aldrich Co.	USA
Ponceau-S-Lösung	Sigma-Aldrich Co.	USA
Roti <sup>®</sup> -Load	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Salzsäure Lösung	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
SDS Pulver	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
SDS Solution 10 %ig	Bio Rad Laboratories GmbH	München
TEMED	Bio Rad Laboratories GmbH	München
Thioharnstoff	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Tris; Tris Base; TRIS Puffer	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Tween	Bio Rad Laboratories GmbH	München

**d) Primärantikörper**

HSP 70/HSC 70 (W27) sc-24	Santa Cruz Biotechnology Inc.	USA
IkB- $\alpha$ (H-4) sc-1643	Santa Cruz Biotechnology Inc.	USA
MFG-E8 (F5) sc-271574	Santa Cruz Biotechnology Inc.	USA
p38 $\alpha/\beta$ (A-12) sc-7972	Santa Cruz Biotechnology Inc.	USA
VEGF (C-1) sc-7269	Santa Cruz Biotechnology Inc.	USA

**e) Sekundärantikörper**

Donkey-anti-Goat-IgG-HRP sc-2020	Santa Cruz Biotechnology Inc.	USA
Goat-anti-Mouse IgG-HRP sc-2005	Santa Cruz Biotechnology Inc.	USA
Mouse IgG sek. Antikörper-H&L ab6728	Abcam	Großbritannien
Rat mab anti-Mouse IgG1 04-6120	Invitrogen/ Life Technologies	USA

**f) Verbrauchsmaterial**

Einmal-Küvetten 1,5 ml halbmikro	Brand GmbH	Wertheim
Model 583 Gel Dryer Filter Papier	Bio Rad Laboratories GmbH	München
Pipettenspitzen; Tubes 1,5 ml	Eppendorf AG	Hamburg
Polystyrene-Pipetten Falcon(5, 10, 25 ml)	Becton Dickinson and Company	Heidelberg
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Rotilabo®-Zentrifugenröhrchen Eco	Carl Roth GmbH	Karlsruhe

**3.1.3 Histologie****a) Geräte**

Eindeckautomat Promoter RCM 2000	Medite GmbH	Burgdorf
Färbeautomat Tissue Stainer TST 30	Medite GmbH	Burgdorf
Kamera PowerShot G6	Canon Inc.	Japan
Microtom Jung RM 2035	Leica Instruments	Bensheim
Mikroskop Axioskop 2 plus	Carl Zeiss AG	Oberkochen
Paraffinausgießstation Shandon Histocenter 2	Fisher Thermo Scientific	USA
Shandon Excelsior™ ES Tissue Processor	Fisher Thermo Scientific	USA
Thermocenter TC 40	SalvisLab, Renggli AG	Schweiz
Wasserbad WNB 7	Memmert GmbH + Co. KG	Schwabach

**b) Instrumente und Gefäße**

Anatomische Pinzette, gerade, 13 cm	Medicon Instrumente	Tuttlingen
Becherglas	Schott AG	Mainz
Deckgläser 24x50 mm	Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk	Braunschweig
Einbettkassetten gelb (ohne Deckel)	Resolab Laborbedarf	BadOeynhausen
Elka Objektträger (mattrand)	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH	Sondheim
Inzisionsschere, gerade, 13 cm	Medicon Instrumente	Tuttlingen
Mikrotomklingen: Microtome blades	Leica Instruments	Bensheim

**c) Chemikalien**

2-Propanol	Sigma-Aldrich Co.	USA
Aqua dest.	Kardiologie, Uniklinikum Halle	Halle (Saale)
Eindeckmedium pertex	Medite GmbH	Burgdorf
Eosin y Solution	Sigma-Aldrich Co.	USA
Formaldehydlösung 37 %ig	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Giemsa Farbstoff	Sigma-Aldrich Co.	USA
Mayers Hämalaulösung	Merck KG	Darmstadt
Paraplast ®	McCormick Scientific	USA
Roti-Histol ®; Rotisol ® (99%)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe

**3.1.4 Statistische Berechnungen und Analyseprogramme**

Mac Book 13"	Apple Incorporation	USA
Microsoft Office:mac 2011	Microsoft Corporation	USA
ImageJ 1.440; GIMP 2.8.2		USA

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tiermodell

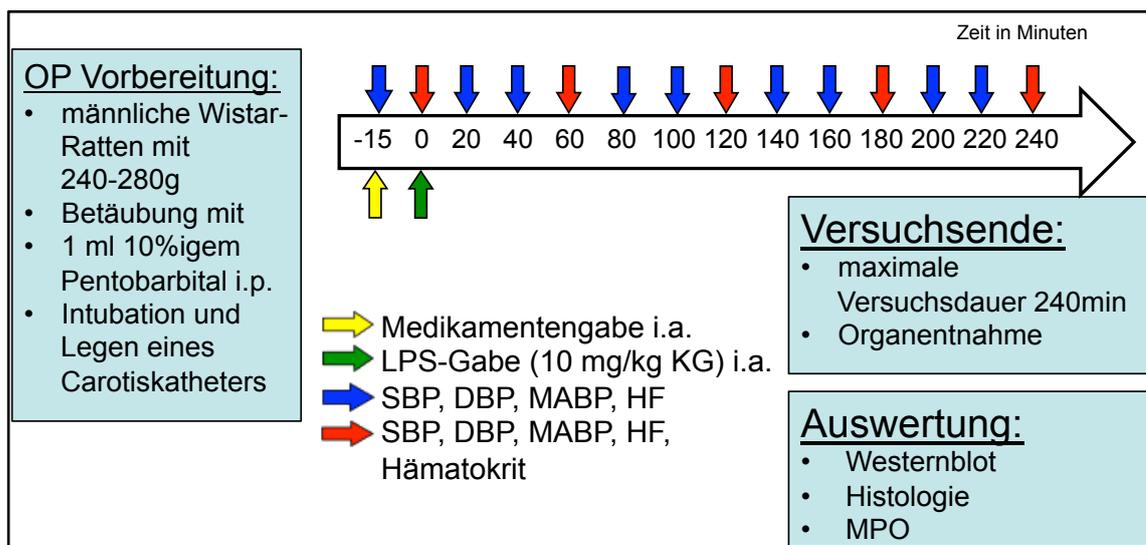
Für das Endotoxinschockmodell wurden männliche Ratten der Gattung Wistar verwendet. Diese wogen im Durchschnitt 250g. Alle Tiere wurden paarweise in Käfigen unter gleichen Bedingungen gehalten. Für alle Tierversuche lag eine entsprechende Tierversuchsgenehmigung vor. Außerdem wurde während des Versuchsablaufes auf die Einhaltung der deutschen Tierschutzbestimmungen und -gesetze geachtet.

Zunächst wurden die Ratten in leere Käfige umgesetzt und gewogen. Anschließend erfolgte die Betäubung durch eine i.p. Injektion mit 1 ml Pentobarbitallösung (10 %). Nachdem die Tiere keine Reaktionen mehr auf das Setzen standardisierter Schmerzreize zeigten, erfolgte ein ca. zwei cm großer Schnitt mit einem Skalpell entlang der Luftröhre im Halsbereich. Die Inzisionsstelle wurde durch das Benetzen mit 2 %iger Xylocainlösung lokal betäubt, die Trachea freipräpariert und parallel zu den Trachealspangen eröffnet. Nun konnte ein Polyethylentubus zur Sicherstellung einer adäquaten Sauerstoffzufuhr eingebracht und fixiert werden. Danach wurde die linke Arteria carotis communis dargestellt, distal mittels Ligatur verschlossen und proximal temporär abgeklemmt, um beim Eröffnen des Gefäßes einen zu großen Blutverlust zu vermeiden. Jetzt konnte der Katheter in die Arterie eingeführt und fixiert werden. Die Klemme wurde entfernt. Ein Austrocknen des Operationsgebietes während des Versuches konnte durch das Abdecken mit in Kochsalz getränkten Kompressen verhindert werden. Nach einer Stabilisierungsphase von 15 min wurden entsprechend des Versuchsprotokolls (s. Abb. 6) folgende Parameter über den Carotiskatheter regelmäßig kontrolliert:

- systolischer Blutdruck SBP (in mmHg) alle 20 Minuten
- diastolischer Blutdruck DBP (in mmHg) alle 20 Minuten
- mittlerer arterieller Blutdruck MABP (in mmHg) alle 20 Minuten
- Herzfrequenz HF (in Schlägen pro Minute) alle 20 Minuten
- Pressure-Rate-Index PRI ((MABP\*HF)/1000) alle 20 Minuten
- Hämatokrit HKT (in % vom Vollblutvolumen) alle 60 Minuten

Um durch Unterkühlung ausgelöste Nebeneffekte zu verhindern, konnte die Körpertemperatur mittels eines transrektalen Thermometers und einer stufenweise regulierbaren Heizmatte konstant im normalen physiologischen Bereich gehalten werden. Die maximale Versuchsdauer betrug 240 min. Ein Überschreiten hatte eine intracardiale Injektion einer letalen Dosis Pentobarbital zur Folge. Der Versuchsbeginn

definierte sich durch die i.a. Gabe des Endotoxins über den Katheter. Den Tiere, die zusätzlich ein Medikament erhielten, wurde dieses zwischen Stabilisierungsphase und Endotoxingabe ebenfalls i.a. über den Katheter verabreicht. Nach dem Tod der Tiere wurden, mittels Eröffnen des Thorax und des Bauchraumes, die Organe Herz, Lunge, Leber und Niere entnommen, gesäubert und in Kryoröhrchen verpackt. Eine Konservierung erfolgte primär in flüssigem Stickstoff. Bis zur weiteren Verwendung für verschiedene Untersuchungen (u.a. Westernblot, Histologie) lagerten die Proben in einem Tiefkühlschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Abb. 6:** Durchführungsschema des Endotoxinschockmodells; i.p. - intraperitoneal; i.a. - intraarteriell; LPS - Lipopolysaccharid; KG - Körpergewicht; SBP - systolischer Blutdruck; DBP - diastolischer Blutdruck, MABP - mittlerer arterieller Blutdruck; HF - Herzfrequenz

### a) Die Versuchsgruppen

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten und einen möglichen Effekt der Medikamente zu erkennen, wurden die Tiere randomisiert auf 7 verschiedene Versuchsgruppen aufgeteilt (s. Tab. 6). Die Vehicle-Gruppe erhielt eine Dosis LPS plus Kochsalzlösung anstatt des Medikamentes. Die Medikamentengruppen wurden neben dem Endotoxin noch mit einem Medikament (C1-INH, Heparin, Komplementinhibitor) vorbehandelt. Einer weiteren Gruppe wurde neben LPS die doppelte Dosierung der ursprünglichen Medikamentenkonzentration verabreicht, um mögliche dosisabhängige Effekte zu untersuchen. Bei den jeweiligen SHAM Gruppen wurden die Auswirkungen der Medikamente auf das Tier ohne Endotoxingabe beobachtet.

**Tab. 6:** Aufteilung der Versuchsgruppen

Versuchsgruppe	Medikamenten- bzw. Toxindosierung	Anzahl der Tiere
<b>LPS Shock + Vehicle</b>	NaCl + 10 mg/kg KG LPS	11
<b>LPS Shock + C1-INH</b>	100 units/kg KG C1-INH + 10 mg/kg KG LPS; 200 units/kg KG C1-INH + 10 mg/kg KG LPS	13
<b>C1-INH-SHAM</b>	100 units/kg KG C1-INH + NaCl	5
<b>LPS Shock + Heparin</b>	200 units/kg KG Heparin + 10 mg/kg KG LPS; 400 units/kg KG Heparin + 10 mg/kg KG LPS	12
<b>Heparin-SHAM</b>	200 units/kg KG Heparin + NaCl	6

**b) Dosiswahl für LPS, C1-INH und Heparin**

Für die Wahl der Dosis des Endotoxins wurde sich an anderen Arbeiten zum Endotoxinschock orientiert. In Versuchen von Hoque et al. und Matsui et al., die eine geringere Menge wie z.B. 5 mg/kg KG LPS i.v. verabreichten, kam es zu Veränderungen u.a. in der Hämodynamik. Diese zeigten sich jedoch im weiteren Versuchsaufbau reversibel, sodass ein Effekt bezüglich der Überlebenszeit nicht zu erwarten war. Die Ergebnisse von Guo et al. mit einer Konzentration von 10 mg/kg KG ergaben eine hohe Letalität im Versuchsverlauf. Dieser gewünschte Effekt konnte in Vorversuchen bestätigt werden. (Hoque et al., 1998; Matsui et al., 2001; Guo et al., 2009)

Bei der Wahl der Konzentration für C1-INH zeigten mehrere Arbeiten günstige Effekte im septischen Schock bei Dosierungen von 20 - 500 units/kg KG. Letztendlich wurde sich an de Zwaan et al. und Dorresteyn et al. orientiert und nach Vorversuchen eine Dosis von 100 units/kg KG gewählt. (Guerrero et al., 1993; Jansen et al., 1998; Sonntag et al., 1999; Zwaan et al., 2002; Dorresteyn et al., 2010)

Bei der Dosierung von Heparin wurde von der Therapie der tiefen Venenthrombose ausgegangen. Hierbei wird initial mit einem Bolus von 5000 IE i.v. mit anschließend 30000 - 35000 IE/24 h i.v. therapiert. Dies entspricht einer Dosis von ungefähr 20 IE/kg KG/h für einen erwachsenen, durchschnittlichen Menschen. Diese Konzentration wurde für den Versuch verzehnfacht und als Bolus verabreicht. Vorversuche konnten den günstigen Effekt dieser Dosierung bestätigen. (Diehm et al., 1997)

Da aus anderen Arbeiten bekannt war, dass sich für Versuchsgruppen, die weder Medikament (C1-INH bzw. Heparin) noch LPS erhielten, im Vergleich zu den SHAM Gruppen (C1-INH bzw. Heparin) keine Veränderungen bezüglich des Outcomes ergaben, wurde aus Gründen des Tierschutzes auf die Durchführung solcher Versuchsreihen verzichtet. (Jansen et al., 1998; Liu D et al., 2003; Mu et al., 2012)

### 3.2.2 Westernblot-Untersuchungen

Das Ziel einer Westernblot-Untersuchung ist es, ein in der Gelelektrophorese nach Größe aufgetrenntes Proteingemisch auf das Vorhandensein eines bestimmten Proteins zu untersuchen. Dabei macht man sich das Wissen über dessen Molekülgröße und damit die Laufweite im Elektrophoreseigel und verschiedene Antikörper, die das gesuchte Molekül binden und auf einem Film sichtbar machen können, zu nutze. Die Intensität der gesuchten Bande gibt schließlich auch Auskunft über die Menge des vorhandenen Eiweißes.

#### a) Proteinextraktion

In Vorbereitung auf den Westernblot war es notwendig, die Proteine aus den im Tierversuch gewonnenen Organproben strukturerhaltend in Lösung zu bringen, zelleigene Proteasen zu hemmen und Nukleinsäuren abzubauen. Dazu wurden 100 µg von der Probe in Lysepuffer und Benzonase (s. Tab. 7) gelöst und schließlich nach Inkubation (1 h bei Zimmertemperatur) für 90 min bei 20800 rcf und 4°C zentrifugiert.

#### b) Proteinbestimmung

Um vergleichbare Ergebnisse bei den Folgeuntersuchungen erzielen zu können, war es notwendig, in den aus den Proben gewonnenen Proteinlösungen den Gesamtproteingehalt zu ermitteln, um dann Lösungen herzustellen, die eine vorher definierte Menge Protein enthalten. Dabei kam die Bestimmungsmethode nach Popov zur Anwendung. Zu Beginn wurden die Lösungen I - III und eine Albuminstammlösung (s. Tab. 7) zur Erstellung einer Eichkurve angesetzt. Von dieser Stammlösung mussten verschiedene Verdünnungen angefertigt werden. Nun konnten 200 µl der Eichlösungen und 200 µl der vorher auf 1:20 verdünnten Probenlösungen mit jeweils 600 µl von Lösung III versetzt werden. Diese Suspension wurde anschließend in Eppendorf®-Probengefäße gefüllt und für 5 min bei 15800 g in einer Eppendorf®-Zentrifuge zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das verbliebene Pellet vorsichtig drei mal mit jeweils 750 µl von Lösung II gewaschen. Mit der Suspension des letzten Waschganges erfolgte ein erneutes zentrifugieren von 5 min bei 15800 g. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 0,1 M Natronlauge (1:10 mit Aqua dest. verdünnt) aufgelöst. Die entstandenen Lösungen wurden nun in Microküvetten gefüllt und im Photometer untersucht. Aus den Absorptionen der Eichproben bei 620 nm konnte eine Eichgerade erstellt werden. Zusammen mit den Absorptionen der Probenlösungen war es nun möglich deren Proteinkonzentration zu ermitteln.

### c) Gelelektrophorese

Das Ziel der Gelelektrophorese ist es, die Masse von Molekülen zu ermitteln. Die beeinflussenden Faktoren von Laufrichtung und Geschwindigkeit sind dabei die Größe, die Ladung, die Porengröße des Laufmediums und die angelegte Spannung. Acrylamid diente in einer für Proteinauftrennungen günstigen Konzentration als Laufmedium. Damit alle Proteine die gleiche Laufrichtung im Gel einschlugen, wurden diese mit der stark negativen Verbindung SDS behandelt. Zusätzlich wurde die Spannung so gewählt, dass eine optimale Laufgeschwindigkeit mit guter Auftrennung der Moleküle erreicht wurde. Ein parallel mitlaufender Standard ermöglichte die Bestimmung der Molekülmassen der unbekannt Proteine.

In Vorbereitung auf die Gelelektrophorese wurde zuerst das Trenngel (s. Tab. 7) hergestellt und in die Gelkammer pipettiert. Anschließend konnte das kurz vorher angemischte Sammelgel auf das Trenngel aufpipettiert werden. Mit einem Gelkamm wurden die Geltaschen erzeugt. Parallel wurde den in der Proteinextraktion vorbereiteten Probenlösungen ein Volumen entnommen, das 50 µg Protein enthielt. Diesen Lösungen wurde Roti<sup>®</sup>-Load im Verhältnis 3:1 zugesetzt, beides im Vortexer vermischt, kurz anzentrifugiert und schließlich bei 95°C für 5 min inkubiert. Die Proben und eine gebrauchsfertiger Standard konnten nun in die vorher mit Elektrophoresepuffer befüllten Geltaschen überführt und die Gelkammer in die Elektrophorese eingesetzt werden. Nach dem Einfüllen von Elektrophoresepuffer lief die Gelelektrophorese unter ständiger Kühlung für ungefähr 4,5 h.

### d) Westernblot

Bei einem Westernblot werden die in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine mechanisch stabilere PVDF-Membran übertragen, von wo aus dann Untersuchungen mit z.B. spezifischen Antikörpern möglich sind.

Nachdem die Gelelektrophorese beendet war, wurde das Gel vorsichtig aus der Gelkammer herausgelöst und in Transferpuffer geschwenkt. Anschließend wurde das Gel zusammen mit einer Membran in die Transferkassette eingesetzt und in die Transferkammer eingebaut. Nun wurde über Nacht an die Elektroden eine Stromstärke von 500 mA angelegt, wodurch ein Wandern der Proteine vom Gel auf die Membran zustande kam. Zum Abschluss wurde die Stromstärke für 1 h auf 1 A erhöht und danach die PVDF-Membran für 2 min in Ponceau-Lösung geschwenkt. Die anschließende Fixierung der Proteine auf der Membran erfolgte durch das Inkubieren mit Essiglösung (10%) für 5 min. Die Essigreste wurden mit Aqua dest. abgewaschen. Jetzt konnte die Membran nach kurzem Spülen mit TBS-T für 3 h in der angefertigten

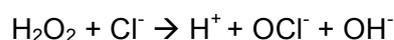
Blockierungslösung geschwenkt werden. Darauf wurde die Blockierungslösung 5 min lang mit TBS-T abgewaschen und die Membran mit der primären Antikörperlösung über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde alles drei mal 5 min mit TBS-T gewaschen und mit der sekundären Antikörperlösung bei Raumtemperatur für 1,5 h geschwenkt. Nun konnte die PVDF-Membran in die Röntgenkassette eingesetzt und der Film entwickelt werden. Zum Beenden des Entwicklungsvorganges wurden die Banden auf dem Film mit einer Färbelösung sichtbar gemacht. Nach Beendigung dieses Arbeitsschrittes konnte die Auswertung der Aufnahmen erfolgen.

**Tab. 7:** Bestandteile der verschiedenen Lösungen zur Westernblot-Untersuchung

Lösung	Bestandteile
<b>Lysepuffer</b>	17g Harnstoff; 16,1 g Thioharnstoff; 1,6g CHAPS; 0,194g TRIS Puffer; 4 Tabl. Complete Mini; Auffüllen auf 40 ml mit Aqua dest.
<b>Lösung I</b>	0,65 g Amidoschwarz 10B in 50 ml Lösung II
<b>Lösung II</b>	30 ml Eisessig (100% Essigsäure) + 450 ml Methanol
<b>Lösung III</b>	Lösung I + Lösung II im Verhältnis 1:10
<b>Albuminstammlösung</b>	2 mg BSA (bovine serum albumine) + 1000 µl Aqua dest.
<b>Trenngelpuffer</b>	363 g Tris Base; 1000 ml ddH <sub>2</sub> O; konz. HCl zum Einst. auf pH 8
<b>Sammelgelpuffer</b>	30 g Tris Base; 500 ml ddH <sub>2</sub> O; konz. HCl zum Einst. auf pH 6,8
<b>10-facher SDS-Elektrophoresepuffer</b>	30,29 g Tris; 10 g SDS (0,1%); 1000 ml ddH <sub>2</sub> O; auf pH 8,3 einstellen
<b>Trenngel</b>	13,5 ml Acrylamid (30%); 5,62 ml Trenngelpuffer; 450 µl SDS (10%); 23,25 ml Reinstwasser; 2,25 ml APS (1,5%); 22,5 µl TEMED
<b>Sammelgel</b>	2,5 ml Acrylamid (30%); 5 ml Sammelgelpuffer; 200 µl SDS (10%); 11,3 ml Reinstwasser; 1 ml APS (1,5%); 15 µl TEMED
<b>Transferpuffer (10-fach)</b>	30,29 g Tris; 144 g Glycin; 1000 ml Aqua dest.; auf pH 8,3 einstellen
<b>Transferpuffer (mit 20% Methanol)</b>	100 ml Transferpuffer (zehnfach); 200 ml Methanol; in 700 ml Aqua dest. lösen; auf pH 8,3 einstellen
<b>TBS (zehnfach)</b>	12,10 g Tris; 90 g NaCl; 1000 ml Aqua dest.
<b>TBS-T</b>	100 ml TBS; 1 ml Tween (1%)
<b>Blockierungslösung</b>	300 ml TBS-T; 15 g bzw. 3 g Magermilchpulver;
<b>prim. Antikörperlösung</b>	10 ml Blockierungslösung (5%); 100 µl primärem Antikörper
<b>sek. Antikörperlösung</b>	25 ml Blockierungslösung (1%); 25 µl sekundärem Antikörper

### 3.2.3 Aktivitätsbestimmung der Myeloperoxidase

Die Myeloperoxidase ist ein Enzym, welches reaktive Sauerstoffspezies bilden kann. Dabei katalysiert es die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu hypochloriger Säure:



Diese hochreaktive Verbindung mit antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften wird hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten in entzündlichen Geweben

freigesetzt, wo sie sowohl intra- als auch extrazellulär seine Wirkung entfalten kann. Somit ist die Myeloperoxidase-Aktivität ein Maß für die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und die damit ablaufende Entzündungsreaktion in Geweben. (Bradley et al., 1998; Gaut et al., 2001)

Zur Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität mussten zwei Lösungen angefertigt werden. Der HTAB-Puffer wurde am vorherigen Tag vorbereitet, auf einen pH von 6,0 eingestellt und über Nacht unter ständigen Rühren inkubiert. Am Versuchstag selbst durfte die ODI-Solution, aufgrund der hohen Lichtempfindlichkeit, maximal 1,5 h vor Versuchsbeginn hergestellt werden und musste bis zu diesem in braunen Flaschen gelagert werden. Zusätzlich sollten alle Ansätze während der gesamten Durchführung mit Eis gekühlt werden (alles s. Tab. 8).

**Tab. 8:** Zusammensetzung von 50 ml HTAB-Puffer und 5,5 ml ODI-Solution

<b>Bestandteil HTAB-Puffer</b>	<b>Menge</b>	<b>Bestandteil ODI-Sol.</b>	<b>Menge</b>
Hexadecyltrimethylammoniumbromid	250 mg	o-Dianisidine (gekühlt)	8,35 mg
Aqua dest.	45 ml	PBS	5 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,034 g auf 5 ml Aqua dest.)	5 ml	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung	0,5 ml

Bei Versuchsbeginn wurden von allen zu untersuchenden Gewebeproben, welche zuvor bei -80 °C gelagert wurden, je ein etwa gleich großes Gewebestück abgetrennt, das Gewicht notiert und mit der zehnfachen Menge an HTAB-Puffer versetzt. Diese Lösungen konnte im nächsten Schritt homogenisiert und in einer Ultrazentrifuge bei 4 °C und 12500 rpm für 30 min zentrifugiert werden. Anschließend wurde der entstandene Überstand abgenommen und auf Eis gestellt. Nun fand die Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität bei einer Wellenlänge von 460 nm im Photometer statt. Dazu wurden 50 µl der Proben mit 950 µl ODI-Solution versetzt und die Extinktion bei 60 und 120 s gemessen. Dabei kam es, katalysiert durch die Myeloperoxidase, zur Oxidation von dem in der ODI-Lösung enthaltenen o-Dianisidine. Der dabei entstehende Farbumschlag wurde photometrisch gemessen. Aus folgender Formel,

$$\text{MPO} = (\text{Ext.}_{120''} - \text{Ext.}_{60''}) * 17,7 * \text{U/l},$$

multipliziert mit dem jeweiligen Gewicht der Probe, ergab sich dann die entsprechende Myeloperoxidase-Aktivität in U/g.

### 3.2.4 Histologische Untersuchung

Von den in den Tierversuchen gewonnen Organen wurden mikroskopische Präparate in den Färbungen Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) und Giemsa angefertigt. Dafür mussten zuvor die Proben für 24 h in 4 %iger Formalinlösung fixiert werden. Anschließend erfolgte ein erneutes Zuschneiden und Verbringen der Präparate auf nummerierte Einbettkassetten. Im nächsten Arbeitsschritt wurden diese Kassetten zur Entwässerung in den Einbettungsautomaten eingesetzt, wo sie über einen Zeitraum von ungefähr 20 h verschiedene Bäder mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (80 %ig, 96 %ig, 99 %ig), Xylol-Lösung und Paraffin durchliefen. Danach wurden die Proben in eine Gießwanne mit flüssigem Paraffin verbracht, um Gewebeblöcke herzustellen, die nach dem Erkalten in einem Rotationsmicrotom auf Schnitte mit einer Stärke von 5 µm zugeschnitten wurden. Die Schnittstreckung erfolgte in einem Wasserbad (50 °C) mit Aqua dest., mit anschließendem Auftragen der Schnitte auf Objektträger. Ein Inkubieren im Umluftheizschrank entfernte restliches Paraffin. Vor der Färbung mit der Hämatoxylin- und Eosinlösung wurden die Gewebe auf den Objektträgern nacheinander mit Xylol, Alkoholen absteigender Konzentration und Aqua dest. vorbereitet. Um die HE-Präparate schließlich mit Abdeckmedium und Abdeckglas fixieren zu können, mussten sie nach der Färbung mit Aqua dest., Alkoholen aufsteigender Konzentration und Xylol nachbehandelt werden. Für die Giemsa-Färbung wurden die Schnitte der gleichen Vorbereitung unterzogen, anschließend jedoch in eine Giemsa-gebrauchslösung verbracht. In den nächsten Arbeitsschritten wurden die Präparate nacheinander kurz in ein Essigbad, 99 %igen Alkohol und Isopropanol getaucht. Vor der Fixierung mit Abdeckmedium und Abdeckglas wurden die Gewebe auf den Objektträgern mit Xylol behandelt. Nun konnten die histologischen Präparate im Mikroskop begutachtet werden.

### 3.2.5 Statistische Auswertungen

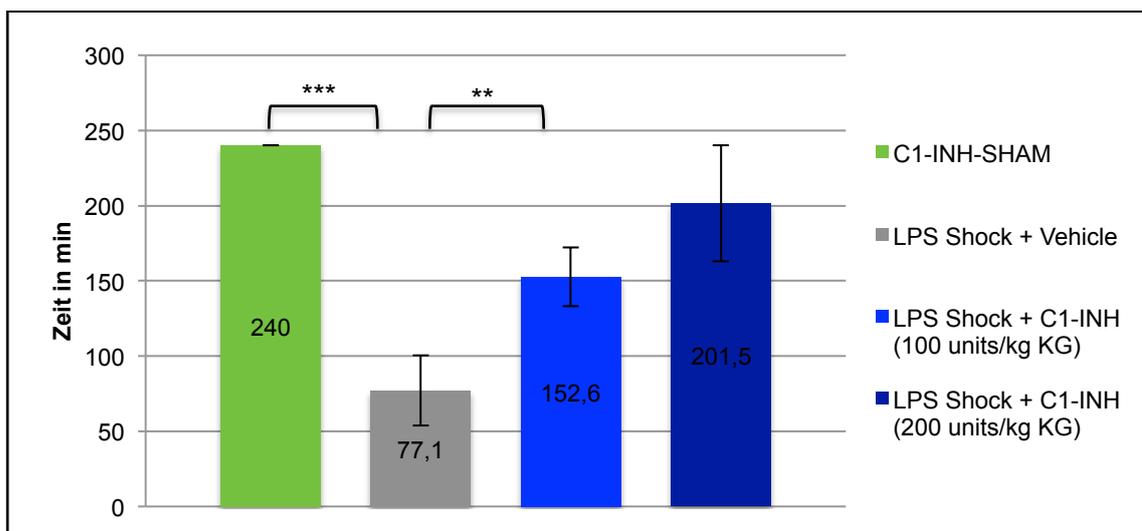
Die Datenanalyse, die unter anderem die Berechnung von Mittelwerten, Standardabweichungen oder p-Werten beinhaltete, und die grafischen Darstellungen wurden mit dem Programm Excel aus Microsoft Office: mac 2011 durchgeführt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Effekte von C1-INH im septischen Schock

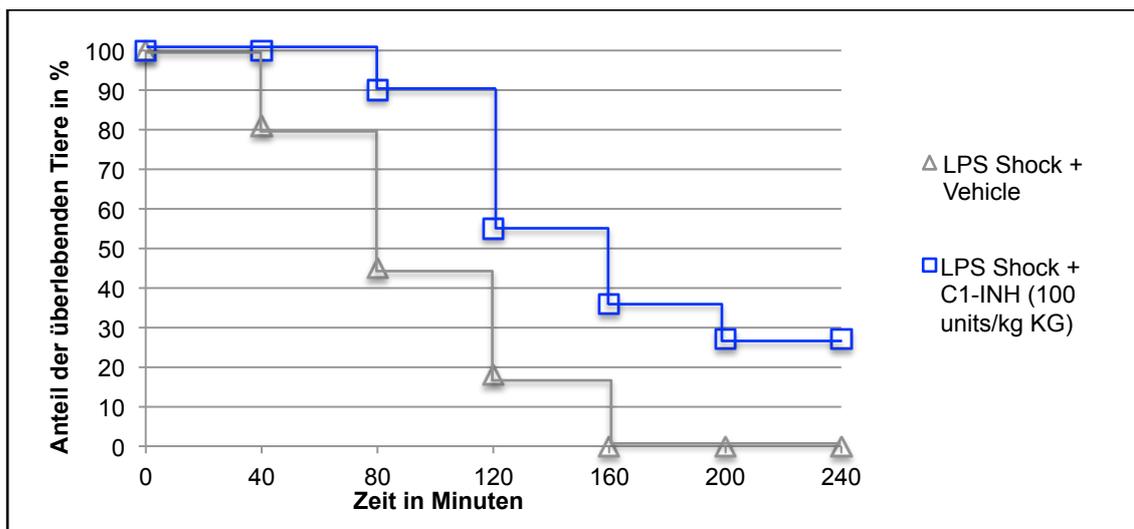
#### 4.1.1 Überlebenszeit

Nach dem Abwarten einer Stabilisierungsphase, welche die Verabreichung des Medikamentes beinhaltet, wurde die Überlebenszeit ab dem Zeitpunkt der Toxingabe gemessen (s. Abb. 7). Die Tiere der Versuchsgruppe, denen allein das Endotoxin injiziert wurde, überlebten dabei im Durchschnitt 77,1 min. Die Tiere, die sowohl LPS als auch C1-Esterase-Inhibitor erhielten, lebten im Schnitt 152,6 min und damit nahezu doppelt so lang verglichen zu den Tieren der LPS Shock + Vehicle Gruppe ( $p \leq 0,01$ ). Die Verabreichung der doppelten Medikamentenkonzentration zusätzlich zu dem Endotoxin ergab in dieser Arbeit ein verlängertes mittleres Überleben (201,5 min) sowohl gegenüber der LPS Shock + Vehicle Gruppe ( $> 2,5$  fach), als auch den Tieren der LPS Shock + C1-INH Gruppe mit der einfachen Dosis. Alle Versuchstiere, denen nur das Medikament C1-INH verabreicht wurde, überlebten den gesamten Versuchszeitraum von 4 h. Sie zeigten damit ein durchschnittlich signifikant längeres Überleben im Vergleich zur LPS Shock + Vehicle Gruppe ( $p \leq 0,001$ ). Im Weiteren erfolgt die Auswertung der Ergebnisse neben der LPS Shock + Vehicle- und C1-INH-SHAM Gruppe nur für die Tiere in der LPS Shock + C1-INH Gruppe, mit der Standardkonzentration von 100 units/kg KG.



**Abb. 7:** Darstellung der Überlebenszeiten in Minuten mit Standardfehler für: C1-INH-SHAM, LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + C1-INH (100 units/kg KG), LPS Shock + C1-INH (200 units/kg KG); \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , NS = nicht signifikant

Die Abb. 8 zeigt den Anteil der lebenden Tiere der jeweiligen Versuchsgruppe zum entsprechenden Versuchszeitpunkt. Daraus wird ersichtlich, dass bereits in den ersten 80 min über 50 % der Tiere aus der LPS Shock + Vehicle Gruppe verstarben. Im Vergleich dazu lebten zu diesem Zeitpunkt in der LPS Shock + C1-INH Gruppe noch 90 % der Tiere. Allein 2 Versuchstiere der LPS Shock + Vehicle Gruppe überlebten länger als 2 h, das Längste 142 min. Im Vergleichszeitraum in der Medikamentengruppe mit Endotoxin und C1-INH lebten über 50 % länger als 2 h. 3 Tiere erreichten sogar das Versuchsende von 4 h.



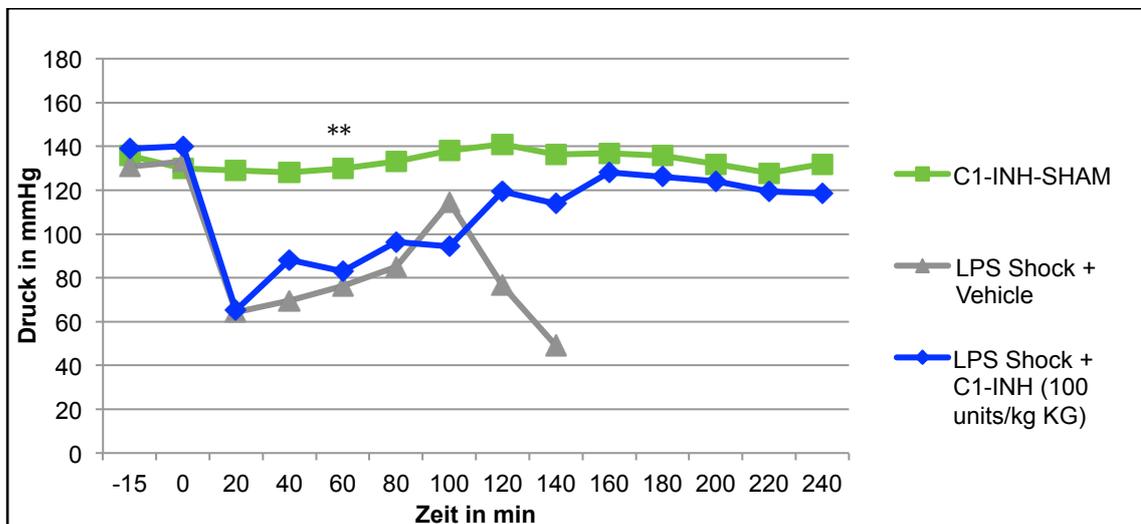
**Abb. 8:** Darstellung der überlebenden Tiere in % (Kaplan-Meier-Kurve) für: LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + C1-INH (100 units/kg KG)

#### 4.1.2 Hämodynamische Parameter

##### a) Mittlerer arterieller Blutdruck

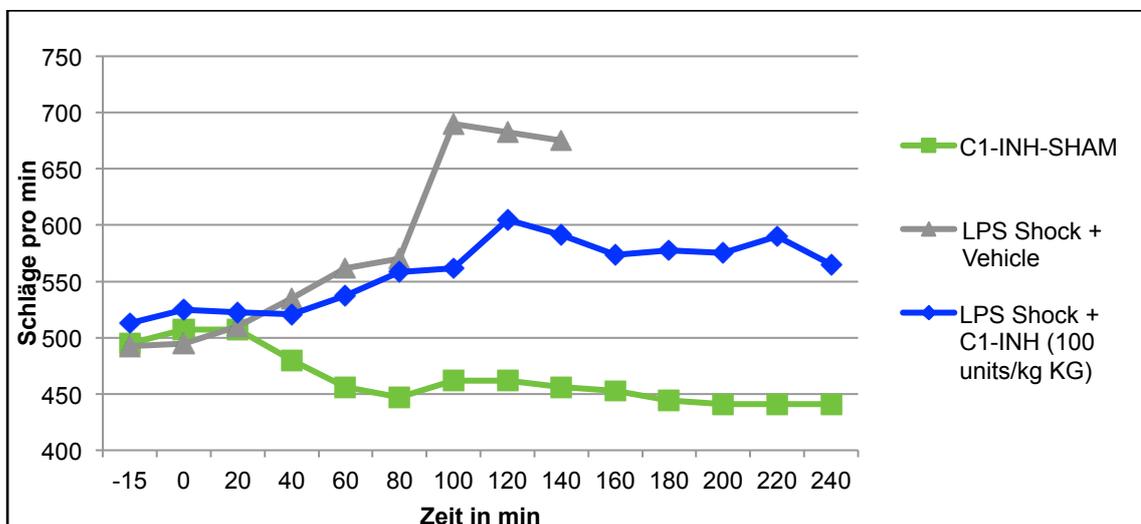
Der mittlere arterielle Blutdruck, der in regelmäßigen Abständen während des gesamten Versuchsablaufs gemessen wurde (s. Abb. 9), zeigte bei der C1-INH-SHAM Gruppe über die gesamte Versuchszeit nur geringe Schwankungen in einem Bereich von 127 mmHg bis 141 mmHg. Zum Zeitpunkt 60 min unterschied er sich signifikant von dem der LPS Shock + Vehicle Gruppe ( $p \leq 0,01$ ). Sowohl bei den Tieren, denen LPS und C1-INH verabreicht wurde, als auch bei den Tieren, die allein LPS erhielten, kam es nach Endotoxingabe zu einem deutlichen Blutdruckabfall auf durchschnittlich 65 mmHg. Dieser konnte sich mit zunehmender Versuchsdauer in der LPS Shock + C1-INH Gruppe auf Werte um die 120 mmHg stabilisieren. Bei den LPS Shock + Vehicle Tieren kam es zu einem maximalen Blutdruckanstieg auf durchschnittlich 114 mmHg bei 100 min mit anschließendem kontinuierlichen Abfall. Dieser kurzfristige deutliche Anstieg in der LPS Shock + Vehicle Gruppe ließ sich dabei auf ein einzelnes

Tier zurückführen, welches auch als einziges länger als 140 min lebte. Dieser Umstand sorgt im Folgenden bei der Betrachtung der weiteren hämodynamischen Parameter für eine deutliche Veränderung der Werte zum Beobachtungszeitpunkt 100 min.



**Abb. 9:** Darstellung des mittleren arteriellen Blutdruckes in mmHg für: C1-INH-SHAM Gruppe, LPS Shock + Vehicle Gruppe, LPS Shock + C1-INH Gruppe; \*\* = p-Wert im Vergleich zur Vehicle Gruppe  $\leq 0,01$

**b) Herzfrequenz**



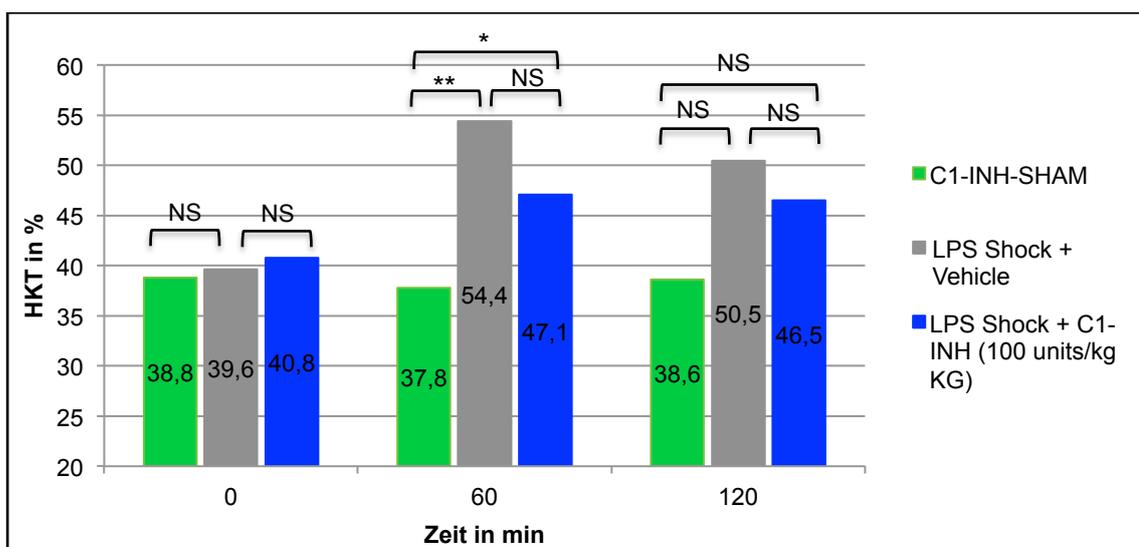
**Abb. 10:** Darstellung der Herzfrequenz in Schlägen pro Minute für: C1-INH-SHAM Gruppe, LPS Shock + Vehicle Gruppe, LPS Shock + C1-INH Gruppe

Die nach Toxingabe im 20 minütigen Intervall gemessene Herzfrequenz (HF) ergab für die C1-INH-SHAM Gruppe Mittelwerte im Bereich von 440 S/min bis 510 S/min (s. Abb. 10). Die Herzfrequenzen der Tiere, denen allein das Toxin verabreicht wurde, zeigten, beginnend bei Werten um die 500 S/min zum Versuchsbeginn, einen kontinuierlichen Anstieg bis auf 570 S/min bei 80 min. Zum nächsten Messzeitpunkt war ein deutlicher

Anstieg auf annähernd 700 S/min zu verzeichnen, der sich bis zum Ende der Messung bei 140 min auf Frequenzen mit durchschnittlich 675 S/min verminderte. Auch hier spielt möglicherweise das verringerte Versuchskollektiv ab dem Zeitpunkt 100 min mit deutlichem Parameteranstieg eine Rolle. Die Herzfrequenzen der LPS Shock + C1-INH Gruppe, beginnend bei Werten um die 520 S/min, stiegen nach LPS-Gabe auf eine durchschnittliche Frequenz von 605 S/min zum Beobachtungszeitpunkt bei 120 min an, um im Verlauf bis zum Versuchsende um Werte zwischen 550 und 600 zu schwanken.

**c) Hämatokrit**

Die stündlich durchgeführte Hämatokritbestimmung diente in diesem Versuch als Korrelat der Gefäßpermeabilität und damit der Schrankenstörung der Gefäße. Sie ergab in der C1-INH-SHAM Gruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum relativ konstante Werte zwischen 37 % und 40 % (s. Abb. 11). Zum Zeitpunkt 60 min stellte sich ein sehr signifikanter Unterschied zur LPS Shock + Vehicle Gruppe ( $p \leq 0,01$ ) und zur LPS Shock + C1-INH Gruppe ( $p \leq 0,05$ ) dar. In den Tiergruppen, denen das Endotoxin verabreicht wurde (LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + C1-INH), kam es zu diesem Zeitpunkt, nach einem initial zur C1-INH-SHAM Gruppe vergleichbaren Hämatokritwert, zu einem Anstieg auf 54 % bzw. 47 %. Anschließend war in der LPS Shock + Vehicle Gruppe ein Abfall der zellulären Blutbestandteile auf rund 50 % bei 120 min zu beobachten, womit der Beobachtungszeitraum durch Versterben der Tiere endete. Bei den Tieren aus der LPS Shock + C1-INH Gruppe kam es nach dem Anstieg und Stabilisierung des Hämatokrits bei rund 47 % zu einem kontinuierlichen Abfall bis auf rund 42 % am Beobachtungsendpunkt bei 240 min.



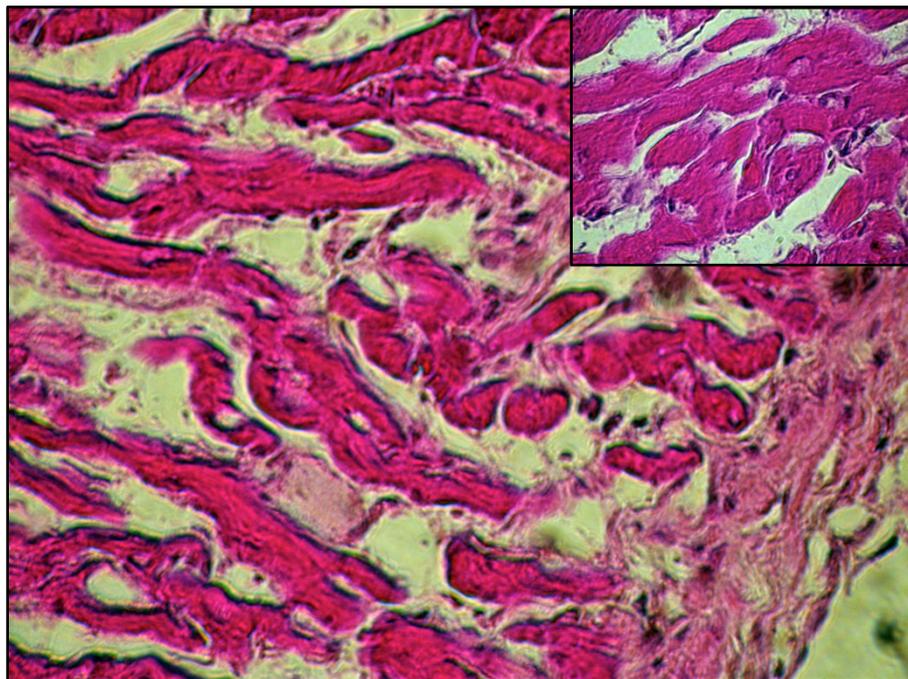
**Abb. 11:** Darstellung des Hämatokrits in % für: C1-INH-SHAM Gruppe, LPS Shock + Vehicle Gruppe, LPS Shock + C1-INH Gruppe; \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , NS = nicht signifikant

### 4.1.3 Histologie

Für die histologischen Untersuchungen wurden Schnitte in den Färbungen Hämatoxylin-Eosin (HE) und Giemsa für die Organe Herz, Lunge, Leber und Niere angefertigt.

#### a) Herz

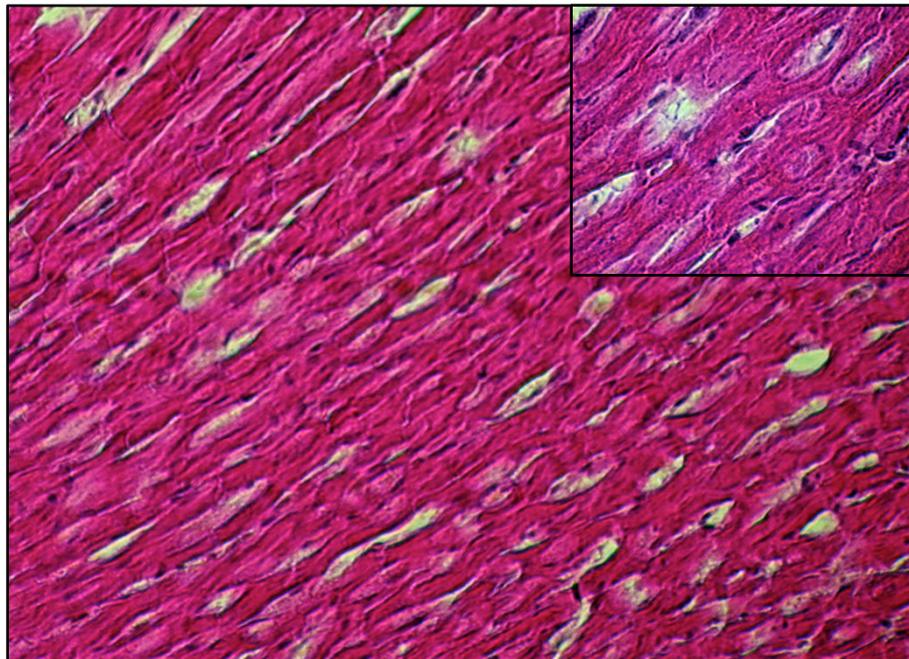
In der makroskopischen Begutachtung zeigten sich zwischen den Tieren der SHAM Gruppe, der LPS Shock + C1-INH Gruppe und der LPS Shock + Vehicle Gruppe geringe Unterschiede. So war eine vermehrte Dilatation des linken Ventrikels in der Vehicle Gruppe auffällig. In den mikroskopischen Präparaten konnte man bei den Vehicle Tieren (s. Abb. 12) in mehreren Bereichen Risse und kleine Einblutungen erkennen. Gleichzeitig stellte sich über weite Teile ein deutlicher Strukturverlust der Kardiomyozyten dar.



**Abb. 12:** Histologische HE-Präparate des Herzens der LPS Shock + Vehicle Gruppe; Vergrößerung: Hauptbild 200fach, kleines Bild 400fach

Mikroskopisch fehlten eine Querstreifung der Herzmuskelzellen und die Zell-Zellkontakte in Form von Glanzstreifen über große Teile der Präparate. Im Vergleich dazu zeigten die histologischen Schnitte des Herzens von den Tieren, die C1-INH plus LPS erhielten, wie in den Abb. 13 zu sehen, eine deutlich besser erhaltene Kompaktheit des Organes. Die Zellstruktur schien weniger beeinträchtigt. In den HE-Präparaten der SHAM Gruppe war die Struktur der Herzmuskelzellen weitestgehend

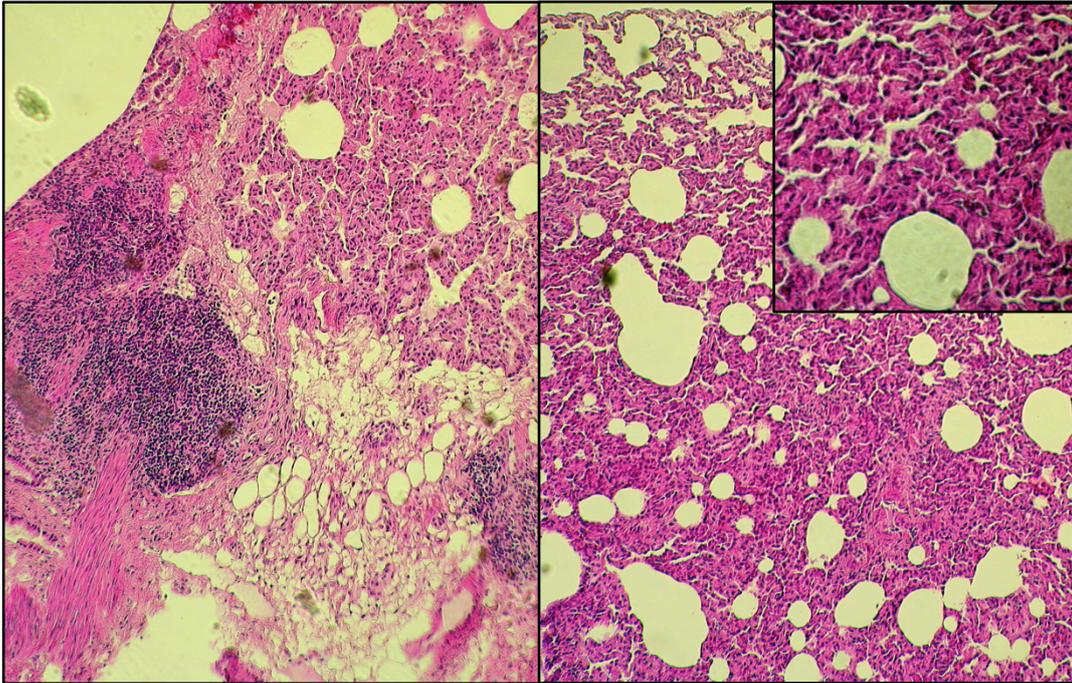
unbeeinträchtigt und es konnten deutlich mehr intrazelluläre Zellkerne identifiziert werden als bei den Schnitten der LPS Shock + Vehicle Gruppe. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei der LPS Shock + C1-INH Gruppe im Vergleich zur Vehicle Gruppe. Jedoch waren in den histologischen Schnitten der Tiere, die das Endotoxin sowohl mit als auch ohne C1-INH erhielten, vermehrt extrazelluläre Zellkerne zu sehen, die auf eine verstärkte Entzündungsreaktion hindeuteten.



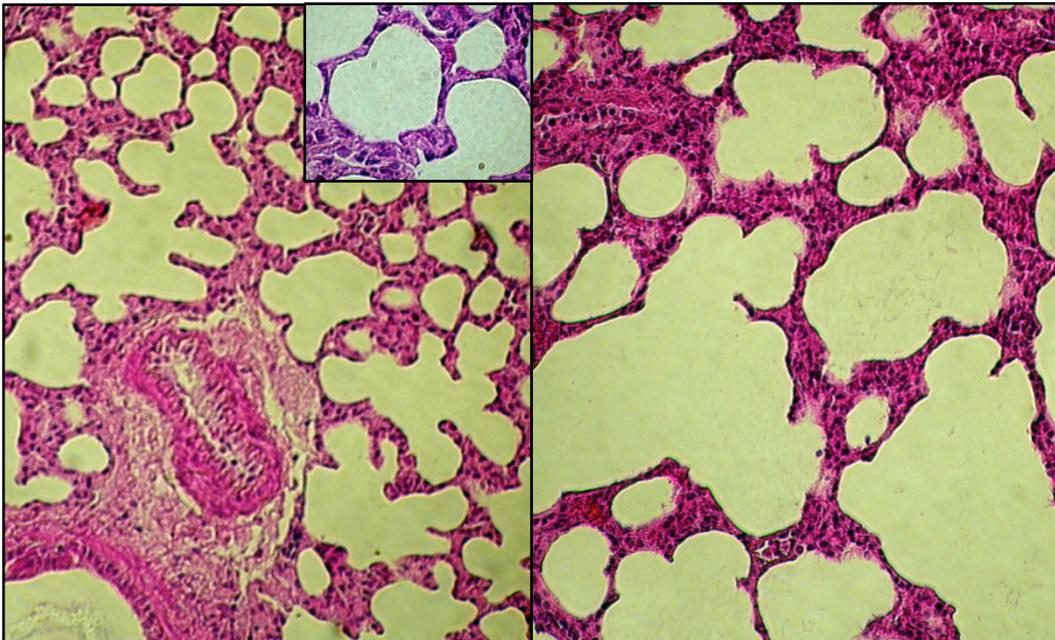
**Abb. 13:** Histologische HE-Präparate des Herzens der LPS Shock + C1-INH Gruppe; Vergrößerung: Hauptbild 200fach, kleines Bild 400fach

## b) Lunge

In situ zeigten sich bei der Lunge in allen Gruppen makroskopisch kaum Unterschiede. In der histologischen Aufarbeitung waren vor allem bei den Vehicle Tieren (s. Abb. 14), sowohl in den Giemsa- als auch bei den HE-Färbungen, vermehrte und vergrößerte Lymphfollikel zu erkennen. Bei den sonst dünneren Alveolarwänden stellte sich eine deutliche Verdickung dar. Diese Verdickung war zentral deutlicher ausgeprägt als peripher. Zusätzlich erschien das Gewebe aufgelockert und in seiner Integrität gestört. Im Gegensatz dazu waren in den anderen Versuchsgruppen im Lungengewebe kaum Veränderungen zu beobachten. So stellten sich z.B. vereinzelte, jedoch nicht vergrößerte Lymphfollikel dar. Auch zeigten sich bei den LPS Shock + C1-INH Tieren nur geringfügig verdickte Alveolarwände und kaum Integritätsstörungen (s. Abb. 15).



**Abb. 14:** Histologische HE-Präparate der Lunge; linkes und rechte Bilder: LPS Shock + Vehicle Gruppe; Vergrößerung: beide Hauptbilder 100fach, kleines Bild 400fach

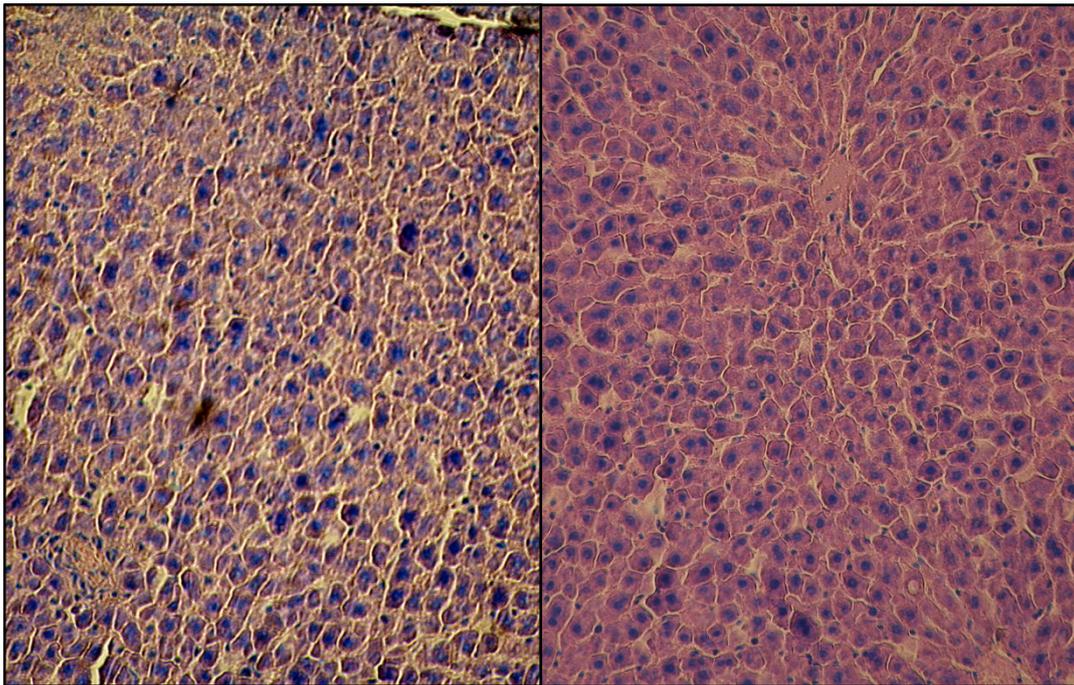


**Abb. 15:** Histologische HE-Präparate der Lunge; linke Bilder: LPS Shock + C1-INH Gruppe; rechtes Bild: C1-INH-SHAM Gruppe; Vergrößerung: beide Hauptbilder 200fach, kleines Bild 400fach

### c) Leber

Bei der Betrachtung der Organe in situ wies die Leber vor allem in der LPS Shock + Vehicle Gruppe vermehrt Einblutungen und Nekrosen auf. Nicht ganz so stark ausgeprägt stellte sich der Befund bei den LPS Shock + C1-INH Tieren dar. In der C1-

INH-SHAM Gruppe waren sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch keine Auffälligkeiten zu sehen. Bei der Betrachtung der histologischen Präparate zeigten sich Unterschiede zwischen den Leberpräparaten der Vehicle Gruppe und denen der Medikamenten Gruppe vor allem in der Darstellung der Zentralvenenläppchen. Während bei letzterer noch deutlich Zentralvenen mit den umgebenen periportalen Feldern und den nach zentral zu laufenden Sinusoiden zu erkennen waren, ließen sich bei den Vehicle Tieren Zellgrenzen oft kaum sauber voneinander abgrenzen und Zentralvenen waren nur selten aufzufinden (alles s. Abb. 16).

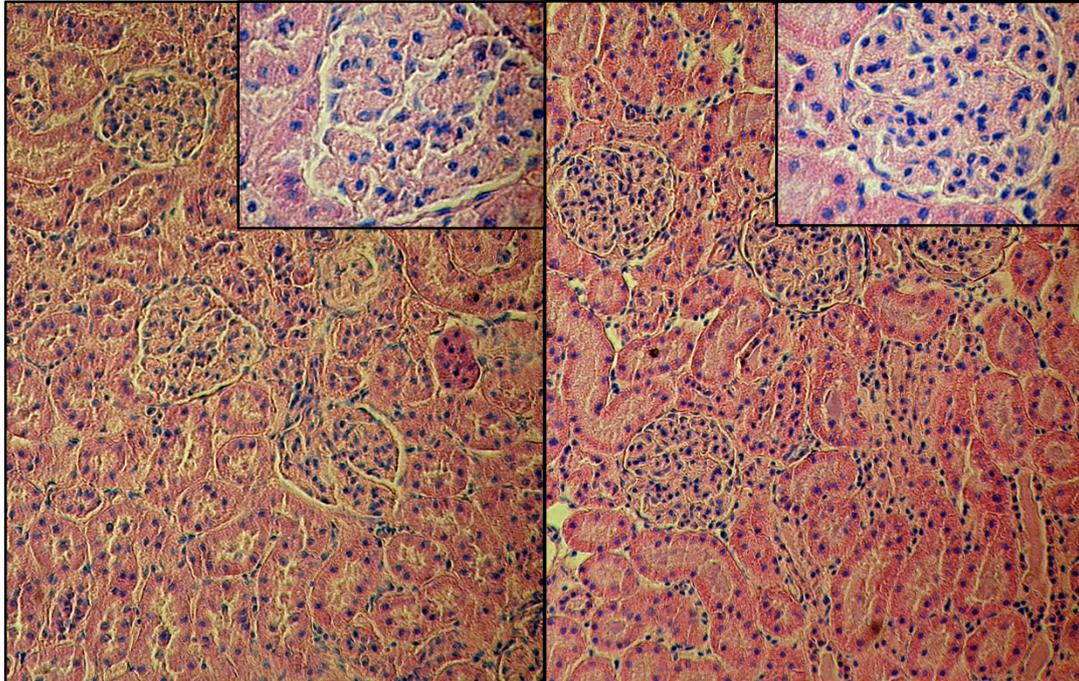


**Abb. 16:** Histologische Giemsa-Präparate der Leber; linkes Bild: LPS Shock + Vehicle Gruppe; rechtes Bild: LPS Shock + C1-INH Gruppe; Vergrößerung: beide Bilder 100fach

#### d) Niere

Zum Zeitpunkt der Organentnahme konnten vermehrt Gewebeeinblutungen und nekrotische Areale vor allem in den Nieren der Tiere, die allein LPS erhielten, festgestellt werden. Doch auch die Tiere, denen neben dem Endotoxin C1-INH verabreicht wurde, zeigten zumindest vereinzelte Einblutungen. Die Nieren aus der SHAM Gruppe waren unauffällig. Mikroskopisch stellte sich bei den Präparaten aus der LPS Shock + Vehicle Gruppe eine verwaschenerere Organstruktur dar. Die Form der Glomeruli war gegenüber denen in anderen Versuchsgruppen ungleichmäßiger. Zusätzlich war die Bowman-Kapsel, welche die Glomeruli gleichmäßig umgibt, vermehrt in ihrem kontinuierlichen Verlauf unterbrochen. Auch das Lumen der Tubuli

zeigte sich unruhiger als in den LPS Shock + C1-INH/SHAM Gruppen. Die Tubuluszellen selbst mit grobkörnigem Zytoplasma ließen sich in den Medikamentengruppen wesentlich besser anfärben und stellten sich deutlich homogener dar (alles s. Abb. 17).



**Abb. 17:** Histologische Giemsa-Präparate der Niere; linkes Bild: LPS Shock + Vehicle Gruppe; rechtes Bild: LPS Shock + C1-INH Gruppe, Vergrößerung: beide Hauptbilder 200fach, beide kleinen Bilder 1000fach

#### 4.1.4 Proteinexpression

##### a) Effekte von C1-INH auf die Expression von VEGF

In den nach den Tierexperimenten entnommenen Organen zeigte sich in den Westernblot-Untersuchungen für die Niere bezüglich der Expression des Proteins VEGF eine signifikante Änderung zwischen den Tiergruppen, die allein das Toxin erhielten und den Tieren, die Toxin und Medikament ( $p \leq 0,01$ ) oder nur das Medikament ( $p \leq 0,001$ ) erhielten. Dabei stellt sich entsprechend in Abb. 18 und 19 für die LPS Shock + C1-INH Gruppe eine um ca. 50 % verminderte und für die SHAM Gruppe eine um ca. 75 % verminderte relative Intensität der Banden gegenüber der Vehicle Gruppe dar.

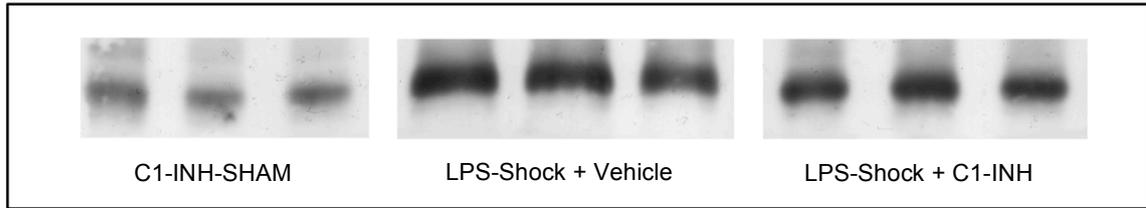


Abb. 18: Ausschnitt einer Westerblotanalyse für VEGF in der Niere

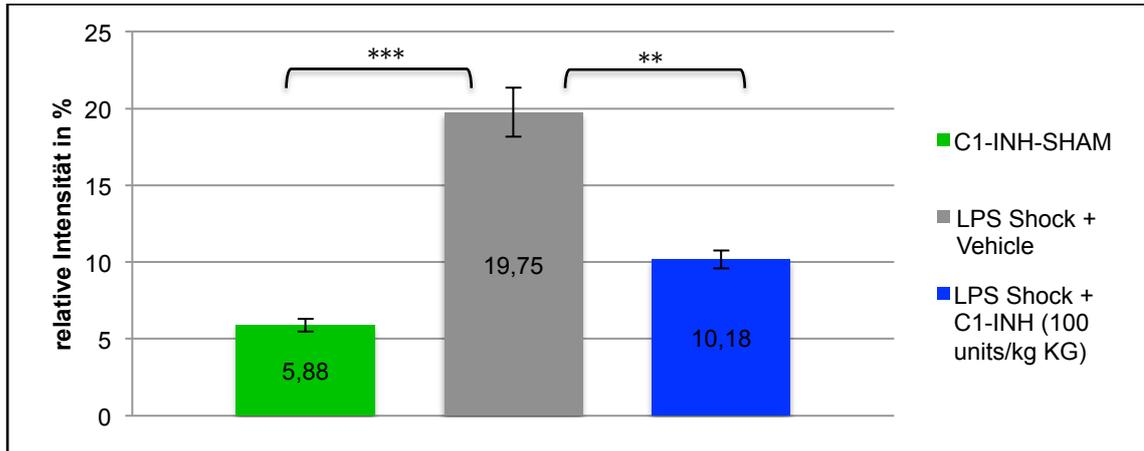


Abb. 19: relative Bandenintensität für die Expression von VEGF mit Standardfehler in der Niere für: C1-INH-SHAM, LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + C1-INH; \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$

b) Effekte von C1-INH auf die Expression von MFG-E8

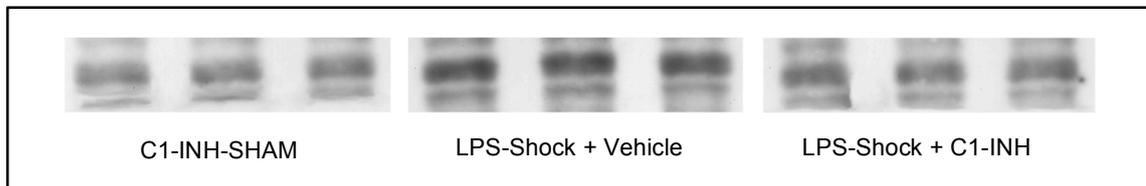


Abb. 20: Ausschnitt einer Westerblotanalyse für MFG-E8 in der Niere

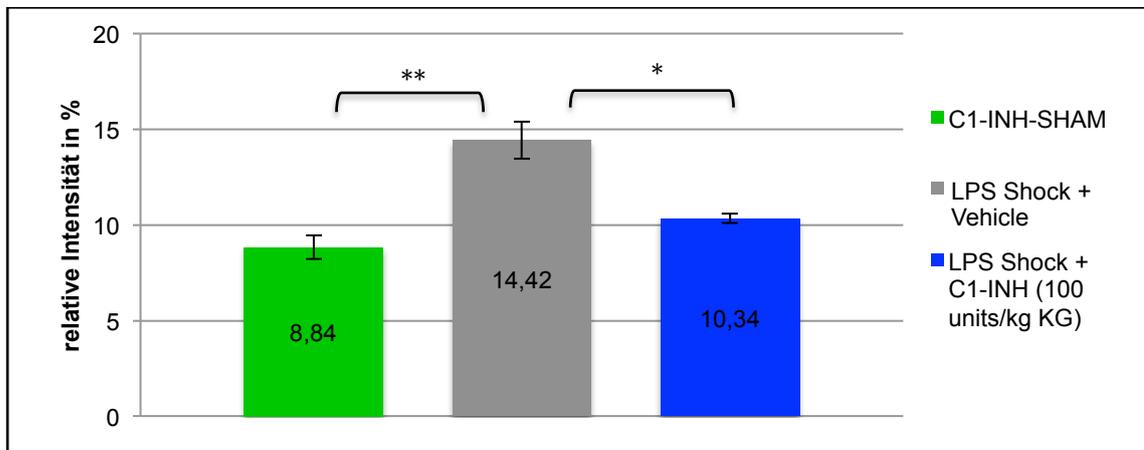
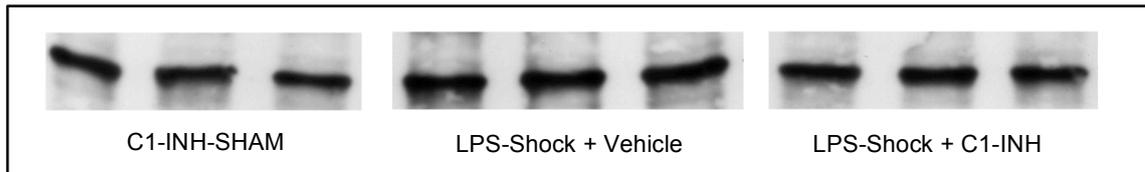


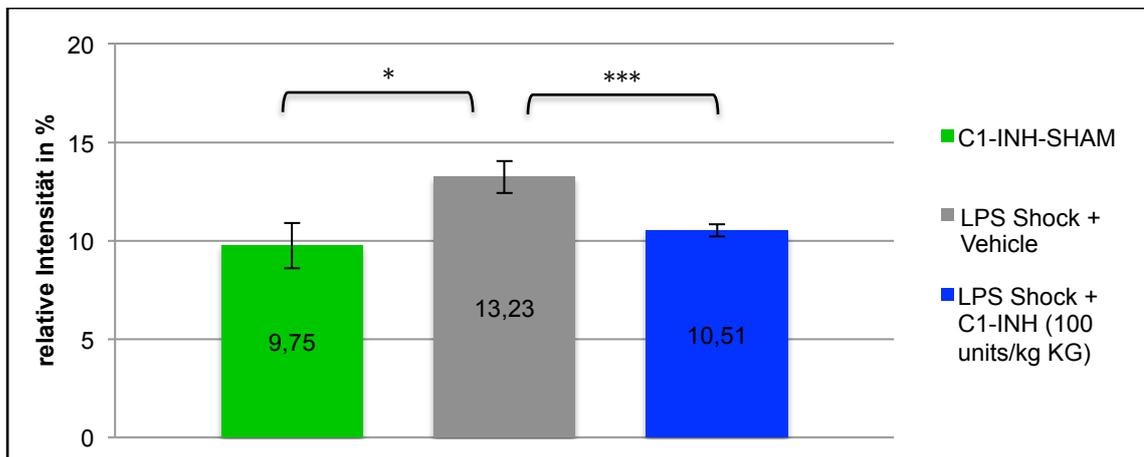
Abb. 21: relative Bandenintensität für die Expression von MFG-E8 mit Standardfehler in der Niere für: C1-INH-SHAM, LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + C1-INH; \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$

Bezüglich der Proteinexpression des Proteins MFG-E8 in der Niere ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den LPS Shock + Vehicle Tieren und den Tieren, die zusätzlich C1-INH ( $p \leq 0,05$ ) oder nur C1-INH ( $p \leq 0,01$ ) verabreicht bekamen. In der C1-INH-SHAM Gruppe lag die relative Bandenintensität fast 40 % unter der für die Vehicle Gruppe. In der LPS Shock + C1-INH Gruppe war sie um mehr als 25 % vermindert (s. Abb. 20 und 21).

**c) Effekte von C1-INH auf die Expression von  $\kappa B-\alpha$**



**Abb. 22:** Ausschnitt einer Westerblotanalyse für  $\kappa B-\alpha$  in der Niere



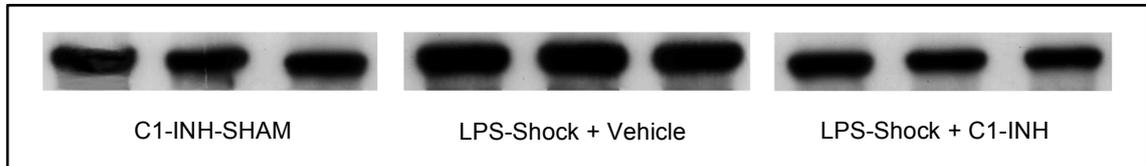
**Abb. 23:** relative Bandenintensität für Expression von  $\kappa B-\alpha$  mit Standardfehler in der Niere für: C1-INH-SHAM, LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + C1-INH; \* =  $p \leq 0,05$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$

In der Westernblot-Untersuchung für die Proteinexpression von  $\kappa B-\alpha$  in der Niere (s. Abb. 22 und 23) stellten sich signifikante Unterschiede zwischen der LPS Shock + Vehicle Gruppe und den Gruppen, die entweder nur C1-INH ( $p \leq 0,05$ ) oder C1-INH und Endotoxin ( $p \leq 0,001$ ) erhielten, dar. Hier konnte eine Verminderung der relativen Bandenintensität von 26 % für die SHAM Gruppe und von 21 % für die Medikamenten Gruppe im Vergleich zur LPS Shock + Vehicle Gruppe festgestellt werden.

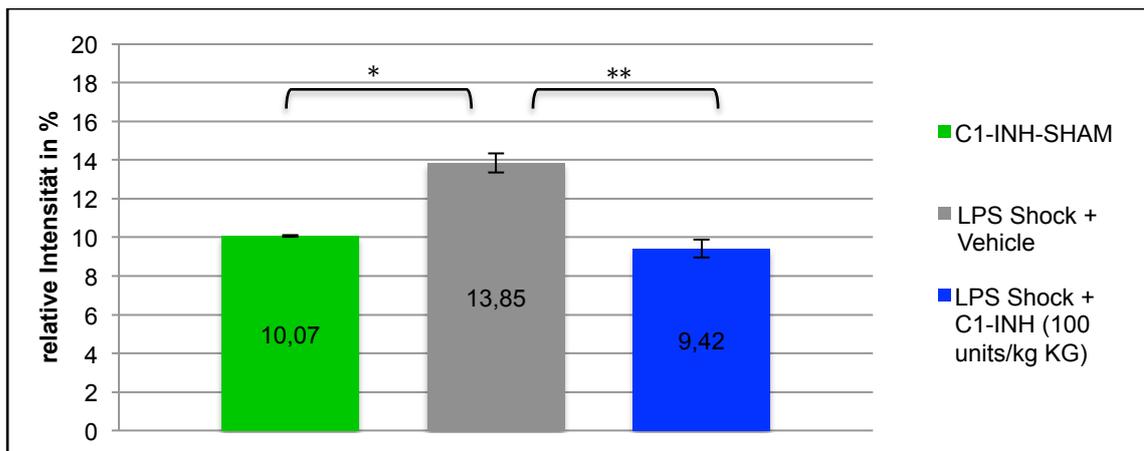
**d) Effekte von C1-INH auf die Expression von HSP70**

Bei den Tieren, die nur das Toxin erhielten, kam es zu einer signifikant höheren Proteinexpression von HSP70 in der Niere verglichen mit den Tieren, denen nur das Medikament C1-INH verabreicht wurde ( $p \leq 0,05$ ). Auch im Vergleich mit der LPS

Shock + C1-INH Gruppe, war die Bandenintensität signifikant stärker ( $p \leq 0,01$ ). Die Gabe von C1-INH im septischen Schock führte dabei im Vergleich zu einer Verminderung der Expression um mehr als 30 % (s. Abb. 24 und 25).



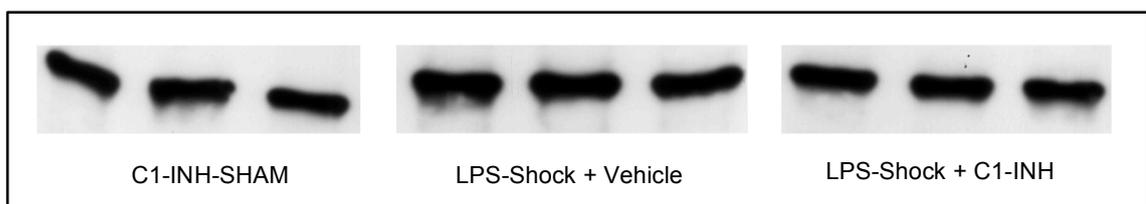
**Abb. 24:** Ausschnitt einer Westerblotanalyse für HSP70 in der Niere



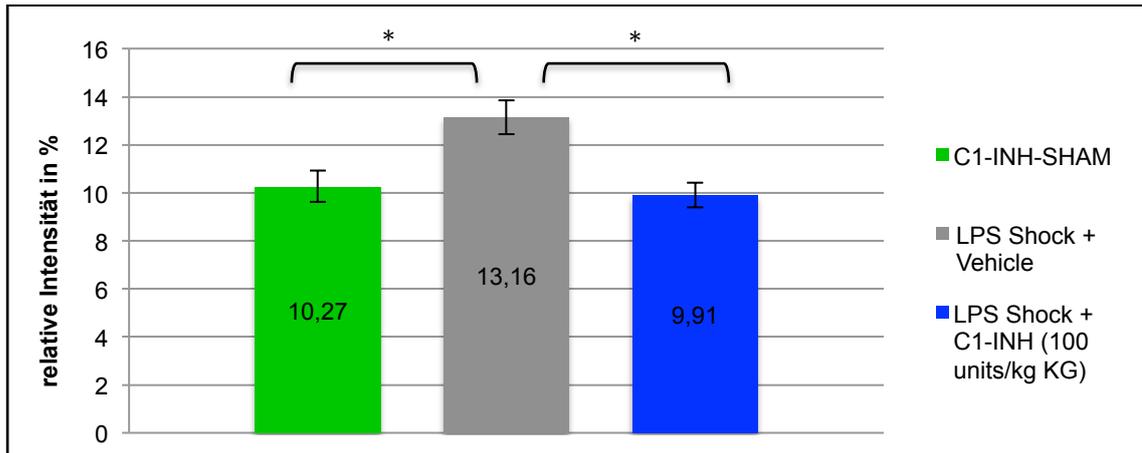
**Abb. 25:** relative Bandenintensität für die Expression von HSP70 mit Standardfehler in der Niere für: C1-INH-SHAM, LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + C1-INH; \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$

**e) Effekte von C1-INH auf die Expression von p38**

Die relative Bandenintensität in der Westernblot-Untersuchung für p38 im Herzen war für die Tiere in der LPS Shock + Vehicle Gruppe signifikant gegenüber den Tieren erhöht, die allein C1-INH ( $p \leq 0,05$ ) oder C1-INH und LPS ( $p \leq 0,05$ ) erhielten. Im Gegensatz zur Vehicle Gruppe war die relative Bandenintensität in der LPS Shock + C1-INH Gruppe um annähernd 25 % reduziert, in der SHAM Gruppe um mehr als 20 % (s. Abb. 26 und 27).



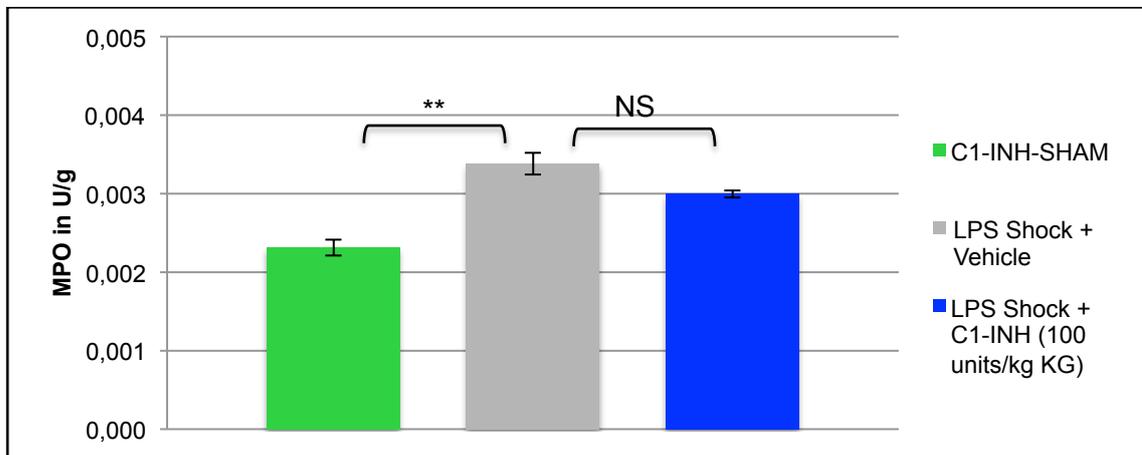
**Abb. 26:** Ausschnitt einer Westerblotanalyse für p38 im Herzen



**Abb. 27:** relative Bandenintensität für die Expression von p38 mit Standardfehler im Herzen für: C1-INH-SHAM, LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + C1-INH; \* =  $p \leq 0,05$

#### 4.1.5 Myeloperoxidase-Aktivität

Die Myeloperoxidase-Aktivität diente in dieser Arbeit als Maß für die Leukozytenakkumulation und damit der Entzündung im Gewebe. Bei dieser Untersuchung zeigten sich vor allem bei den Organen Herz (s. Abb. 28), Lunge und Niere signifikant niedrigere Werte der C1-INH-SHAM Gruppe gegenüber der LPS Shock + Vehicle Gruppe ( $p \leq 0,01$ ). Im Vergleich zu den Tieren, die neben LPS noch C1-INH erhielten, war bei den Vehicle Tieren eine etwas höhere MPO-Aktivität ( $p \geq 0,05$ ) zu messen.

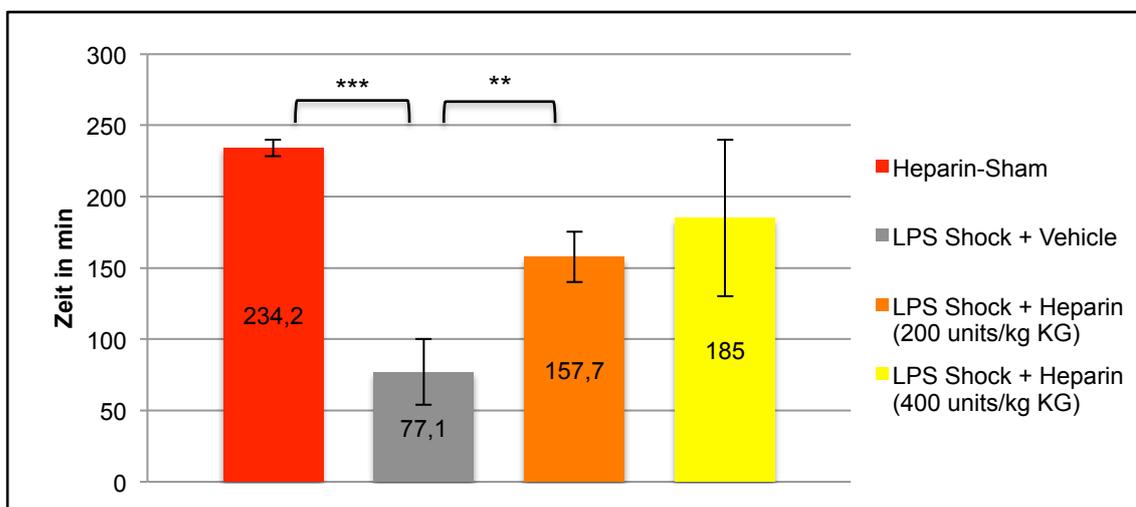


**Abb. 28:** MPO-Aktivität in U/g mit Standardfehler im Herzen für: C1-INH-SHAM, LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + C1-INH; \*\* =  $p \leq 0,01$ , NS = nicht signifikant

## 4.2 Effekte von Heparin im septischen Schock

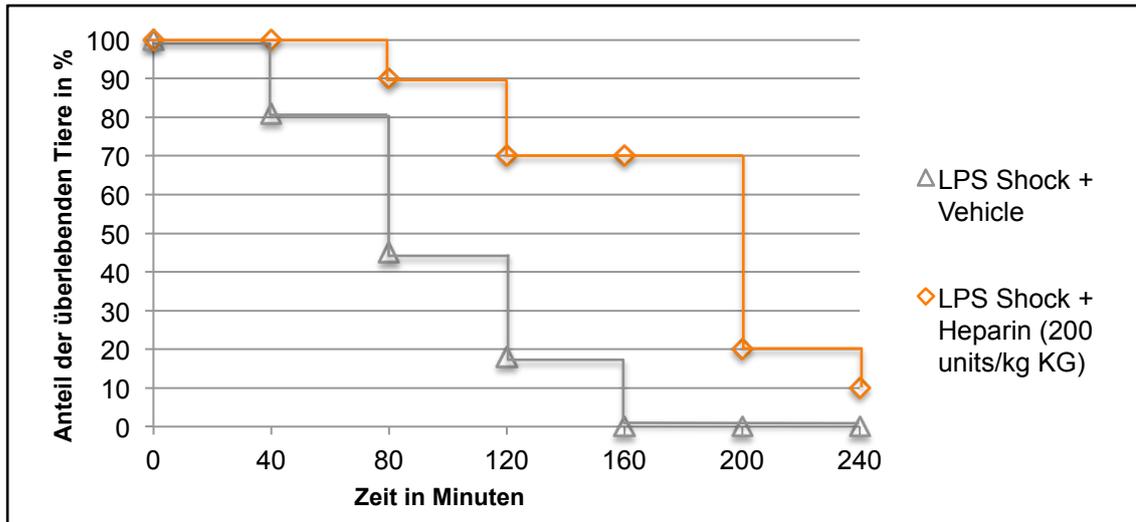
### 4.2.1 Überlebenszeit

Die Überlebenszeit wurde ab der Toxingabe gemessen. Dieser ging eine 15 bis 20 minütige Stabilisierungsphase mit der Heparin-Injektion voraus. Dabei überlebten die Versuchstiere der Heparin-SHAM Gruppe mit 234 min nahezu über den gesamten Versuchszeitraum (s. Abb. 29). Entgegen der LPS Shock + Vehicle Gruppe war dieses Ergebnis signifikant ( $p \leq 0,001$ ). Die Tiere, die neben dem Endotoxin zusätzlich Heparin erhielten, zeigten ein signifikant längeres mittleres Überleben (157,7 min) verglichen mit den Tieren, die nur das Toxin erhielten ( $p \leq 0,01$ ). Ein stärkerer Effekt auf das Überleben stellte sich in der Versuchsgruppe mit der doppelten Heparin-Konzentration (400 units/kg KG) dar. Hier überlebten die Tiere mit 185 min ca. 2,3 mal länger als die Tiere der LPS Shock + Vehicle Gruppe und damit durchschnittlich fast 30 min länger als die Tiere mit der einfachen Medikamentenkonzentration. Im Weiteren erfolgt die Auswertung der Ergebnisse neben der LPS Shock + Vehicle- und Heparin-SHAM Gruppe nur für die Tiere in der LPS Shock + Heparin Gruppe, welche die Standardkonzentration von 200 units/kg KG erhielten.



**Abb. 29:** Darstellung der Überlebenszeiten in Minuten mit Standardfehler für: Heparin-SHAM, LPS Shock + Vehicle, LPS-Shock + Heparin (200 units/kg KG), LPS Shock + Heparin (400 units/kg KG); \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$

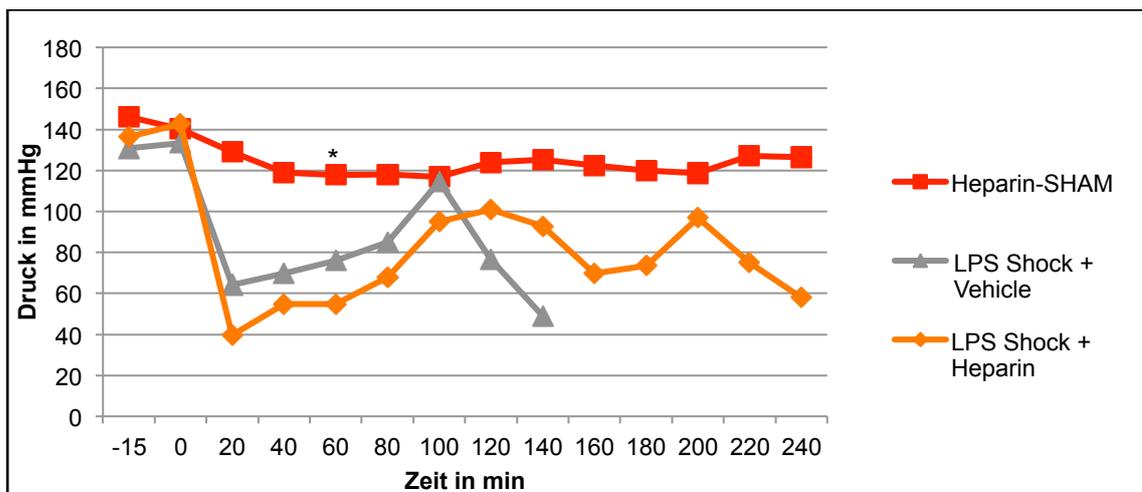
Vergleicht man die prozentualen Anteile der überlebenden Tiere der Versuchsgruppen zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten (s. Abb. 30), so zeigte sich in der LPS Shock + Vehicle Gruppe, dass nach 80 min bereits weniger als 50 % und nach 120 min weniger als 20 % der Tieren lebten. In der LPS Shock + Heparin Gruppe waren nach 2 h noch Überlebensraten von 70 % zu beobachten. Das Versuchsende von 240 min wurde allein von einem Tier der LPS Shock + Heparin Gruppe erreicht.



**Abb. 30:** Darstellung der überlebenden Tiere in % für: LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + Heparin (200 units/kg KG)

### 4.2.2 Hämodynamische Parameter

#### a) Mittlerer arterieller Blutdruck

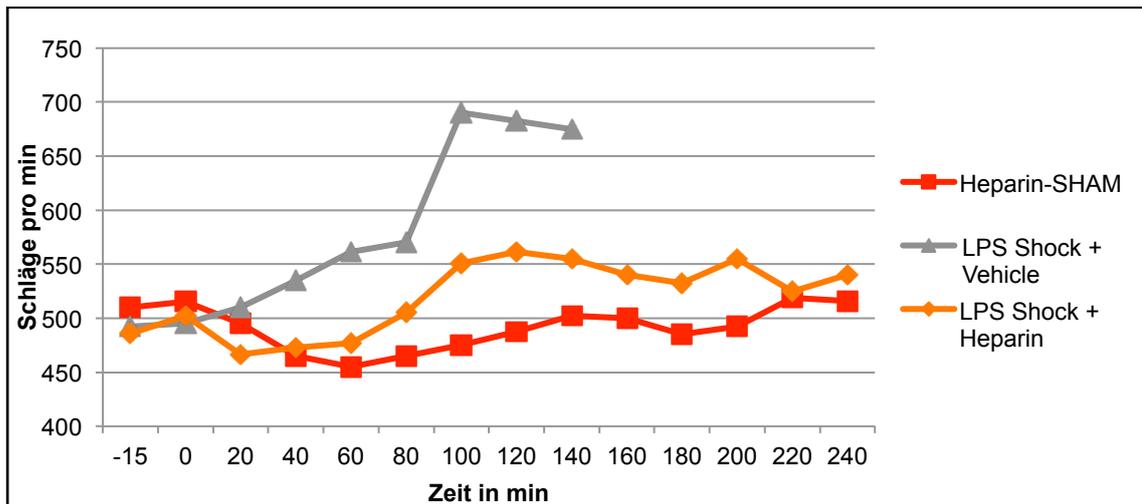


**Abb. 31:** Darstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks in mmHg für: Heparin-SHAM Gruppe, LPS Shock + Vehicle Gruppe, LPS Shock + Heparin Gruppe; \* = p-Wert im Vergleich zur Vehicle Gruppe  $\leq 0,05$

Der in regelmäßigen Abständen entsprechend des Versuchsprotokolls gemessene mittlere arterielle Blutdruck wies bei den Tieren, die allein mit Heparin behandelt wurden, über den gesamten Versuchszeitraum einen Schwankungsbereich von 120 bis 140 mmHg auf (s. Abb. 31). Nach einer Stunde war ein signifikanter Unterschied zur LPS Shock + Vehicle Gruppe festzustellen ( $p \leq 0,05$ ). Bei der LPS Shock + Heparin Gruppe kam es nach Toxingabe zu einem stark ausgeprägten Blutdruckabfall. Es wurden dabei Werte von ca. 40 mmHg gemessen, die damit durchschnittlich 25 mmHg niedriger lagen als in den Gruppen LPS Shock + C1-INH und LPS Shock +

Vehicle. Nachfolgend kam es zum Anstieg des mittleren arteriellen Drucks mit Spitzenwerten um 100 mmHg bei 120 min und 200 min. Dieser Anstieg fiel allerdings schwächer aus als in den beiden anderen LPS Shock Gruppen. Weitere Druckabfälle auf bis zu 58 mmHg konnten bei 160 min und 240 min beobachtet werden. Letzterer beruht allerdings nur auf den Werten eines Versuchstieres.

### b) Herzfrequenz



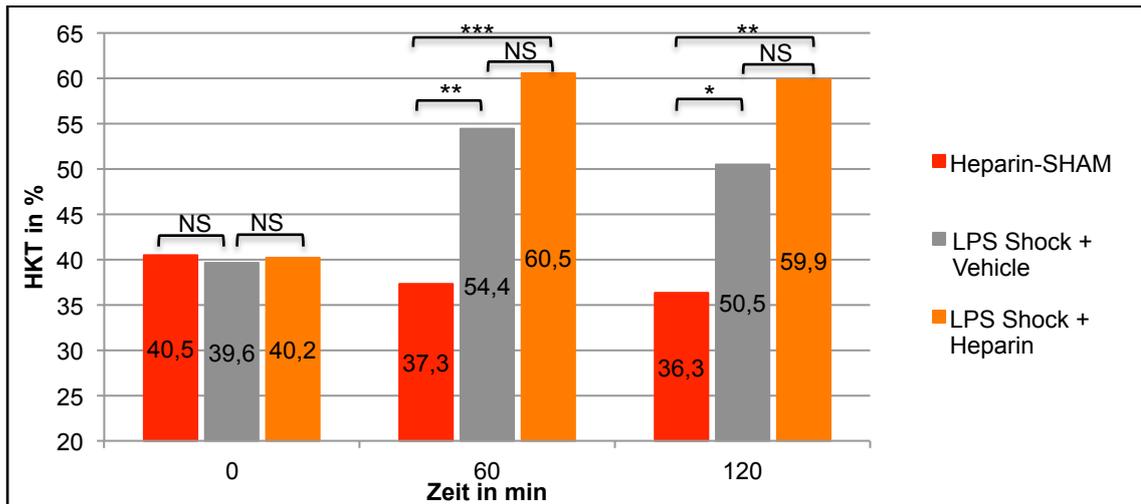
**Abb. 32:** Darstellung der Herzfrequenz in Schlägen pro Minute für: Heparin-SHAM Gruppe, LPS Shock + Vehicle Gruppe, LPS Shock + Heparin Gruppe

Die Herzfrequenz wurde nach der Injektion des LPS-Toxins alle 20 min erfasst (s. Abb. 32). Beginnend bei Herzfrequenzen um 515 S/min, zeigte sich in der Heparin-SHAM Gruppe ein relativ konstanter Verlauf mit Werten zwischen 450 S/min und 550 S/min während des gesamten vierstündigen Versuchs. Bei den Tieren, die neben Heparin zusätzlich das Endotoxin erhielten, kam es unmittelbar nach LPS-Applikation zu einem leichten Abfall der Herzfrequenz um ca. 30 S/min bis auf durchschnittlich 466 S/min nach 20 min, mit anschließendem, stetigen Anstieg auf maximal 561 S/min nach 120 min. Die in der Folge bis zum Beobachtungsendpunkt gemessenen Herzfrequenzen ergaben mittlere Werte um 540 S/min. Damit fiel im Gegensatz zu den anderen LPS Shock Gruppen nach der Toxingabe die Herzfrequenz ab und stieg im weiteren Verlauf auch weniger stark wieder an.

### c) Hämatokrit

Der Hämatokrit diente in diesem Versuch als Parameter für eine Barrierestörung des Endothels. Dieser wurde während des gesamten Versuchszeitraums stündlich gemessen (s. Abb. 33). In der Heparin-SHAM Gruppe lag er relativ konstant zwischen 35 % und 41 %. Dabei unterschied er sich zum Zeitpunkt 60 min ( $p \leq 0,01$ ) und zum Zeitpunkt 120 min ( $p \leq 0,05$ ) signifikant von den Werten der Tiere aus der LPS Shock +

Vehicle Gruppe. In der LPS Shock + Heparin Gruppe stieg der Hämatokritwert nach der Verabreichung von LPS nicht nur stärker an (um absolut 6 %), sondern lag auch im gesamten Versuchszeitraum über der Tiergruppe, die allein das Toxin erhielt. Im Verlauf sank der Anteil der zellulären Bestandteile im Blut bei diesen Tieren auf 56 % zum Beobachtungsendzeitpunkt bei 240 min. Wie in Abb. 33 zu sehen, kam es nach 1 h ( $p \leq 0,01$ ) und nach 2 h ( $p \leq 0,001$ ) zu signifikanten Unterschieden im Vergleich zur SHAM Gruppe.



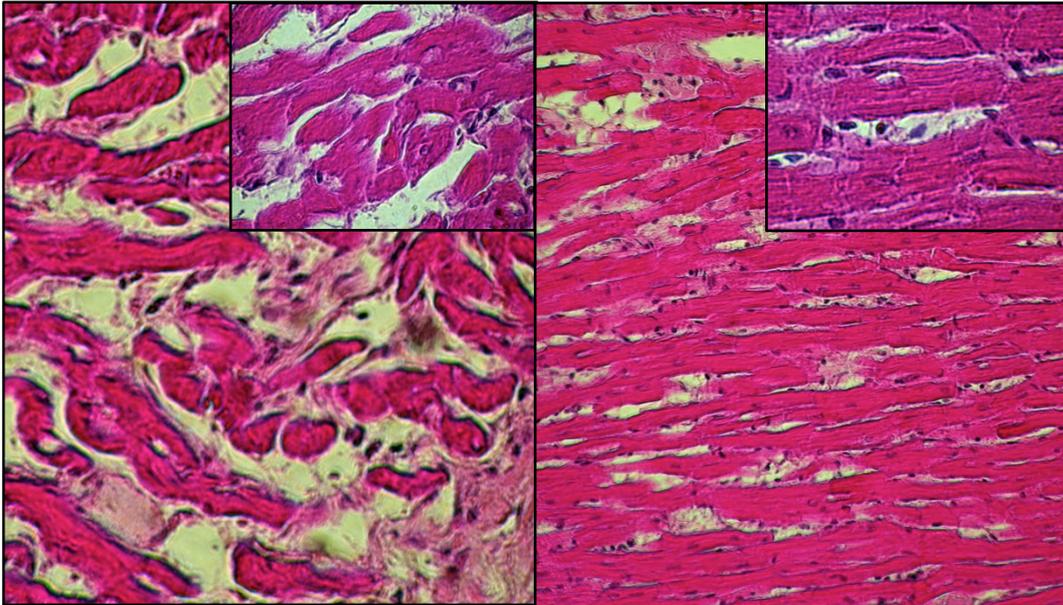
**Abb. 33:** Darstellung der Hämatokritwerte in % für: Heparin-SHAM Gruppe, LPS Shock + Vehicle Gruppe, LPS Shock + Heparin Gruppe; \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , NS = nicht signifikant

### 4.2.3 Histologie

Für die histologischen Untersuchungen wurden Schnitte in den Färbungen Hämatoxylin-Eosin (HE) und Giemsa für die Organe Herz, Lunge, Leber und Niere angefertigt.

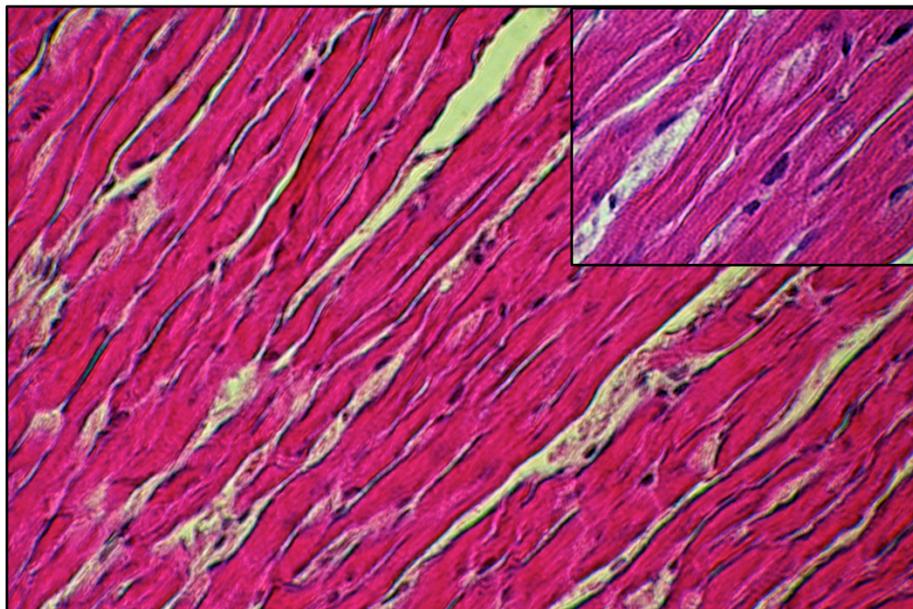
#### a) Herz

Makroskopisch wiesen die Präparate aller drei Versuchsgruppen nur geringe Unterschiede auf. In der Vehicle Gruppe war jedoch eine vermehrte Ventrikeldilatation auffällig. Bei Begutachtung der mikroskopischen Schnitte zeigten sich deutlichere Abweichungen. Während bei den SHAM Tieren bezüglich Organstruktur und Zellintegrität keine Auffälligkeiten erkennbar waren und auch bei der Medikamenten-Gruppe die Struktur des Herzens weitestgehend erhalten war (s. Abb. 34 und 35), präsentierten sich in der LPS Shock + Vehicle Gruppe größere Areale mit einem Strukturverlust in Form von vergrößerten Zellzwischenräumen und ungleichmäßigen Zellformen. Die Zellstruktur stellte sich in den anderen beiden Versuchsgruppen besser



**Abb. 34:** Histologische HE-Präparate des Herzens; linke Bilder: LPS Shock + Vehicle Gruppe, Vergrößerung: Hauptbild 200fach, kleines Bild 400fach; rechte Bilder: LPS Shock + Heparin, Vergrößerung: Hauptbild 100fach, kleines Bild 400fach

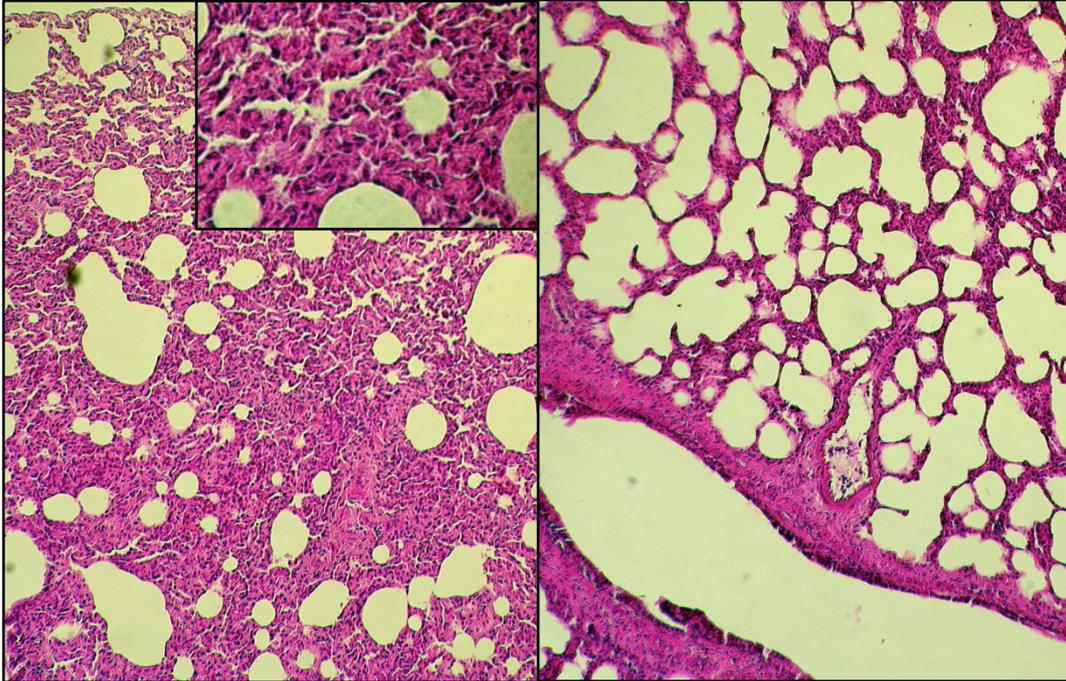
dar. In der Vehicle Gruppe und der LPS Shock + Heparin Gruppe waren in den Giemsa-Färbungen vermehrt Zellkerne zwischen den Myozyten zu sehen, was Hinweise auf eine stärkere Entzündungsreaktion gab. Der bessere Erhalt von intrazellulären Zellkernen in ihren fibrillenfreien Höfen und die vermehrte Darstellung von Glanzstreifen deutete auf einen besseren Funktionserhalt bei den Tieren, die neben dem Endotoxin noch Heparin erhielten, hin.



**Abb. 35:** Histologische HE-Präparate des Herzens der Heparin-SHAM Gruppe; Vergrößerung: Hauptbild 200fach, kleines Bild 400fach

**b) Lunge**

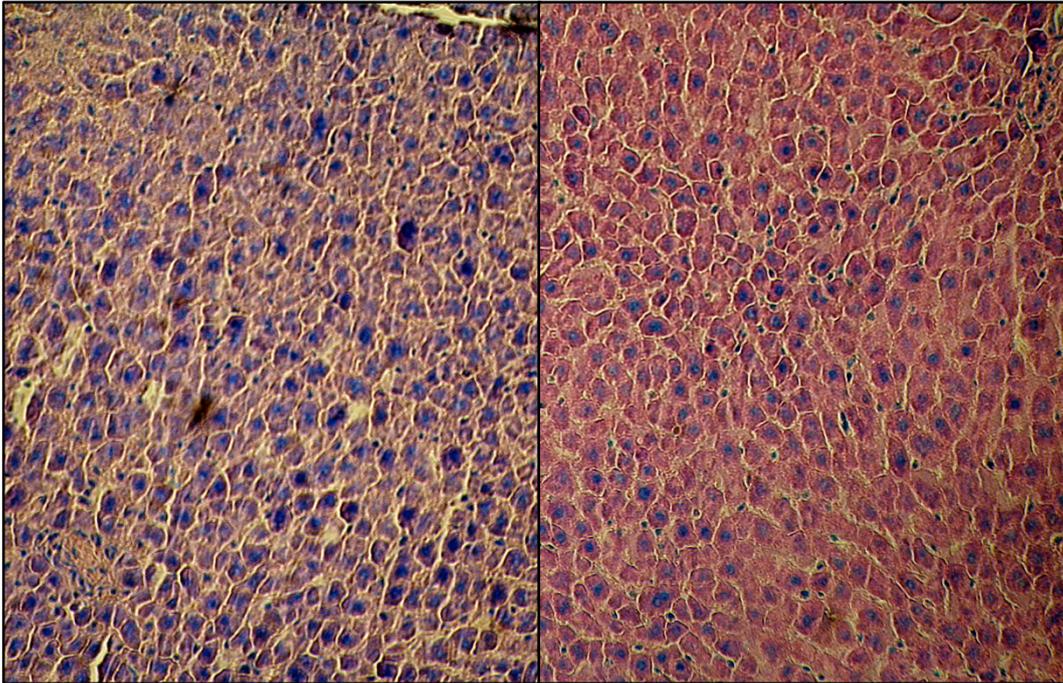
Beim makroskopischen Vergleich der Gewebe in situ zeigten sich bei allen Gruppen nur wenige Unterschiede. In der mikroskopischen Betrachtung waren jedoch deutliche Entzündungszeichen in der LPS Shock + Vehicle Gruppe erkennbar. Die Alveolarwände stellten sich verdickt dar und es war eine vermehrte lymphozelluläre Infiltration erkennbar (s. Abb. 36). In den Medikamenten Gruppen konnten vergleichbare Veränderungen nicht festgestellt werden.



**Abb. 36:** Histologische HE-Präparate der Lunge; linke Bilder: LPS Shock + Vehicle Gruppe; rechtes Bild: LPS Shock + Heparin Gruppe; Vergrößerung: beide Hauptbilder 100fach, kleines Bild 400fach

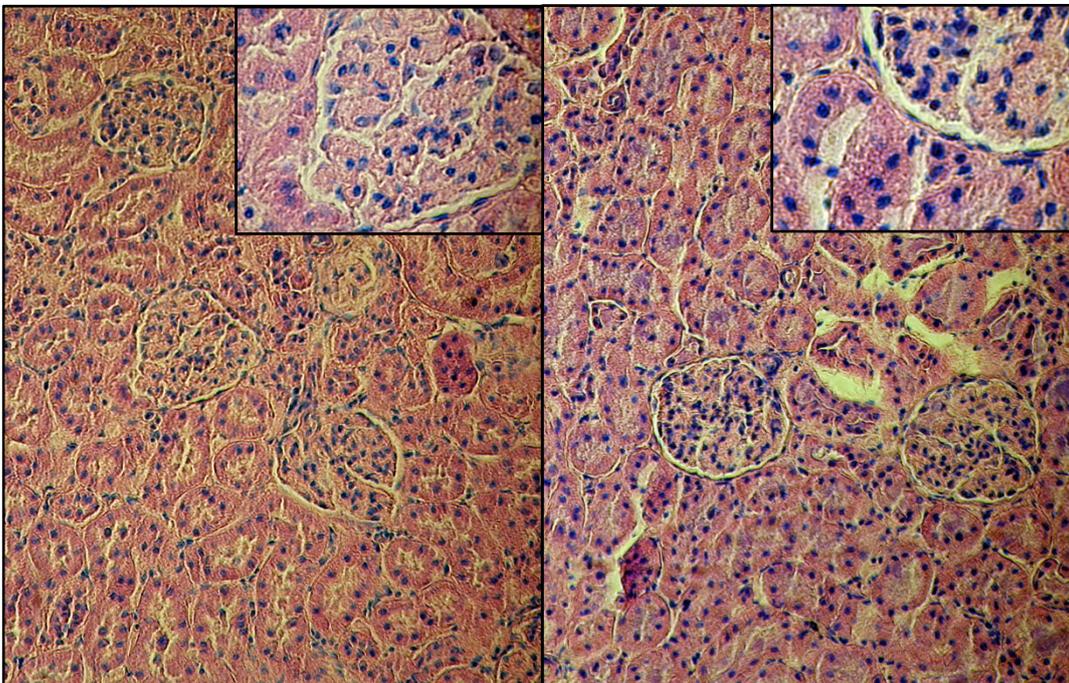
**c) Leber**

Veränderungen zeigten sich in der Leber vor allem bei der makroskopischen Betrachtung. Hierbei kam es sowohl bei den LPS Shock + Vehicle Tieren als auch bei den LPS Shock + Heparin Tieren zu Einblutungen und Gewebnekrosen. Die Gewebestruktur in den SHAM Gruppen stellte sich bei Organentnahme unauffällig dar. Mikroskopisch zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den Leberpräparaten der Vehicle Gruppe und denen der Medikamenten Gruppe. Bei Beiden war es im Vergleich zu den SHAM Tieren schwierig, die Organisationsstruktur mit den Zentralvenen und den darauf zulaufenden Sinusoiden zu erkennen (s. Abb. 37).



**Abb. 37:** Histologische Giemsa-Präparate der Leber; linkes Bild: LPS Shock + Vehicle Gruppe; rechtes Bild: LPS Shock + Heparin Gruppe; Vergrößerung: beide Bilder 100fach

#### d) Niere

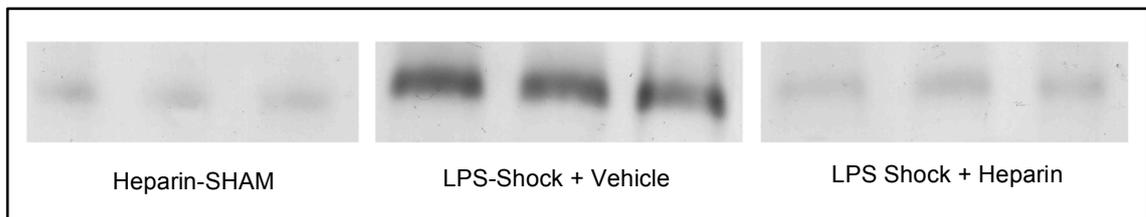


**Abb. 38:** Histologische Giemsa-Präparate der Niere; linkes Bild: LPS Shock + Vehicle Gruppe; rechtes Bild: LPS Shock + Heparin Gruppe; Vergrößerung: beide Hauptbilder 200fach, beide kleinen Bilder 1000fach

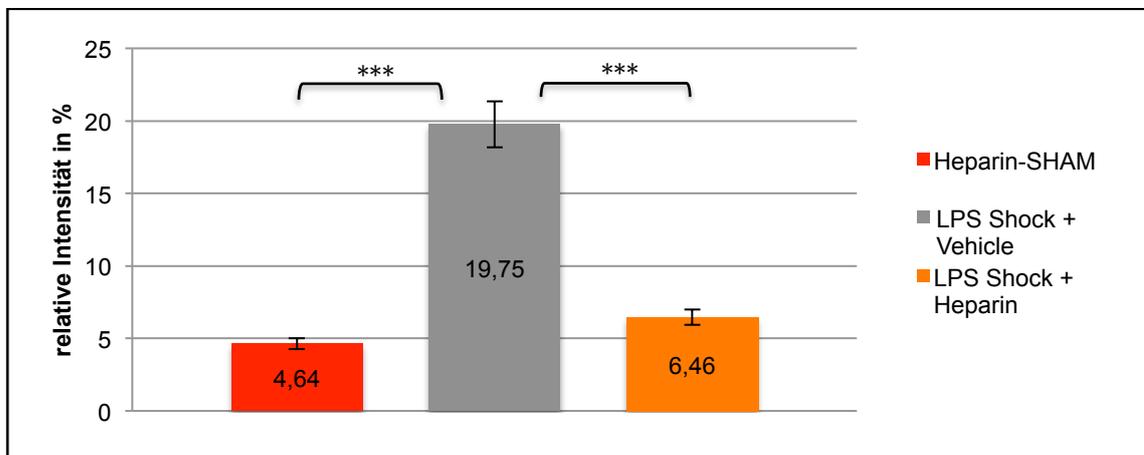
Bei der Betrachtung der Nieren in situ stellten sich vermehrte Gewebseinblutungen vor allem in der LPS Shock + Vehicle Gruppe dar. Aber auch bei den Tieren, die zusätzlich mit Heparin behandelt wurden, kam es zu Einblutungen. Die Organe der SHAM Gruppe zeigten sich sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch unauffällig. Bei Betrachtung der histologischen Präparate der anderen beiden Versuchsgruppen waren neben vermehrten Blutungszeichen in der Vehicle Gruppe eine bessere Integrität der Tubuli und Glomeruli in der LPS Shock + Heparin Gruppe erkennbar. Dabei ließen sich deutlich mehr Zellkerne in den Tubuluszellen anfärben und der Bowman-Kapselraum stellte sich gleichmäßiger dar (s. Abb. 38).

#### 4.2.4 Proteinexpression

##### a) Effekte von Heparin auf die Expression von VEGF



**Abb. 39:** Ausschnitt einer Westerblotanalyse für VEGF in der Niere

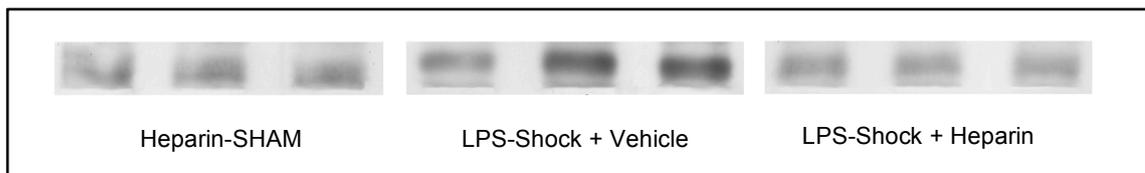


**Abb. 40:** relative Bandenintensität für die Expression von VEGF mit Standardfehler in der Niere für: Heparin-SHAM, LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + Heparin; \*\*\* =  $p \leq 0,001$

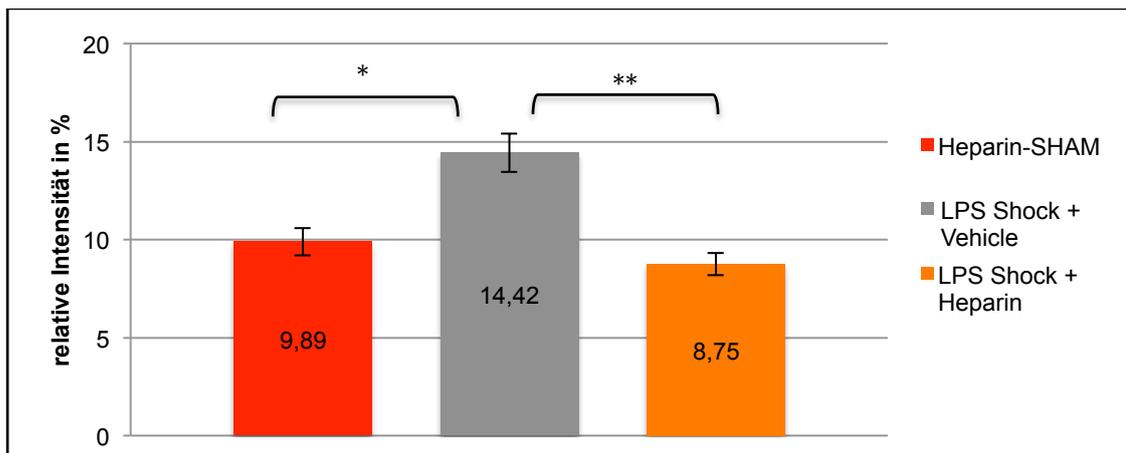
In den nach den Tierexperimenten entnommenen Organen zeigte sich in der Niere für den Vascular-Endothelial-Growth-Factor eine hoch signifikante Expressionsänderung zwischen den Tiergruppen, die allein das Toxin erhielten und den Tieren, die Toxin und Medikament ( $p \leq 0,001$ ) oder nur das Medikament ( $p \leq 0,001$ ) erhielten. Dabei war die relative Bandenintensität für VEGF in der SHAM Gruppe um über 75 % und in der LPS Shock + Heparin Gruppe um annähernd 70 % niedriger als in der Vehicle Gruppe.

**b) Effekte von Heparin auf die Expression von MFG-E8**

In den Westernblot-Untersuchungen der Niere bezüglich der Expression von MFG-E8, auch als Lactadherin bezeichnet, ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen LPS Shock + Vehicle Tieren und den Tieren, die zusätzlich Heparin ( $p \leq 0,01$ ) oder die nur Heparin ( $p \leq 0,05$ ) verabreicht bekamen. Im Vergleich der beiden Heparinversuchsgruppen mit der LPS-Shock + Vehicle Versuchsgruppe ergaben sich eine Expressionsminderung von MFG-E8 für die SHAM-Tiere von über 30 % und für die Tiere, die vor dem Endotoxin Heparin erhielten von knapp 40 % (s. Abb. 41 und 42).



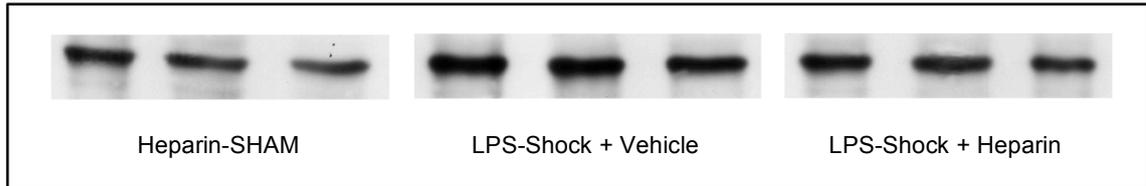
**Abb. 41:** Ausschnitt einer Westerblotanalyse für MFG-E8 in der Niere



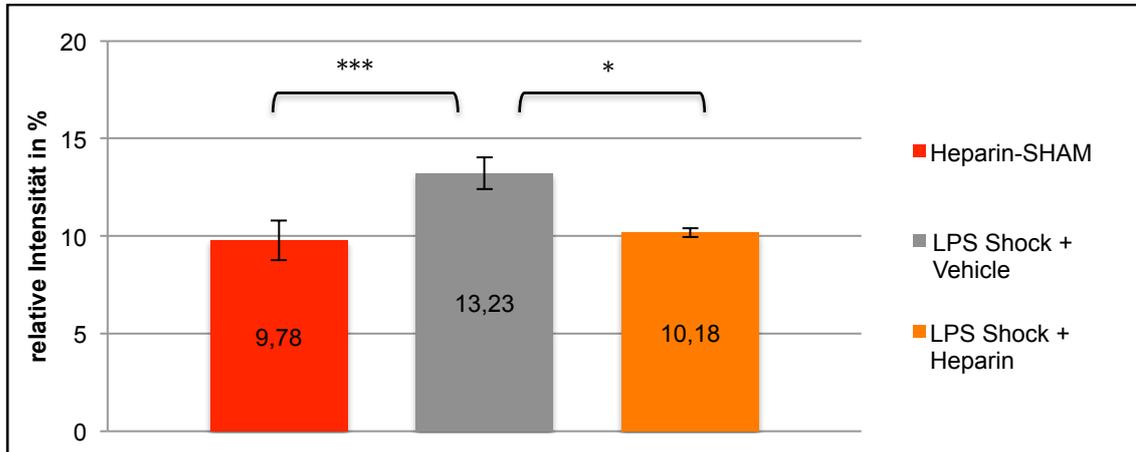
**Abb. 42:** relative Bandenintensität für die Expression von MFG-E8 mit Standardfehler in der Niere für: Heparin-SHAM, LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + Heparin; \* =  $p \leq 0,05$ , \*\* =  $p \leq 0,01$

**c) Effekte von Heparin auf die Expression von IκB-α**

In den Untersuchungen der Niere bezüglich der Expression des Proteins IκB-α stellten sich signifikante Unterschiede zwischen der LPS Shock + Vehicle Gruppe und den Gruppen, die entweder Heparin ( $p \leq 0,001$ ) oder Heparin und Endotoxin ( $p \leq 0,01$ ) erhielten, dar. Dabei kam es zu einer Verminderung der Expression von 26 % für SHAM Gruppe und 23 % für die LPS Shock + Heparin Gruppe gegenüber der Vehicle Gruppe (s Abb. 43 und 44).

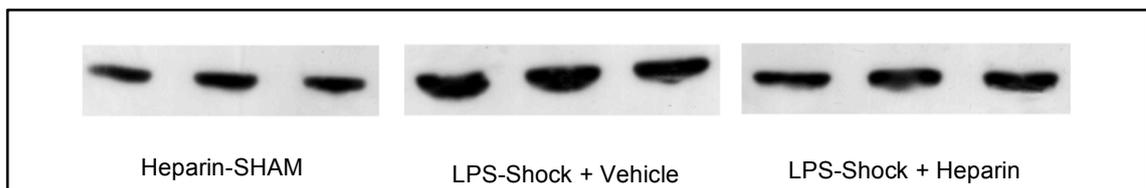


**Abb. 43:** Ausschnitt einer Westerblotanalyse für IκB-α in der Niere

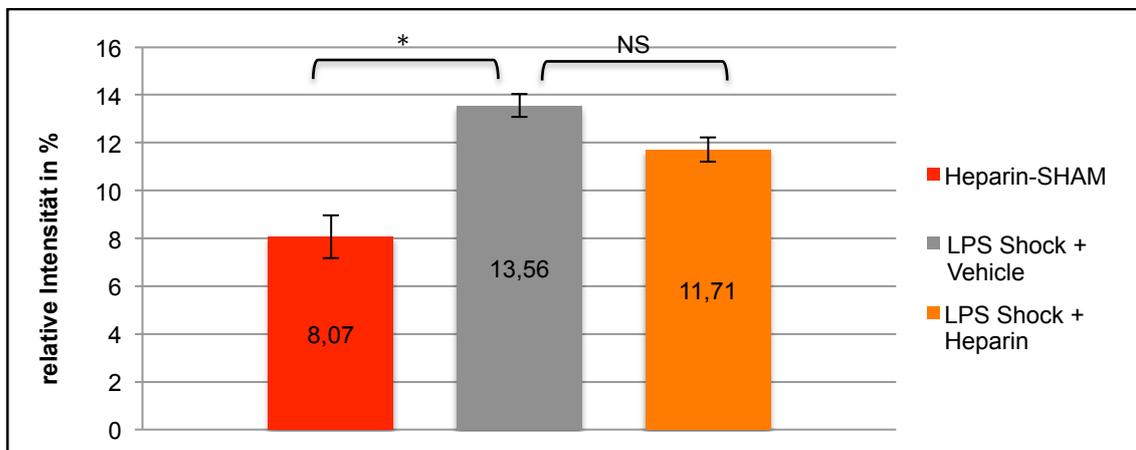


**Abb. 44:** relative Bandenintensität für Expression von IκB-α mit Standardfehler in der Niere für: Heparin-SHAM, LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + Heparin; \* =  $p \leq 0,05$ , \*\*\* =  $p \leq 0,001$

**d) Effekte von Heparin auf die Expression von p38**



**Abb. 45:** Ausschnitt einer Westerblotanalyse für p38 in der Leber



**Abb. 46:** relative Bandenintensität für die Expression von p38 mit Standardfehler in der Leber für: Heparin-SHAM, LPS Shock + Vehicle, LPS Shock + Heparin; \* =  $p \leq 0,05$ , NS = nicht signifikant

Für die Westernblot-Analyse der Leber bezüglich des Proteins p38 (s. Abb. 45 und 46) zeigte sich eine Verminderung der Expression von knapp 14 % für die LPS Shock + Heparin Gruppe gegenüber der LPS Shock + Vehicle Gruppe ( $p \geq 0,05$ ). Die relative Bandenintensität für die Heparin-SHAM Gruppe war gegenüber der Vehicle Gruppe um 40 % reduziert ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.2.5 Myeloperoxidase-Aktivität

Die Myeloperoxidase-Aktivität diente in dieser Arbeit als Maß für die Leukozytenakkumulation und damit der Entzündung im Gewebe (s. Tab. 9). Bei dieser Untersuchung zeigte sich in allen Geweben (Herz, Lunge, Leber, Niere) eine höhere MPO-Aktivität der LPS Shock + Heparin Tiere gegenüber den Tieren der LPS Shock + Vehicle Gruppe. Für die Organe Herz ( $p \leq 0,01$ ) und Lunge ( $p \leq 0,01$ ) war diese Erhöhung statistisch signifikant.

**Tab. 9:** Übersicht über die MPO-Aktivität (in U/g) für die beiden Versuchsgruppen LPS Shock + Vehicle und LPS Shock + Heparin in den entsprechenden Organen; (\*\*) = p-Wert im Vergleich zur Vehicle Gruppe  $\leq 0,01$

	Herz	Lunge	Leber	Niere
<b>LPS Shock + Vehicle Gruppe (Aktivität in U/g)</b>	$3,38 * 10^{-3}$	$9,11 * 10^{-3}$	$6,0 * 10^{-3}$	$8,61 * 10^{-3}$
<b>LPS Shock + Heparin Gruppe (Aktivität in U/g)</b>	$4,81 * 10^{-3}$ (**)	$15,4 * 10^{-3}$ (**)	$8,09 * 10^{-3}$	$9,32 * 10^{-3}$

## 5. Diskussion

### 5.1 C1-INH

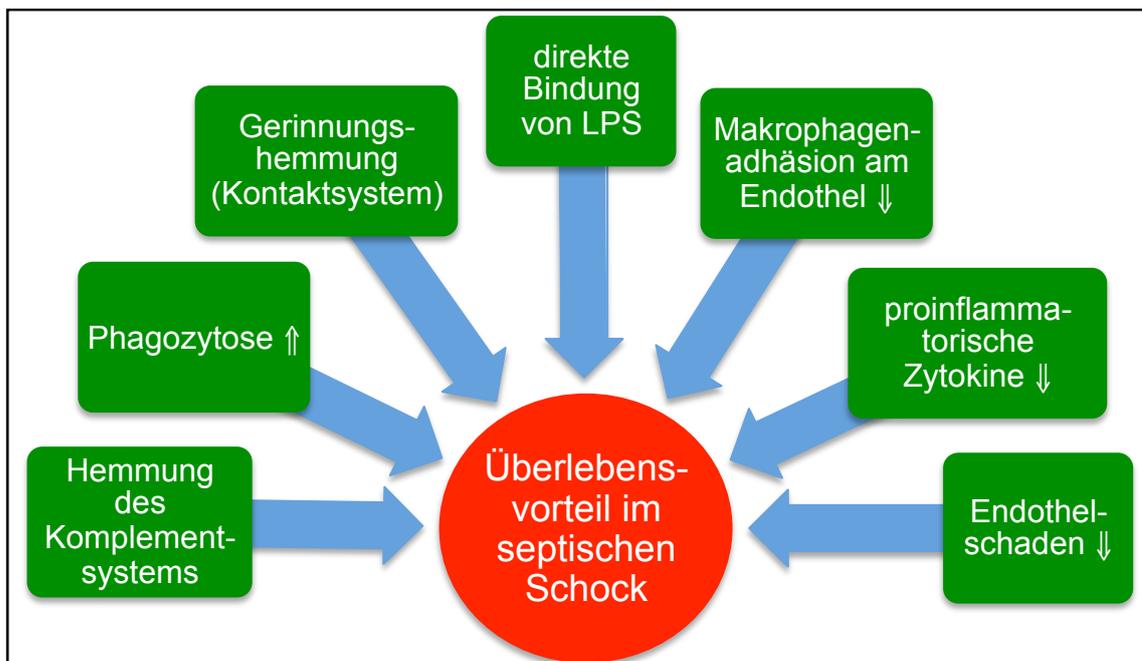
#### 5.1.1 Überlebenszeit im Endotoxinschock

Die Tiere der LPS Shock + C1-INH Gruppe lebten mit 153 min im Durchschnitt fast doppelt so lange wie die Tiere der Vehicle Gruppe. Die SHAM Gruppe zeigte mit einer mittleren Überlebenszeit von 240 min kein erhöhtes Letalitätsrisiko im Beobachtungszeitraum.

Aus diesen Ergebnissen wird ein signifikanter Überlebensvorteil und damit protektiver Effekt von C1-INH in der LPS Shock + C1-INH Tiere gegenüber den LPS Shock + Vehicle Tieren deutlich. Diese decken sich mit den Erkenntnissen von Liu D et al., die die Auswirkungen von C1-INH auf den septischen Schock an Mäusen untersuchten. Sie konnten dabei eine verbesserte Überlebensrate bei einmaliger C1-INH-Gabe (200 µg i.v.) von 0 % auf 50 % feststellen. Eine zusätzliche Steigerung konnte durch die Verwendung von inaktiviertem C1-INH erreicht werden, sodass neben den positiven Effekten der Serin-Protease wie die Hemmung des Komplementsystems und Gerinnungssystems sich auch eine direkte Bindung von Endotoxinen günstig auswirkte. In einer Folgearbeit wurde an Mäusen eine Sepsis mittels Caecumligation und anschließender Punktion induziert. Diese Methode ist an eine mögliche Sepsis-Entstehung beim Menschen angelehnt und führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Da sich beide letztgenannten Arbeiten bezüglich Tierart von dieser unterscheiden, ist die Vergleichbarkeit eingeschränkt. Doch auch Sonntag et al. konnten in ihren Versuchen am Rattenmodell einen protektiven Effekt bezüglich der Überlebenszeit von C1-INH im Endotoxinschock feststellen. Die in vielen experimentellen Studien oder kleineren Case reports (Fronhoffs et al., 2000) gezeigten Vorteile von C1-INH führten zu dessen Einsatz in einer randomisierten, kontrollierten Studie an Intensivpatienten mit Sepsis. Hierbei wurden über 40 Patienten mit bekannter Sepsis nach Randomisierung eine Gesamtdosis von 12000 units C1-INH i.v. verabreicht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte so die Sepsis-bezogene 28-Tage Mortalität von 45 % auf 8 % gesenkt werden. Es gibt jedoch auch Arbeiten (z.B.: Caliezi et al., 2002), die keinen Überlebensvorteil bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischen Schock zeigten. (Sonntag et al., 1999; Liu D et al., 2003; Liu D et al., 2007; Igonin et al., 2012)

In der Gesamtbetrachtung überwiegt die Datenlage bezüglich der positiven Effekte von C1-INH im septischen Schock (s. Abb. 47). Dies wird auch mit dieser Arbeit bestätigt, sodass ein Einsatz in der Therapie der schweren Sepsis bzw. des septischen Schocks

sinnvoll erscheint. Bei der Untersuchung des Einflusses der Medikamentendosis (doppelte Konzentration) auf das durchschnittliche Überleben der Tiere der LPS Shock + C1-INH Gruppe konnte ein positiver Effekt beobachtet werden. Aufgrund der geringen Anzahl der Tiere und eines relativ großen Standardfehlers bei den Überlebenszeiten sollten weitere Versuche speziell zu dosisabhängigen Unterschieden durchgeführt werden.



**Abb. 47:** Verschiedene Wirkungen von C1-INH, die möglicherweise zu einem Überlebensvorteil im septischen Schock führen

### 5.1.2 Hämodynamik im Endotoxinschock

Während der Blutdruck (MABP) und die Herzfrequenz (HF) im gesamten Versuchszeitraum in der C1-INH-SHAM Gruppe kaum Schwankungen aufwiesen, kam es bei beiden mit LPS behandelten Gruppen initial zu einem Blutdruckabfall von über 50 % und kompensatorisch zum Anstieg der Herzfrequenz. Im weiteren Verlauf erholten sich dabei die Tiere der LPS Shock + C1-INH Gruppe besser als die der Vehicle Gruppe.

Die hypotensive Wirkung von LPS wird an den oben genannten Ergebnissen deutlich. Weitere Arbeiten, wie die von Cuzzocrea et al., Liu CY et al. oder Matsui et al., welche für ihr Endotoxinschockmodell einen ähnlichen Versuchsaufbau nutzten, kamen zu vergleichbaren Ergebnissen. Auch Versuche an größeren Säugetieren wie Katzen (DeClue et al., 2009) oder Affen (Jansen et al., 1998) führten nach Endotoxinapplikation zur Hypotension. Methodische Unterschiede in diesen Arbeiten scheinen dabei nur auf die Stärke des Blutdruckabfalls einen Einfluss zu haben. (Matsui et al., 2001; Cuzzocrea et al., 2006; Liu CY et al., 2007)

Der Blutdruckabfall lässt sich dabei u.a. auf eine vermehrte Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) zurückführen, der zu einer relativen Hypovolämie führt. NO ist ein potenter Vasodilatator, der obligat in Endothelzellen (eNOS) gebildet wird. Physiologischerweise hemmt er die glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden oder wirkt gerinnungshemmend. Durch eine induzierbare NO-Synthase (iNOS) produziertes NO wirkt zusätzlich zytotoxisch, indem es Radikale bildet oder eisenhaltige Enzyme hemmt. Diese Eigenschaft machen sich Makrophagen zur Erregerabwehr zunutze. Im Rahmen einer Sepsis kommt es jedoch durch die vermehrte Induktion der iNOS nicht nur im Gefäßendothel zur exzessiven Bildung von Stickstoffmonoxid. Dieser Vorgang wird vor allem durch einen Überschuss verschiedener Entzündungsmediatoren wie IL-1 oder bakteriellen Lipopolysacchariden getriggert. Folgen dieser Überproduktion sind massive arterielle Vasodilatation, Hypotension und die Schädigung von Gefäßen. Aber auch andere, in Kapitel 5.1.3 beschriebene Mechanismen, führen zu einer absoluten Hypovolämie und tragen zum Blutdruckabfall bei. (Förstermann and Sessa, 2011)

Da es sowohl in der LPS Shock + Vehicle Gruppe, als auch in der C1-INH Gruppe nach Endotoxingabe zu vergleichbaren Blutdruckabfällen kam, liegt die Vermutung nahe, dass zumindest initial nur ein unwesentlicher Einfluss von C1-INH auf die iNOS besteht. Diese Behauptung wird durch die Arbeit von Guerreo et al. gestützt, der einen Endotoxin-induzierten septischen Schock an Hunden untersuchte. Dabei kam es sowohl bei den Tieren, die allein LPS erhielten, als auch bei denen, die zusätzlich C1-INH verabreicht bekamen, zur Hypotension. (Guerreo et al., 1993)

Als Reaktion auf den relativen und absoluten Volumenmangel reagiert der Organismus mit einer Steigerung der Herzfrequenz (HF). Somit ist der Anstieg der HF nach LPS-Gabe als physiologische Antwort auf die Induktion eines septischen Schocks mit Abfall des MABP zu werten. Verschiedene tierexperimentelle Arbeiten konnten diese Ergebnisse bestätigen. Eine Veränderung der Herzfrequenz zeigte sich auch bei mit E.coli und C1-INH behandelten Affen. Ähnlich unserer Arbeit stieg die HF allmählich an, um dann im weiteren Versuchsverlauf auf einem erhöhten Niveau zu stagnieren. Ein ähnliches Ansprechen des Menschen auf eine Toxingabe lag aufgrund der engen genetischen Verwandtschaft zum Affen nahe und konnte durch eine doppelverblindete Placebo-kontrollierte Studie nachgewiesen werden. In allen Fällen waren aber die Unterschiede zwischen den Gruppen, denen das Toxin verabreicht wurde und denen, die zusätzlich C1-INH bekamen, nicht signifikant. (Jansen et al., 1998; Küpper et al., 2007; Okazaki et al., 2009; Dorresteyn et al., 2010; Tsai et al., 2010)

Die hier durchgeführten Untersuchungen zeigten einen positiven Einfluss von C1-INH auf die Herzfrequenz. Ein Grund dafür ist eventuell der günstige Verlauf des Blutdrucks.

Die in dieser Arbeit dargestellten Auswirkungen von C1-INH auf die Hämodynamik im Endotoxin-induzierten septischen Schock lassen sich mit anderen Arbeiten vergleichen. Dabei weist C1-INH durch seine im Versuchsverlauf stabilisierende Wirkung des Blutdruckes und der Herzfrequenz einen möglicherweise günstigen Effekt für die Behandlung des septischen Schocks auf.

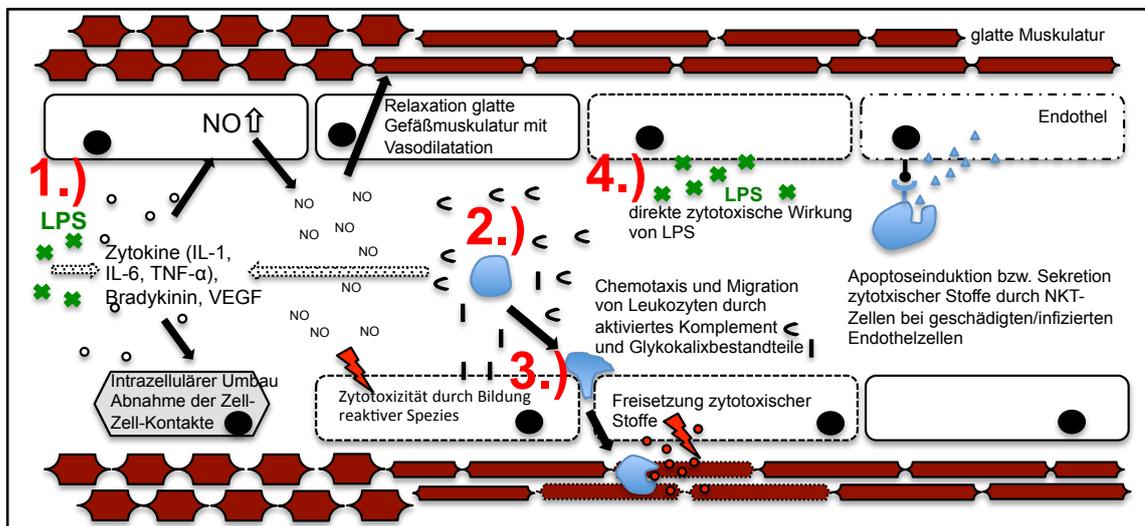
### 5.1.3 Endotheldysfunktion im Endotoxinschock

Das Endothel ist eine physikalische Barriere, die als Schnittstelle zwischen Blut und Extravasalraum den Stoffaustausch reguliert. Eine Störung dieser Barrierefunktion kann im Rahmen einer schweren Sepsis oder eines septischen Schocks zum Versagen eines oder mehrerer Organe oder sogar zum Kreislaufversagen führen. Verschiedene Mechanismen bewirken dabei einen unkontrollierten Verlust von Flüssigkeit in das Interstitium. Somit ist neben der Vasodilatation die Schrankenstörung des Gefäßendothels als ein weiterer Grund für den Blutdruckabfall im Endotoxinschock zu sehen. Endotoxine triggern neben einer direkten zytotoxischen Wirkung die vermehrte Bildung proinflammatorischer Zytokine. Diese induzieren wiederum die Bildung von NO, das durch die Entstehung reaktiver Spezies einen zytotoxischen Effekt auf das Endothel hat. Andere Mediatoren (u.a. TNF- $\alpha$ , Bradykinin, VEGF) oder Entzündungszellen bewirken den Umbau intrazellulärer Strukturproteine mit der Folge, dass Zell-Zell-Kontakte durchlässiger werden und damit einen Verlust von Flüssigkeit ins Interstitium ermöglichen. Zusätzlich wirken Glykokalixbestandteile, wenn diese durch Zellschädigungen ins Blut gelangen, chemotaktisch auf Leukozyten. Diese können sich über verschiedene Integrine und Selektine an die Endothelzellen heften und ins paravasale Gewebe hin zum Entzündungsherd wandern oder durch verschiedene Mechanismen direkt zellschädigend wirken. Auch das Komplementsystem spielt eine wichtige Rolle. Aktivierte Komplementfaktoren locken zum einen Leukozyten an, die das Endothel und das umliegende Gewebe schädigen. Zum anderen triggern sie in diesen Zellen auch eine erhöhte Zytokin-/Mediatorproduktion. Weitere Aspekte wie die Endothelschädigung durch NKT-Zellen oder der verminderte Abbau von Bradykinin sind zusätzlich an der verstärkten Permeabilität des Endothels beteiligt. (van Nieuw Amerongen and van Hinsbergh, 2003; Ferri et al., 2004; Liu D et al., 2005; Heinrich et al., 2010)

In dieser Arbeit wurde das Maß der Endotheldysfunktion und dem damit verbundenen intravasalen Flüssigkeitsverlust durch den Verlauf des Hämatokrits gemessen. Wie bereits in Arbeiten von Matera et al. und Cook et al. gezeigt, kam es bei Ratten nach der Gabe eines Endotoxins zum raschen Hämatokritanstieg als Zeichen einer

ausgeprägten Barriestörung. Dieser Effekt deckt sich trotz methodischer Unterschiede mit den hier gewonnenen Ergebnissen. Diese zeigten nach LPS-Gabe einen ausgeprägten Anstieg des Hämatokrits für alle Tiere. Während in der SHAM Gruppe der Wert weitgehend konstant blieb, sprang der Anteil der zellulären Blutbestandteile innerhalb einer Stunde von annähernd gleichen 40 % auf über 54 % in der LPS Shock + Vehicle Gruppe. In der LPS Shock + C1-INH Gruppe stieg der HKT weniger stark auf durchschnittlich 47 % an. (Cook et al., 1985; Matera et al., 1988)

Einen ähnlichen Verlauf wiesen die Versuche von Jansen et al. auf. Hier wurde Pavianen eine letale Dosis E.coli verabreicht. Infolgedessen kam es sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei den Tieren, die zusätzlich C1-INH erhielten, zu einem insgesamt zwar moderaten Anstieg des Hämatokrit-Wertes, dieser fiel jedoch in der C1-INH Gruppe geringer aus. Liu D et al. konnte dabei in in-vitro Versuchen an menschlichen Zellen und bei in-vivo Versuchen an Mäusen darlegen, dass C1-INH über eine direkte Bindung von LPS verhindert, dass das Endotoxin über eine Aktivierung von Makrophagen die Bildung von TNF- $\alpha$  induziert. Zusätzlich wird der direkte toxische Effekt von LPS auf das Endothel reduziert, die Aktivierung von Komplement- und Kontaktsystem verhindert und die Adhäsion von Leukozyten am Endothel reduziert. Letzteres geschieht durch die Interaktion der Serin-Protease mit Selektinen auf den Endothelien. (Jansen et al., 1998; Liu D et al., 2005)



**Abb. 48:** Übersicht über verschiedene Mechanismen der Endothelschädigung (gepunktete Pfeile - indirekte Wirkung; schwarze Pfeile - direkte Wirkung) und den Einfluss von C1-INH: 1.) Leukozytenaktivierung  $\downarrow$  und Zytokinfreisetzung  $\downarrow$ ; 2.) Komplementaktivierung  $\downarrow$  (Chemotaxis $\downarrow$ ); 3.) Adhäsion der Leukozyten am Endothel  $\downarrow$ ; 4.) direkte zytotoxische Wirkung von LPS  $\downarrow$

Durch die vielen beschriebenen Mechanismen scheint sich die Gabe von C1-INH im septischen Schock günstig auf die Entwicklung einer Endotheldysfunktion auszuwirken. Sie kann sie zwar nicht verhindern aber in ihrem Ausmaß begrenzen. Zusätzlich scheint sich somit ein positiver Effekt auf die Hämodynamik (s. 5.1.2) zu ergeben.

#### **5.1.4 Expression verschiedener Proteine im Endotoxinschock**

##### **a) HSP-70 und p38**

Die MAP-Kinase p38, als Bestandteil intrazellulärer Signalkaskaden, ist u.a. an der Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  beteiligt. HSP-70 als Mitglied der Hitze-Schock-Protein-Familie wirkt zytoprotektiv, indem es verschiedene Apoptose-induzierende Signalwege hemmt oder die durch NF $\kappa$ -B induzierte Entzündungsreaktion supprimiert. Beide Moleküle werden bei einer Entzündung vermehrt gebildet und dienen in unserer Arbeit als ein Marker des Zellstress. (Dodeller and Schulze-Koops, 2006; Gelain et al., 2011)

In dieser Arbeit konnte für die LPS Shock + Vehicle Gruppe eine vermehrte Proteinexpression von HSP-70 ( $p \leq 0,01$ ) in der Niere und von p38 im Herzen ( $p \leq 0,05$ ) gegenüber der LPS Shock + C1-INH Gruppe nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen, dass beide Proteine bei gesteigerter Stressinduktion vermehrt gebildet werden. Trotz ausführlicher Recherche ließen sich jedoch zum Einfluss von C1-INH auf die Bildung von HSP-70 bzw. p38 keine Daten finden. Allein LPS-getriggerte in-vitro Untersuchungen bezüglich des Einflusses der Serin-Protease auf die Konzentration von p50 und p65, die in direktem Zusammenhang zu NF- $\kappa$ B und damit TNF- $\alpha$  stehen, zeigten ähnliche Tendenzen zu unseren Ergebnissen und lassen somit einen Zusammenhang zu p38 vermuten. (Liu et al., 2007; Zhang et al., 2007; Davis et al., 2008)

Insgesamt liegt der Verdacht nahe, dass die verschiedenen Ansatzpunkte von C1-INH, wie z.B. die Hemmung der Komplementaktivität oder die verminderte Gefäßpermeabilität, im septischen Schock zu einer abgeschwächten Entzündungsreaktion mit geringerem Zellstress führen. Die Folgen sind eine niedrigere HSP-70 und p38 Konzentration.

##### **b) VEGF und MFG-E8**

VEGF, ein wichtiger Stimulator der Angiogenese, fördert die Proliferation bzw. Migration von Endothelzellen. Es erhöht die Gefäßpermeabilität und wirkt antiapoptotisch. MFG-E8, auch als Lactadherin bezeichnet, ist ein Integrin-bindendes

Protein. Es dient Makrophagen zur Erkennung von apoptotischen Zellen und wird von Endothelzellen exprimiert, wo es an der VEGF-abhängigen Neovaskularisation beteiligt ist. Beide Moleküle dienen als Maß für die Perfusion und Sauerstoffversorgung der Gewebe, MFG-E8 zusätzlich als Surrogatparameter für den Zelltod. (Silvestre et al., 2005; Mohammend et al., 2007)

In dieser Arbeit konnte eine fast doppelt so hohe Konzentration von VEGF in der Niere der LPS Shock + Vehicle Gruppe als in der LPS Shock + C1-INH Gruppe ( $p \leq 0,01$ ) festgestellt werden. Diese deutlich erhöhten VEGF-Werte scheinen auf eine verminderte Perfusion bzw. Sauerstoffversorgung des schockanfälligen Nierengewebes bei diesen Tieren hinzuweisen. Auch hat möglicherweise der durch den Endotoxinschock ausgelöste Zellstress zu einer erhöhten Bildung geführt. Zusätzlich deckt sich die Fähigkeit von VEGF, die Gefäßpermeabilität zu erhöhen, mit dem Verlauf des Hämatokrits in dieser Versuchsgruppe (s. 5.1.3). So zeigten außerdem verschiedene Untersuchungen sowohl an Tieren (Yano et al., 2006) als auch am Menschen (Karlsson et al., 2008; Shapiro et al., 2008), dass es einen direkt proportionalen Zusammenhang zwischen einer Sepsis und der Konzentration von VEGF gibt. Dabei konnten Yano et al. an verschiedenen Mausmodellen nachweisen, dass in den ersten Stunden nach Infektion die Konzentration von VEGF im Blutplasma teilweise signifikant ansteigt. Auch mittels eines ELISAs konnten sie zeigen, dass in der Niere 6 h nach LPS-Gabe die Werte für VEGF signifikant erhöht waren. Karlsson et al. untersuchten über einen Zeitraum von 4 Monaten Blutproben von Intensivpatienten mit einer schweren Sepsis und stellten dabei höhere VEGF-Spiegel bei diesen im Vergleich zu gesunden Probanden fest. Ebenso lagen die Werte bei den Intensivpatienten nach 72 h noch höher als zu Studienbeginn. Gleichzeitig konnte ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Überlebensrate und der VEGF-Konzentration nachgewiesen werden. (Yano et al., 2006; Karlsson et al., 2008; Shapiro et al., 2008)

Trotz fehlender vergleichbarer Arbeiten scheint C1-INH für eine bessere  $O_2$ -Versorgung und Perfusion der Gewebe während eines septischen Schocks zu sorgen, sodass es zu einer geringeren VEGF-Ausschüttung des Endothels kommt. Mögliche Mechanismen wie eine verminderte Endotheldysfunktion oder Leukozytenaktivität könnten hierbei eine Rolle spielen.

Auch für MFG-E8 zeigten sich in der Niere signifikant ( $p \leq 0,05$ ) niedrigere Konzentrationen in der LPS Shock + C1-INH Gruppe im Vergleich zur Vehicle Gruppe. Entsprechend seiner oben beschriebenen Funktion scheint dies für eine verstärkte Gefäßneubildung und Zellabbau bei den Vehicle Tieren zu sprechen, was wiederum in

der LPS Shock + C1-INH Gruppe auf einen gegenteiligen Effekt hindeuten würde. Verschiedene Untersuchungen durch Miksa et al. zeigten jedoch erniedrigte MFG-E8 Werte im Zuge einer Sepsis sowohl in Milz, Leber oder Blut. Hierbei bleibt die Vergleichbarkeit zu unseren Ergebnissen jedoch fraglich, da neben einem anderen Sepsis-Modell die quantitativen Bestimmungen von Lactadherin erst 20 h nach Versuchsbeginn durchgeführt wurden. Zusätzlich bezogen sich diese Erkenntnisse hauptsächlich auf die Milz. Komura et al. zeigten dabei an TLR-4- bzw. CD14-defizienten Mäusen, dass diese beiden Komponenten in der LPS-induzierten Sepsis ursächlich mit dem Konzentrationsabfall von MFG-E8 in Zusammenhang stehen. Auch hier ist fraglich, ob nicht die Proteinbestimmung nach 20 h den Unterschied zu unseren Ergebnissen erklärt, da möglicherweise nach maximal 4 h Versuchsdauer die Konzentration von MFG-E8 nicht so stark abnehmen konnte. Auch organspezifische Unterschiede sollten in Betracht gezogen werden. Matsuda et al. konnten diese Vermutung in einem Ischämie-/Reperusionsversuch an Mäusen nicht bestätigen, sie fanden in den Organen Leber, Niere und Milz in der Vehicle Gruppe vergleichbare Abnahmen der MFG-E8-Konzentration nach 20 h. Aber hier sollte wiederum das abweichende Versuchsmodell und die bereits oben angesprochenen deutlich später durchgeführten Messungen kritisch betrachtet werden. Zusätzlich stellt sich die Frage, ob während einer Sepsis initial die Werte für Lactadherin sogar ansteigen, bis beispielsweise LPS über den CD14/TLR-4-Weg dessen Produktion hemmen kann. Trotz intensiver Recherche ließen sich keine vergleichbaren Versuche bezüglich der Auswirkung von C1-INH auf die MFG-E8 Konzentration finden. Hierbei geben wahrscheinlich die unterschiedlichen Wirkungsweisen der Serinprotease (u.a. anti-entzündliche Wirkungen) den Ausschlag. (Miksa et al. 2006; Komura et al., 2009; Miksa et al., 2009; Matsuda et al., 2011)

Anhand der oben dargestellten Ergebnisse für VEGF und MFG-E8 kann man davon ausgehen, dass C1-INH die Perfusion und O<sub>2</sub>-Versorgung im septischen Schock verbessert bzw. einen Zelluntergang minimiert.

### **5.1.5 Entzündungsreaktion im Endotoxinschock**

Die Entzündungsreaktion, als ein zentraler Aspekt im Pathomechanismus des septischen Schocks, wurde in dieser Arbeit durch die MPO-Aktivität quantifiziert. Zusätzlich lieferten histologische Gewebeschnitte einen Anhaltspunkt über das Ausmaß der Entzündung.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen zeigten sich verringerte Werte ( $p \geq 0,05$ ) für die MPO-Aktivität in den Organen Herz, Lunge und Niere für die Medikamenten

Gruppe im Vergleich zur Vehicle Gruppe. Bei den C1-INH-SHAM Tieren waren die Ergebnisse sogar signifikant niedriger ( $p \leq 0,01$ ). Die Entzündungszeichen in den histologischen Präparaten, vor allem der schockanfälligen Organe Lunge und Niere, waren in der Vehicle Gruppe erhöht. Neben vermehrten Entzündungszellen zeigten sich in diesen Gewebsschnitten deutliche Zellschädigungen des Alveolarepithels in Form von verdickten Alveolarsepten (Lunge) oder der Tubuluszellen mittels eines intrazellulären Organisationsverlustes (Niere). Ähnliche Veränderungen ließen sich zwar auch in der LPS Shock + C1-INH Gruppe feststellen, waren dort aber weit weniger ausgeprägt. Vergleichbar dazu konnte C1-INH eine induzierte Entzündungsreaktion in verschiedenen weiteren Versuchsmodellen reduzieren: Ischämie/Reperfusion am Herzen (Fu et al., 2006), Colitis-Induktion mit Dextran Natrium-Sulfat (Lu et al.), akut-traumatische Rückenmarksverletzung (Tei et al., 2008). Betrachtet man zusätzlich histologische Untersuchungen aus anderen Arbeiten (Matsuda et al., 2011; Shen et al., 2009), zeigten sich ähnlich deutliche Veränderungen in Niere oder Lunge bei den Tieren, denen eine Entzündungsreaktion induziert wurde. Die Administration von C1-INH führte, ähnlich dieser Ergebnisse, bei Dalle Lucca et al. zur eindeutigen Befundbesserung mit u.a. Abnahme der Alveolarwanddicke in der Lunge. Fu et al. stellten in ihren histologischen Schnitten des Herzens ein verbessertes Ergebnis im zeitlichen Verlauf für die Gruppe, die zusätzlich zur Ischämie/Reperfusion C1-INH erhielt, dar. Damit lassen sich die Ergebnisse der MPO-Aktivitäts-Bestimmung durch die mikroskopischen Präparate bestätigen. (Fu et al., 2006; Tei et al., 2008; Shen et al., 2009; Lu et al., 2010; Matsuda et al., 2011; Dalle Lucca et al., 2012)

Es sind weitere Serin-Protease-Inhibitoren wie Aprotinin bekannt. Es wird klinisch vor allem bei erhöhter Blutungsneigung eingesetzt. Obwohl mit der Hemmung von Plasmin ein anderer Ansatzpunkt besteht, konnten verschiedene experimentelle Arbeiten einen antientzündlichen Effekt am Ischämie-Reperfusions-Modell zeigen. Diese Erkenntnisse unterstützen unsere Ergebnisse bezüglich der entzündungshemmenden Wirkung von C1-INH im septischen Schock. (Buerke et al., 2007; Carter et al., 2008)

Ein septischer Schock führt zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion. Dies spiegelt sich in einem deutlichen Anstieg der MPO-Aktivität oder spezifischer histologischer Zeichen, wie der Invasion von Entzündungszellen, wider. Die Gabe von C1-INH wirkt nach den in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnissen und übereinstimmend mit der Literatur der Inflammation entgegen, indem es beispielsweise die Leukozyten-Endothel-Adhäsion reduziert oder die Komplementaktivierung vermindert. Diese und weitere Effekte sind in den Abbildungen 47 und 48 zusammengefasst.

## 5.2 Heparin

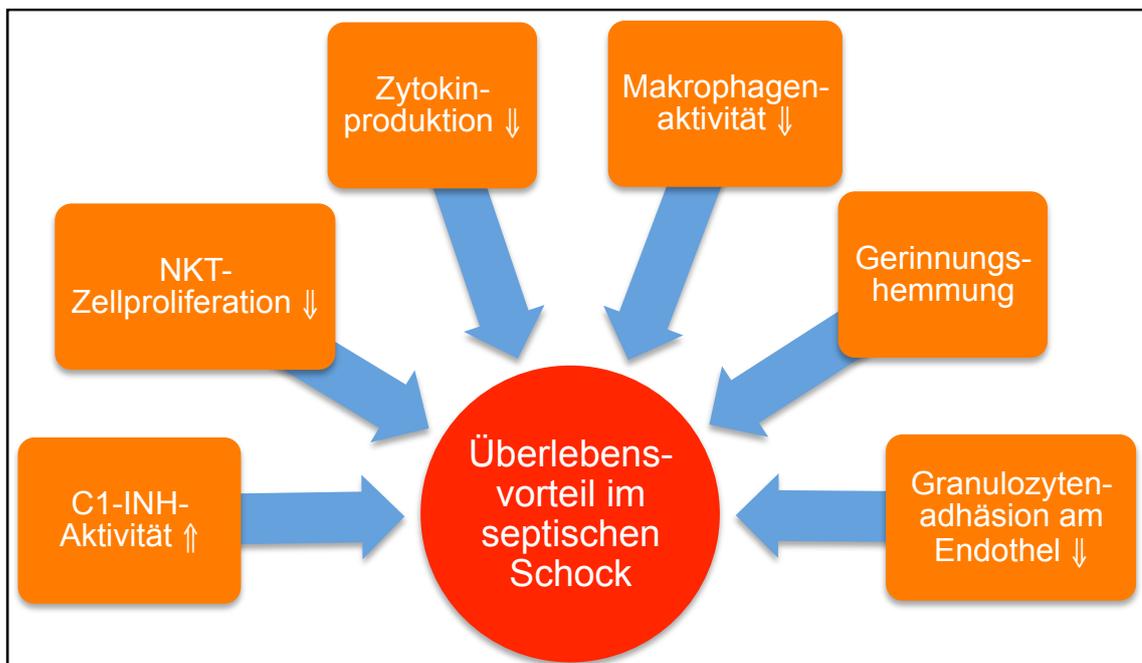
### 5.2.1 Überlebenszeit im Endotoxinschock

Nach LPS-Gabe überlebten die Tiere der LPS Shock + Heparin Gruppe durchschnittlich über 157 min und damit mehr als doppelt so lange als in der Vehicle Gruppe mit 77,1 min ( $p \leq 0,01$ ). In der SHAM Gruppe betrug die mittlere Überlebenszeit mehr als 234,2 min.

Somit wird ein deutlicher protektiver Effekt von Heparin bezüglich der Überlebenszeit im septischen Schock deutlich. Dieses Ergebnis lässt sich trotz methodischer Unterschiede in den Versuchen von Ding et al. bestätigen. Dabei wurden als positive Eigenschaften neben der bekannten antikoagulierenden Wirkung auch entzündungshemmende Funktionen angegeben. Letzteres erklärte sich durch die Hemmung verschiedener proinflammatorischer Zytokine. Zusätzlich ist es Heparin möglich, die Wirkung von LPS zu inhibieren, indem es mit ihm um die Bindung am LPS-Rezeptor von Makrophagen konkurriert und damit deren Aktivierung vermindert. Ein weiterer Aspekt der protektiven Wirkung von UFH wurde in den Versuchen von Chuang et al. beleuchtet. Er zeigte, dass Heparin die Bindung des Apolipoproteins E am LDL-Rezeptor verhindern kann. Dies hat eine verminderte NKT-Zell-Proliferation und verminderte Zytokinproduktion zur Folge. Betrachtet man allerdings die Ergebnisse für größere Säugetiere, ist die Datenlage nicht mehr so eindeutig. Bei Versuchen an Pavianen konnte Heparin nicht vor Organversagen und Tod schützen. In der HETRASE Studie zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Vorteil in der 28-Tage-Mortalität gegenüber Sepsis-Patienten, die keine Intervention mit UFH erhielten. Jedoch wiesen alle klinischen Studien, auch jene die, die positive Effekte bezüglich Mortalität während der Sepsis nachweisen konnten (KyberSept, OPTIMIST), methodische Schwachpunkte auf. Bei letzteren könnte das bessere Outcome durch eine fehlende Randomisierung entstanden sein, während der mangelnde Benefit in der HETRASE Studie eventuell aufgrund einer allgemein niedrigen Mortalitätsrate des Patientenkollektives zustande kam. (Esmon, 2000; Polderman and Girbes, 2004; Barochia et al., 2009; Jaimes et al., 2009; Chuang et al., 2010; Ding et al., 2011)

Nach der aktuellen Studienlage scheint Heparin sowohl bei Tierexperimenten zum septischen Schock als auch bei Patienten mit schwerer Sepsis einen positiven Effekt auf das Überleben zu haben. Einen solchen Effekt konnte diese Arbeit bestätigen. Mögliche Wirkungsmechanismen sind dabei in Abb. 49 dargestellt. Bei Pavianen, aber auch bei weniger schwer Kranken blieb dieser positive Effekt aus, sodass ein

Überlebensvorteil durch UFH nicht eindeutig belegt werden kann und zusätzliche Untersuchungen nötig sind. Außerdem sollte der Einfluss der Medikamentendosis weiter untersucht werden. Bei der Verwendung der doppelten Konzentration konnten in dieser Arbeit positive Auswirkungen auf die Überlebenszeit beobachtet werden. Allerdings war hier die Anzahl der Versuchstiere zu gering und der Standardfehler relativ hoch.



**Abb. 49:** Verschiedene Wirkungen von Heparin, die möglicherweise zu einem Überlebensvorteil im septischen Schock führen

### 5.2.2 Hämodynamik im Endotoxinschock

Die Endotoxinapplikation führte in der LPS Shock + Heparin Gruppe zu einer stärkeren Beeinflussung von Blutdruck (initial -70%) und Herzfrequenz (geringerer kompensatorischer Anstieg) als in der Vehicle Gruppe. In letzterer fiel der MABP lediglich um 50 % und die HF stieg wesentlich deutlicher an. Die SHAM Tiere unterlagen bezüglich der Hämodynamik im Verlauf kaum Schwankungen.

Die Pathogenese der blutdrucksenkenden Wirkung von LPS, sowie deren Bestätigung durch verschiedene andere Arbeiten, wurden bereits in Kapitel 5.1.2 diskutiert. Bei der zusätzlichen Gabe von Heparin prägte sich dieser hypotensive Effekt noch deutlicher aus. Dabei addiert sich wahrscheinlich zur blutdrucksenkenden Wirkung des Endotoxins die von Heparin hinzu. Bereits in der Arbeit von Susic et al. aus dem Jahr 1982 wurde dieser Effekt an hypertensiven Ratten aufgezeigt. Dafür wurden spontan hypertensiven Tiere und einseitig nephrektomierten bzw. an der Nierenarterie geclipten Tiere über mehrere Wochen mit der gleichen Dosis Heparin behandelt. Eine klinische

Studie, die den Einfluss einer kontinuierlichen Heparintherapie im Zuge einer geplanten Bypassoperation auf die Hämodynamik untersuchte, kam zu einem ähnlichen Ergebnis. Jene Wirkung wird dabei in einer Arbeit von Paredes-Gamero et al. durch die Interaktion von Heparin über Integrine mit dem Muskarinrezeptor  $M_3$  erklärt. Dieser triggert die Bildung von Stickstoffmonoxid durch die eNOS. NO ist, wie in 5.1.2 beschrieben, in der Lage, eine Vasodilatation mit Blutdruckabfall zu induzieren. (Susic et al., 1982; Casthely et al., 2010; Paredes-Gamero et al., 2010)

Um eine weiterhin adäquate Gewebesperfusion sicherzustellen, reagiert der Organismus auf den Blutdruckverlust mit einem Anstieg der Herzfrequenz. Im Gesamtverlauf gesehen, stieg die HF der LPS Shock + Heparin Gruppe gegenüber den Ausgangswerten an, jedoch weit weniger stark als bei den Vehicle Tieren. Dieser Effekt deckt sich nicht ganz mit den Ergebnissen von Schiffer et al., der einen gleichen Anstieg der Herzfrequenz bei Schafen, die entweder LPS und Heparin oder nur LPS erhielten, feststellen konnte. Es zeigt jedoch eine gleichgerichtete Tendenz. Unterschiede können möglicherweise auf methodische Abweichungen zurückgeführt werden. (Schiffer et al., 2002; Okazaki et al., 2009; Tsai et al., 2010)

Die Auswirkungen von Heparin auf die Hämodynamik im Endotoxin-induzierten septischen Schock lassen sich mit anderen Arbeiten vergleichen. Die Wirkung von Heparin auf den Blutdruck zeigt sich dabei weniger günstig. Zusätzlich sind die tachykarden Effekte des Endotoxinschocks weniger deutlich ausgeprägt. Zusammenfassend lässt sich eine positive hämodynamische Wirkung von Heparin im septischen Schock nicht mit Sicherheit feststellen.

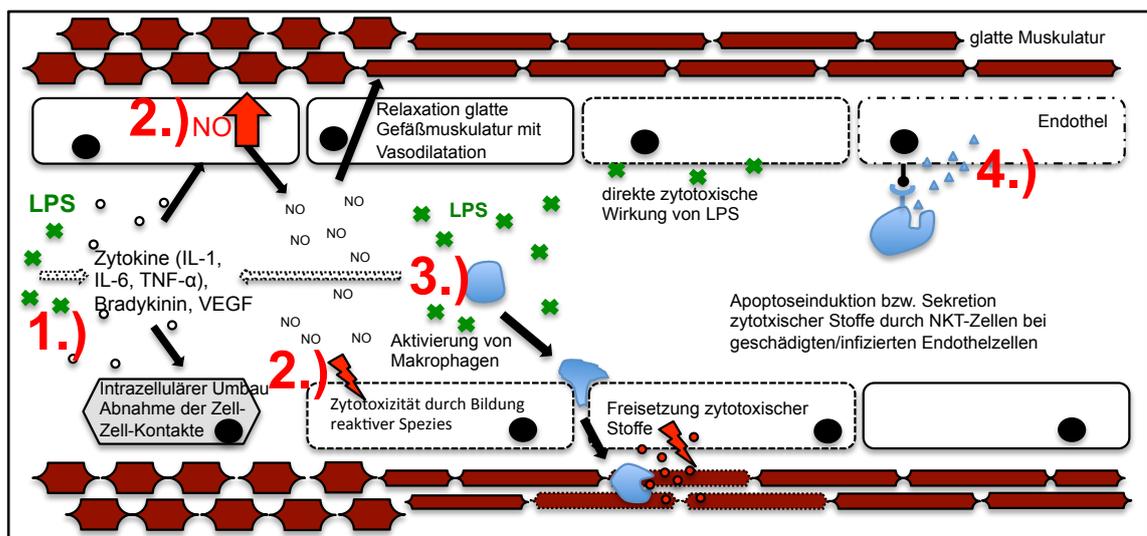
### **5.2.3 Endotheldysfunktion im Endotoxinschock**

Während einer Sepsis ist das Endothel aufgrund verschiedener pathologischer Mechanismen, wie in Kapitel 5.1.3 diskutiert, nicht mehr in der Lage, für einen geregelten Stoff- und Flüssigkeitsaustausch zwischen Blut und Interstitium zu sorgen. Es kommt zum unkontrollierten Verlust von Volumen in die Gewebe mit Auswirkungen auf die Hämodynamik und Organperfusion.

Die Barrierestörung des Endothels wurde in dieser Arbeit durch den Verlauf des Hämatokrits (HKT) quantifiziert. Dieser stieg mit einer Zunahme auf über 60 % nach LPS-Gabe am stärksten in der LPS Shock + Heparin Gruppe an. In der Vehicle Gruppe fiel die Veränderung des HKT mit einem Anstieg auf 54 % weniger stark aus. Bei den SHAM Tieren blieben die Werte über den gesamten Verlauf annähernd konstant. Dass LPS einen HKT-Anstieg induziert, wurde bereits unter 5.1.3 erläutert. Jedoch zeigten die Tiere der LPS Shock + Heparin Gruppe im Vergleich einen deutlich stärkeren

Anstieg des Hämatokrits. Auch wenn im Versuchsverlauf eine sinkende Tendenz zu beobachten war, blieb der Anteil der zellulären Blutbestandteile im gesamten Versuchszeitraum über denen der LPS Shock + Vehicle Gruppe. Auch Uchiba et al. konnten mit der Gabe von Heparin (300 units/kg KG) eine Permeabilitätserhöhung des Endothels durch LPS (5 mg/kg KG) bei Ratten nicht verhindern. Aber sie lag auch nicht über der Vehicle Gruppe. Statt des Hämatokrits nutzen sie allerdings zur Quantifizierung des Endothelschadens den Permeabilitätskoeffizienten, welcher sich aus dem Verhältnis von radioaktiv markierten Leukozyten im Lungengewebe zum Verhältnis dieser in 1 ml Blut zusammensetzte. Angaben zum Verlauf des Hämatokrits wurden nicht gemacht, sodass ein direkter Vergleich beider Ergebnisse nur eingeschränkt möglich ist. Jedoch scheint in der Arbeit von Uchiba et al. Heparin keinen positiven Effekt auf das Endothel zu haben. Zwar ist Heparin in der Lage, die Makrophagenaktivierung durch LPS zu reduzieren, aber möglicherweise überwiegt der Effekt, eine vermehrte NO-Freisetzung zu induzieren. Als Folge davon können mehr reaktive Spezies gebildet werden, die das Endothel bedeutender schädigen und somit den stärkeren Anstieg des HKT in dieser Arbeit erklären. (Cook et al., 1985; Matera et al., 1988; Uchiba et al., 1995; Paredes-Gamero et al., 2010).

Nach den hier gewonnen Erkenntnissen verstärkt Heparin die Endotheldysfunktion im septischen Schock. Der starke Anstieg des HKT scheint außerdem ein weiterer Grund für den niedrigen und schwankenden Verlauf des MABP über den Versuchszeitraum zu sein.



**Abb. 50:** Übersicht über verschiedene Mechanismen der Endothelschädigung (gepunktete Pfeile - indirekte Wirkung; schwarze Pfeile - direkte Wirkung) und der Einfluss von Heparin: 1.) Zytokinfreisetzung ↓; 2.) NO-Freisetzung ↑; 3.) Aktivierung der Makrophagen durch LPS ↓; 4.) NKT-Zell-Proliferation ↓

## 5.2.4 Expression verschiedener Proteine im Endotoxinschock

### a) p38

p38, ein Vertreter der MAP-Kinase Familie, kann den Zellzyklus oder die Entzündungsreaktionen beeinflussen und diente in dieser Arbeit als ein Marker für den Zellstress. (Dodeller and Schulze-Koops; 2006)

Die hier gewonnenen Ergebnisse zeigten eine erniedrigte Expression von p38 ( $p \geq 0,05$ ) im Lebergewebe in der LPS Shock + Heparin Gruppe gegenüber der Vehicle Gruppe. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass UFH die Bildung und Aktivität dieser MAP-Kinase reduziert und damit weniger Entzündungsmediatoren gebildet werden bzw. weniger Zellstress induziert wird. Diese Resultate decken sich mit weiteren Arbeiten. Li et al. führten diesbezüglich in-vitro Untersuchungen durch. Dabei wurden Endothelzellen mit UFH in verschiedenen Dosierungen (bis zu 10 units/ml) vorbehandelt, worauf 10  $\mu\text{g/ml}$  LPS folgten. Im Resultat zeigten sich in den vorbehandelten Zellkulturen, neben einer höheren Überlebensrate und einer niedrigeren Konzentration verschiedener Entzündungsmediatoren, auch eine verringerte Aktivität für p38. Ebenfalls eine verminderte p38 Expression nach Endotoxingabe konnte im Lungengewebe von mit Heparin behandelten Sprague-Dawley Ratten durch Sun et al. nachgewiesen werden. (Sun et al., 2009; Li et al., 2012)

Die Ergebnisse belegen übereinstimmend mit der gefundenen Literatur, dass p38 während der Sepsis verstärkt exprimiert wird. Zusätzlich scheint entsprechend verschiedener Arbeiten Heparin die Konzentration dieser MAP-Kinase zu senken. Es ist somit davon auszugehen, dass speziell im Lebergewebe bei den mit UFH vorbehandelten Tieren ein verminderter Zellstress vorliegt.

### b) VEGF und MFG-E8

VEGF ist an der Proliferation, Migration und Homöostase von Endothelzellen beteiligt. Weiterhin erhöht es die Gefäßpermeabilität und wirkt antiapoptotisch. MFG-E8 (Lactadherin) ist zusammen mit VEGF an der Neovaskularisation beteiligt und erleichtert Makrophagen die Erkennung von apoptotischen Zellen. Hier wurden deshalb beide Proteine zur Beurteilung von Perfusion und Sauerstoffversorgung der Gewebe genutzt. MFG-E8 diente außerdem als ein Indikator für den Zelluntergang. (Silvestre et al., 2005; Mohammend et al., 2007)

In den Untersuchungen zur VEGF-Expression im septischen Schock in der Niere, zeigten sich in beiden Heparin Gruppen (Heparin SHAM, LPS Shock + Heparin) die Werte gegenüber der Vehicle Gruppe um ca. 75 % bzw. 70 % (jeweils  $p \leq 0,001$ ) verringert. Erhöhte VEGF-Konzentrationen im Rahmen eines septischen Geschehens

sind nicht ungewöhnlich und konnten bereits im Tier-Modell (Yano et al., 2006) oder am Menschen (Karlsson et al., 2008) nachgewiesen werden. Hierbei spielen vermutlich mehrere Effekte, wie erhöhter Zellstress des Endothels oder verminderte Gewebepfusion im Zuge einer Endotheldysfunktion bzw. hämodynamischen Störung, eine Rolle. Dies würde entsprechend der VEGF-Werte in der LPS Shock + Heparin Gruppe bedeuten, dass UFH diesen Effekten entgegenwirkt. Jedoch zeigen die in Kapitel 4.2 beschriebenen Ergebnisse zu Hämodynamik, Barrierestörung des Endothels oder Entzündung im Gewebe, dass Heparin eine gegensätzliche Wirkung auf die erwarteten Resultate hatte. Somit muss von einem anderen Mechanismus bezüglich der verminderten VEGF-Expression ausgegangen werden. Verschiedene Arbeiten legen den Verdacht nahe, dass Heparin einen direkten Einfluss auf die VEGF-Konzentration ausübt und so zu dessen Abnahme führt. Beispielsweise konnten Gan et al. bei diabet. Ratten eine Reduktion von VEGF in der Niere durch niedermolekulares Heparin NMH nachweisen. Auch die Induktion einer akuten Pankreatitis an Ratten (Li S et al., 2012) mit vorheriger Heparinabgabe lieferte vergleichbare Ergebnisse. Der möglicherweise zugrunde liegende Mechanismus wurde in der Arbeit von Chung et al. beleuchtet. Sie wiesen nach, dass NMH und damit wahrscheinlich auch UFH neben seiner blutgerinnungshemmenden Eigenschaft in der Lage ist VEGF direkt zu binden und so dessen Wirkung zu unterdrücken. (Gan et al., 2005; Yano et al., 2006; Karlsson et al., 2008; Chung et al., 2012; Li S et al., 2012)

VEGF scheint im Zusammenhang mit Heparin nicht das geeignete Maß zur Beurteilung von Perfusion und Sauerstoffversorgung der Gewebe zu sein. Ansonsten würden die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, dass Heparin u.a. einen negativen Einfluss auf die Hämodynamik hat, im Gegensatz stehen. Möglicherweise ist die VEGF-bindende Eigenschaft von UFH mit für die in Kapitel 5.2.3 diskutierte Endotheldysfunktion ursächlich, da so die Apoptose von Endothelzellen gefördert wird.

In den durchgeführten Untersuchungen stellte sich eine signifikant erhöhte Expression von MFG-E8 in der Niere in der LPS Shock + Vehicle Gruppe gegenüber der SHAM ( $p \leq 0,05$ ) und der Medikamenten Gruppe ( $p \leq 0,01$ ) dar. Wie in Kapitel 5.1.4 dargelegt, zeigten jedoch verschiedene Studien (u.a. Miksa et al., 2006), dass Lactadherin bei entzündlichen Prozessen, wie der Sepsis, aufgrund des vermehrten Zelluntergangs verstärkt verbraucht wird und somit dessen Konzentration sinken sollte. Allerdings können methodische Abweichungen als Ursache der Unterschiede zu unseren Ergebnissen nicht ausgeschlossen werden.

Da Erkenntnisse zum Einfluss von MFG-E8 auf septische Prozesse erst seit wenigen Jahren bekannt sind, ist die Datenlage diesbezüglich relativ begrenzt. Vor allem im

Hinblick auf die Beeinflussung dieses Proteins durch Heparin lassen sich keine weiteren Untersuchungen finden. Somit kann nur vermutet werden, dass zu Beginn einer Sepsis eine verstärkte Synthese von MFG-E8 stattfindet. Im Verlauf sich dessen Konzentration aber durch den vermehrten Verbrauch reduziert. Als Ursache, warum unter Heparin die Lactadherin-Werte signifikant niedriger sind, lassen sich mehrere Möglichkeiten diskutieren. Zum einen kann UFH möglicherweise, ähnlich seiner Fähigkeit VEGF zu binden, durch eine direkte Interaktion mit MFG-E8 dessen nachweisbare Menge reduzieren. Zum anderen spielen eventuell verschiedene Einflüsse, wie in Abb. 49 zu sehen, eine Rolle.

### **5.2.5 Entzündungsreaktion im Endotoxinschock**

Die in der Sepsis bzw. dem septischen Schock ablaufende Entzündungsreaktion wurde in dieser Arbeit anhand der MPO-Aktivität und der Begutachtung histologischer Gewebsschnitte beurteilt.

Die LPS Shock + Heparin Gruppe wies in allen Untersuchungen im Vergleich zur Vehicle Gruppe verstärkte MPO-Aktivitäten auf. In den Organen Herz und Lunge waren die Werte sogar signifikant gegenüber den Tieren erhöht, die allein LPS erhielten. Diese Ergebnisse, die auf eine verstärkte Entzündungsreaktion bei den Tieren, welche neben dem Endotoxin Heparin erhielten, hinweisen, stehen im Widerspruch zu unseren Erkenntnissen aus den histologischen Untersuchungen. Dort konnten für die Medikamenten Gruppe u.a. in Herz, Lunge und Niere erheblich geringere Zeichen einer Inflammation festgestellt werden. Nicht nur die Organstruktur beispielsweise des Herzens war besser erhalten, auch die Lungenpräparate zeigten deutlich geringere Infiltrate und Alveolarwandverdickungen, als dies in der Vehicle Gruppe der Fall war. Bezüglich des Einflusses von Heparin auf die Entzündungsreaktion ist die Literatur nicht ganz eindeutig. Verschiedene Arbeiten (Li S et al., 2012; Gedik et al., 2012) bescheinigen UFH eine Senkung der MPO-Aktivität und damit eine Reduzierung der Inflammation. Außerdem zeigte Lever et al. eine verminderte Adhäsion von Granulozyten an mit Heparin vorbehandelten Endothelzellen. Im Gegensatz dazu sprechen Borawski oder Baldus et al. von einer MPO-freisetzenden Wirkung von Heparin. In Bezug auf die histologischen Untersuchungen führte die Induktion einer Entzündungsreaktion zu Veränderungen verschiedener Organe. In der Lunge nahm die Dicke der Alveolarwände zu, es zeigten sich vermehrt Entzündungszellen, während beispielsweise in der Niere sich ein deutlich unruhigeres Tubulusplasma darstellte. Diese Ergebnisse bestätigten sich in u.a. in den Arbeiten von Matsuda et al. oder Shen et al. Im Vergleich dazu zeigten Wang et al. unter

Verwendung von modifiziertem, nicht-gerinnungshemmenden Heparin im Ischämie/Reperfusionmodell einen Vorteil gegenüber der Vehicle Gruppe u.a. an den Organen Niere und Leber. Auch wenn jene Arbeit zu dieser hier deutliche methodische Unterschiede aufweist und zusätzlich von einem gerinnungshemmenden Effekt des Heparins auszugehen ist, kann man bei vergleichbaren Ergebnissen auf mikroskopischer Ebene von einer günstigen Wirkung des UFH ausgehen. (Wang et al., 1996; Lever et al., 2000; Borawski, 2006; Baldus et al., 2006; Shen et al., 2009; Matsuda et al., 2011; Li S et al., 2012; Gedik et al., 2012)

Die gewonnenen Ergebnisse zu Heparin sind widersprüchlich. Einerseits sind die Entzündungszeichen in den mikroskopischen Präparaten durch Heparin in der LPS Shock + Heparin Gruppe vermindert. Dies passt zu der signifikant verlängerten Überlebenszeit oder der signifikant verringerten Proteinexpressionen für beispielsweise Zellstressmarker im Vergleich zur LPS Shock + Vehicle Gruppe. Andererseits spricht der Verlauf des Hämatokrits als Surrogatparameter für die Endotheldysfunktion oder der Verlauf der hämodynamischen Parameter zusammen mit den erhöhten MPO-Aktivitäten für einen negativen Einfluss von UFH auf den septischen Schock.

### 5.3 Vergleich C1-INH vs. Heparin

C1-INH zeigte in dieser Arbeit sehr signifikante Überlebensvorteile im Endotoxin-induzierten septischen Schock. Dabei konnte C1-INH neben der durchschnittlichen Überlebenszeit einen günstigen Einfluss auf Hämodynamik, histologische Veränderungen, Proteinexpression als Marker für Zellstress oder Gewebepfusion und MPO- bzw. Entzündungsaktivität nehmen. Dies alles lässt auf einen umfangreichen protektiven Schutz während eines septischen Schocks schließen.

Im Vergleich dazu konnte zwar auch Heparin einen sehr signifikanten Überlebensvorteil im septischen Schock aufweisen, aber verschiedene Parameter stellten sich dabei widersprüchlich dar. Die Ergebnisse der histologischen Untersuchungen waren vergleichbar mit denen von C1-INH und die Expression verschiedener Proteine ließ einen günstigen Effekt vermuten. Jedoch deuteten die MPO-Aktivitäten auf eine verstärkte Entzündung hin. Zusätzlich konnte eine vermehrte Endotheldysfunktion in Form eines starken Hämatokrit-Anstieges und eine ausgeprägte hämodynamische Instabilität festgestellt werden. Alles in allem lässt sich aus diesen Untersuchungen nur ein bedingter protektiver Schutz von Heparin im septischen Schock ableiten. Eine zusammenfassende Übersicht der wichtigsten Ergebnisse ist in Tab. 10 dargestellt.

**Tab. 10:** Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich des Einflusses von C1-INH bzw. Heparin auf verschiedene Parameter im Endotoxin-induzierten septischen Schock; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ , \*\* =  $p \leq 0,01$ , \* =  $p \leq 0,05$  (alle im Vergleich zur Vehicle Gruppe)

	<b>C1-INH</b>	<b>Heparin</b>
<b>durchschnittl. Überleben</b>	- 152,6 min**	- 157,7 min**
<b>Hämodynamik</b>	- RR: initial nach Toxingabe Abfall auf $\varnothing$ 65 mmHg, max. Anstieg auf $\varnothing$ 120 mmHg - HF: max. Anstieg nach Toxingabe $\varnothing$ 605 S/min - HKT: max. Anstieg nach Toxingabe auf $\varnothing$ 47 %	- RR: initial nach Toxingabe Abfall auf $\varnothing$ 40 mmHg, max. Anstieg auf $\varnothing$ 101 mmHg - HF: max. Anstieg nach Toxingabe $\varnothing$ 561 S/min - HKT: max. Anstieg nach Toxingabe auf $\varnothing$ 61 %
<b>Histologie</b>	- in allen Organen verringerte Entzündungszeichen im Vergleich zur Vehicle Gruppe	- in Herz, Lunge, Niere verringerte Entzündungszeichen im Vergleich zur Vehicle Gruppe
<b>Protein-expression</b>	- Veränderungen im Vergleich zur Vehicle Gruppe: ▪ HSP-70** u. p38* ↓ ▪ VEGF** u. MFG-E8* ↓ ▪ I $\kappa$ B- $\alpha$ *** ↓	- Veränderungen im Vergleich zur Vehicle Gruppe: ▪ p38 ↓ ▪ VEGF*** u. MFG-E8** ↓ ▪ I $\kappa$ B- $\alpha$ * ↓
<b>MPO-Aktivität</b>	- verringerte MPO-Aktivität aller Organe im Vergleich zur Vehicle-Gruppe	- erhöhte MPO-Aktivität aller Organe im Vergleich zur Vehicle-Gruppe (Herz*, Lunge*)

## 5.4 Limitationen und Methodenkritik

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der experimentellen Untersuchung am LPS-Schockmodell der Ratte. Das bedeutet, dass die am Nagetier gewonnenen Daten allein aufgrund artspezifischer Unterschiede nicht direkt auf den Mensch zu übertragen sind. Es wurden nur männliche Wistar-Ratten verwendet, um eine Verzerrung der Ergebnisse hinsichtlich geschlechtsspezifischer Unterschiede zu vermeiden. Weiterhin hatten die Tiere zuchtbedingt ein ähnliches Alter und Gewicht. Allerdings erkranken im klinischen Alltag sowohl Männer als auch Frauen, Junge und Alte oder Menschen aller Gewichtsklassen an einem septischen Schock. Für eine abschließende Beurteilung der Wirksamkeit eines Medikaments sollten diese Aspekte in Untersuchungen berücksichtigt werden.

Desweiteren werden im klinischen Alltag Infektionen nicht nur durch Endotoxine ausgelöst. Neben Exotoxinen oder Mischinfektionen kommen auch beispielsweise Pilze als Erreger einer Sepsis in Betracht. Möglicherweise zeigen die hier untersuchten Medikamente eine veränderte Wirkung auf die unterschiedlichen Pathogene.

Die in dieser Arbeit gewählten Tierzahlen für die einzelnen Versuchsgruppen ermöglichen bei manchen Untersuchungen aufgrund einer Datenstreuung eine gewisse Unschärfe. Diesem Umstand hätte man nur mit einer deutlichen Steigerung der Gruppenstärken entgegenwirken können. Dadurch wäre der Rahmen der Versuche deutlich überschritten worden.

Die Tatsache, dass die Versuchstiere die Medikamente jeweils kurz vor der Gabe des Endotoxins erhielten, ist ein Umstand, der die Übertragung auf den klinischen Alltag erschwert. In der Regel erfolgt dort eine Sepsis-Therapie erst nach Diagnosesicherung. Eine prophylaktische Behandlung erscheint außerdem aus Gründen, wie die Größe des zu erwartenden Patientenkollektivs im Zusammenhang mit Medikamenten-nebenwirkung oder ökonomischen Aspekten, wenig sinnvoll.

## 5.5 Ausblick

Die gezeigten Ergebnisse, weisen auf einen positiven Effekt von C1-INH auf das Outcome im septischen Schock hin. Es scheint damit den Anforderungen an ein neues Medikament zur Sepsis-Therapie gerecht zu werden. Da andere Arbeiten (Liu D et al., 2007; Fronhoff et al., 2000) ähnliche Resultate präsentierten, sollten weitere Tests mögliche Dosierungen, Nebenwirkungen und genaue Therapieindikationen klären. Dies würde den Grundstein für erfolgreiche klinische Versuche legen. Auch könnte der Gedanke einer Kombination von verschiedenen Serin-Protease-Inhibitoren wie C1-INH und Aprotinin weitergeführt werden. Möglicherweise lässt sich so der antientzündliche Effekt verstärken und damit das Outcome verbessern.

Entsprechend der hier vorliegenden Ergebnisse bleibt trotz der verlängerten Überlebenszeit der positive Einfluss von Heparin im septischen Schock fraglich. Hierzu sollte weitere Grundlagenforschung betrieben werden, um eine endgültige Aussage für einen möglichen Einsatz in der kausalen Sepsis-Therapie treffen zu können.

## 6. Zusammenfassung

Mit Mortalitätsraten je nach Schweregrad um 50 % stellt die Sepsis die dritthäufigste Todesursache auf Intensivstationen dar. Damit bleibt, trotz weitreichender medizinischer Fortschritte, die Behandlung dieser systemischen Krankheit ein zentrales Thema. Nachdem vielversprechende Behandlungsansätze nach aktueller Studienlage keinen eindeutigen Überlebensvorteil in der schweren Sepsis zeigen konnten, war es die Aufgabe dieser Arbeit die Grundlagen für ein neues potientes Medikament im Kampf gegen diese oft tödliche Erkrankung zu schaffen.

Dafür wurde männlichen Wistar-Ratten mittels LPS (10 mg/kg KG) ein septischer Schock induziert und in der Versuchsgruppe LPS Shock + Vehicle der Effekt von LPS bzw. in den Gruppen LPS Shock + C1-INH (100 units/kg Kg) und LPS Shock + Heparin (200 units/kg KG) zusätzlich der Einfluss des jeweiligen Medikaments untersucht. Während der maximal 4 stündigen Versuchsphase erfolgte die Erfassung verschiedener hämodynamischer Parameter (MABP, HF, HKT) und der Überlebenszeit. Es schloss sich die Organentnahme und deren labortechnische Aufarbeitung bezüglich MPO-Aktivität, Proteinexpression und Histologie an.

Die Tiere, die neben LPS zusätzlich C1-INH (152,6 min) bzw. Heparin (157,7 min) erhielten, zeigten gegenüber der LPS Shock + Vehicle Gruppe (77,1 min) ein signifikant verlängertes Überleben ( $p \leq 0,01$ ). In den beiden SHAM Gruppen, die allein das jeweilige Medikament erhielten, war keine wesentliche Beeinflussung der Überlebenszeit erkennbar. Bezüglich der hämodynamischen Parameter und der MPO-Aktivität, die das Ausmaß der Entzündung quantifizierte, konnte C1-INH das Ergebnis günstig beeinflussen. Heparin zeigte in der LPS Shock + Heparin Gruppe diesbezüglich im Vergleich zu den Tieren, die allein LPS erhielten, einen eher negativen Effekt. In den histologischen Präparaten waren in den LPS Shock + Medikament Gruppen verminderte Entzündungszeichen zu sehen. Auch bei der Untersuchung der Expressionsveränderung verschiedener Proteine konnten beide Pharmaka zum Teil ein signifikant besseres Ergebnis erzielen als die LPS Shock + Vehicle Gruppe. So waren in den durchgeführten Untersuchungen die Konzentrationen für VEGF, ein Marker für die Perfusion, und p38, ein Maß für den Zellstress, bei den Tieren, die neben LPS noch C1-INH oder Heparin erhielten, teilweise signifikant verringert.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse für C1-INH zeigte sich ein positiver Einfluss im septischen Schock z.B. hinsichtlich des Ausmaßes der Entzündung und der Endotheldysfunktion. Dieser Ansatz sollte weiter verfolgt werden. Trotz einer signifikanten Verbesserung der Überlebenszeit kann für Heparin aufgrund der Resultate z.B. in der Hämodynamik nur bedingt eine Empfehlung ausgesprochen werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- Angus DC**, Linde-Zwirble W, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR: Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* (2001); 29 (7): 1303-10
- Annane D**, Aegerter P, Jars-Guincestre MC, Guidet B: Current Epidemiology of Septic Shock. *Am J Respir Crit Care Med* (2003); 168 (2): 165-72
- Ansorge F**: Immunsystem. In: Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC (Hrsg.): *Biochemie & Pathobiochemie*. 8.Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2007, S. 1104-40
- Baldus S**, Rudolph V, Roiss M, Ito WD, Rudolph TK, Eiserich JP, Sydow K, Lau D, Szöcs K, Klinke A, Kubala L, Berglund L, Schrepfer S, Deuse T, Haddad M, Risius T, Klemm H, Reichenspurner HC, Meinertz T, Heitzer T: Heparins Increase Endothelial Nitric Oxide Bioavailability by Liberating Vessel-Immobilized Myeloperoxidase. *Circulation* (2006); 113 (15): 1871-8
- Barochia AV**, Li Y, Cui X, Sweeney DA, Natanson C, Eichacker PQ: Antithrombosis Trials: Should we test therapeutic heparin adjusted based on activated partial thromboplastin time in septic shock? *Crit Care Med* (2009); 37 (4): 1486-7
- Becker A**, Rosenthal EJK: Antibiotika-Empfindlichkeit von Sepsis-Erregern 2006–2007. *Chemother J* (2010); 19: 28-39
- Beinrohr L**, Harmat V, Dobo J, Lörincz Z, Gál P, Závodszy P: C1 Inhibitor Serpin Domain Structure Reveals the Likely Mechanism of Heparin Potentiation and Conformational Disease. *J Biol Chem* (2007); 282 (29): 21100-9
- Bellomo R**, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P, ADQI workgroup: Acute renal failure – definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care* (2004); 8 (4): 204-12
- Benjamin JE**, Gill S, Negrin RS: Biology and clinical effects of natural killer cells in allogeneic transplantation. *Curr Opin Oncol* (2010); 22 (2): 130–7
- Bhole D**, Stahl GL: Therapeutic potential of targeting the complement cascade in critical care medicine. *Crit Care Med* (2003); 31 (1): 97-104
- Blanco J**, Muriel-Bombin A, Sagredo V, Taboada F, Gandia F, Tamayo L, Collado J, Garcia-Labattut A, Carriedo D, Valledor M, De Frutos M, Lopez M-J, Caballero A, Guerra J, Alvarez B, Mayo A, Villar J: Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Crit Care* (2008); 12 (6): R158
- Bodmann KF**, Grabein B, Expertenkommission des Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.: Empfehlung zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen. *Chemother J* (2010); 19 (6): 179-255
- Bradley PP**, Christensen RD, Rothstein G: Cellular and Extracellular Myeloperoxidase in Pyogenic Inflammation. *Blood* (1982); 60 (3): 618-22
- Buerke M**, Prüfer D, Dahm M, Oelert H, Meyer J, Darius H: Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury. *J Pharmacol Exp Ther* (1998); 286 (1): 429-38
- Buerke M**, Pruefer D, Sankat D, Carter JM, Buerke U, Russ M, Schlitt A, Friedrich I, Börgermann J, Vahl CF, Werdan K: Effects of Aprotinin on Gene Expression and Protein Synthesis After Ischemia and Reperfusion in Rats. *Circulation* (2007); 116 (11): 121-6
- Buerke M**, Schwertz H, Seitz W, Meyer J, Darius H: Novel Small Molecule Inhibitor of C1s Exerts Cardioprotective Effects in Ischemia-Reperfusion Injury in Rabbits. *J Immunol* (2001); 167 (9): 5375-80
- Burchardi H**, Larsen R, Schuster HP, Suter PM: *Die Intensivmedizin*. 9.Auflage, Springer Verlag, 2004, S.940
- Burgis E**: *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pharmakologie*. 4. Aufl., Elsevier GmbH, München, 2008, S. 232-5
- Caliezi C**, Wuillemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE: C1-Esterase Inhibitor: An Anti-Inflammatory Agent and Its Potential Use in the Treatment of Diseases Other Than Hereditary Angioedema. *Pharmacol Rev* (2000); 52 (1): 91-112

- Caliezi C**, Zeerleder S, Redondo M, Regli B, Rothen HU, Zürcher-Zenkhusen R, Rieben R, Devay J, Hack CE, Lämmle B, Wuillemin WA: C1-inhibitor in patients with severe sepsis and septic shock: Beneficial effect on renal dysfunction. *Crit Care Med* (2002); 30(8): 1722-8
- Carter JM**, Buerke U, Rössner E, Russ M, Schubert S, Schmidt H, Ebelt H, Pruefer D, Schlitt A, Werdan K, Buerke M: Anti-inflammatory actions of aprotinin provide dose-dependent cardioprotection from reperfusion injury. *Br J Pharmacol* (2008); 155(1): 93-102
- Casthely PA**, Defilippi V, Cornwell L, Samuel Z, Yoganathan T, Komer C, Cisbarros S, Acevedo A: Preoperative Heparin Therapy Causes Immune-Mediated Hypotension Upon Heparin Administration for Cardiac Surgery. *J Cardiothorac Vasc Anesth* (2010); 24 (1): 69-72
- Cauwels A**, Brouckaert P: Nitrite regulation of shock. *Cardiovasc Res* (2011); 89(3): 553-9
- Chuang KI**, Leung BL, Hsu N, Harris HW: Heparin protects against septic mortality via apoE-antagonism. *Am J Surg* (2010); 202 (3): 325-35
- Chung SW**, Lee M, Bae SM, Park J, Jeon OC, Lee HS, Choe H, Kim HS, Lee BS, Park RW, Kim SY, Byun Y: Potentiation of anti-angiogenic activity of heparin by blocking the ATIII- interacting pentasaccharide unit and increasing net anionic charge. *Biomaterials* (2012); 33 (35): 9070-9
- Cicardi M**, Zingale LC: The deficiency of C1 inhibitor and its treatment. *Immunobiology* (2007); 212 (4-5): 325-31
- Cook JA**, Wise WC, Halushka PV: Protective effect of a selective leukotriene antagonist in endotoxemia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* (1985); 235 (2): 470-4
- Craig TJ**, Bewtra AK, Bahna SL, Hurewitz D, Schneider LC, Levy RJ, Moy JN, Offenberger J, Jacobson KW, Yang WH, Eidelman F, Janss G, Packer FR, Rojavin MA, Machnig T, Keinecke HO, Wasserman RL: C1 esterase inhibitor concentrate in 1085 Hereditary Angioedema attacks – final results of the I.M.P.A.C.T.2 study. *Allergy* (2011); 66 (12): 1604-11
- Cuzzocrea S**, Mazzon E, Di Paola R, Esposito E, Macarthur H, Matuschak GM, Salvemini D: A Role for Nitric Oxide-Mediated Peroxynitrite Formation in a Model of Endotoxin-Induced Shock. *J Pharmacol Exp Ther* (2006); 319 (1): 73-81
- Dalle Lucca JJ**, Li Y, Simovic M, Pusateri AE, Falabella M, Dubick MA, Tsokos GC: Effects of C1 inhibitor on tissue damage in a porcine model of controlled hemorrhage. *Shock* (2012); 38 (1): 82-91
- Davis AE**, Mejia P, Lu F: Biological activities of C1 Inhibitor. *Mol Immunol* (2008); 45 (16): 4057-63
- de Zwaan C**, Kleine AH, Diris JH, Glatz JF, Wellens HJ, Strengers PF, Tissing M, Hack CE, van Dieijen-Visser MP, Hermens WT: Continuous 48-h C1-inhibitor treatment, following reperfusion therapy, in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J* (2002); 23 (21): 1670-7
- DeClue AE**, Williams KJ, Sharp C, Haak C, Lechner E, Reinero CR: Systemic response to low-dose endotoxin infusion in cats. *Vet Immunol Immunopathol* (2009); 132(2-4): 167-74
- Diehm C**, Stammler F, Amendt K: Die tiefe Venenthrombose. *Diagnostik und Therapie. Deutsches Ärzteblatt* (1997); 94 (6): A301-11
- Ding R**, Zhao D, Guo R, Zhang Z, Ma X: Treatment with unfractionated heparin attenuates coagulation and inflammation in endotoxemic mice. *Thromb Res* (2011); 128 (6): 160-5
- Dodeller F**, Schulze-Koops H: The p38 mitogen-activated protein kinase signaling cascade in CD4 T cells. *Arthritis Res Ther* (2006); 8 (2): 1-11
- Dorresteyn MJ**, Visser T, Cox LAE, Bouw MP, Pillay J, Koenderman AHL, Strengers PFW, Leenen LPH, van der Hoeven JG, Koenderman L, Pickkers, P: C1-esterase inhibitor attenuates the inflammatory response during human endotoxemia. *Crit Care Med* (2010); 38 (11): 2139-45
- Ebelt H**, Werdan K: Septischer Kreislaufschock und septische Kardiomyopathie. *Med Klin Intensivmed Notfmed* (2012); 107: 24-8
- Ehrnthaller C**, Ignatius A, Gebhard F, Huber-Lang M: New Insights of an Old Defense System: Structure, Function, and Clinical Relevance of the Complement System. *Mol Med* (2011); 17 (3-4): 317-29

- Engel C**, Brunkhorst FM, Bone H-G, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K: Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* (2007); 33 (4): 606-18
- Esmon CT**: Coagulation and inflammation. *J Endotoxin Res* (2003); 9 (3): 192-8
- Esmon CT**: Introduction: are natural anticoagulants candidates for modulating the inflammatory response to endotoxin? *Blood* (2000); 95 (4): 1113-6
- Fachinformation** CSL Behring Berinert® (2011); Stand 12.05.2012, 19:00Uhr; <http://www.cslbehring.de/docs/919/347/Berinert,1.pdf>
- Fattouch K**, Bianco G, Speziale G, Sampognaro R, Lavallo C, Guccione F, Dioguardi P, Ruvolo G: Beneficial effects of C1 esterase inhibitor in ST-elevation myocardial infarction in patients who underwent surgical reperfusion: a randomised double-blind study. *Eur J Cardiothorac Surg* (2007); 32 (2): 326-32
- Ferri LE**, Pascual J, Seely AJE, Giannias B, Christou NV: Intra-abdominal sepsis attenuates local inflammation-mediated increases in microvascular permeability at remote sites in mice in vivo. *Surgery* (2004); 135 (2): 187-95
- Finfer S**, Bellomo R, Lipman J, French C, Dobb G, Myburgh J: Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med* (2004); 30 (4): 589-96
- Förstermann U**, Sessa WC: Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J* (2012); 33 (7): 829-37
- Fox S**, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG: Neutrophil Apoptosis: Relevance to the Innate Immune Response and Inflammatory Disease. *J Innate Immun* (2010); 2: 216–27
- Frank U**, Ebner W: *Antibiotika am Krankenbett*. 15. Auflage, Springer-Verlag GmbH, 2010, S. 183-5
- Fronhoffs S**, Luyken J, Steuer K, Hansis M, Vetter H, Walger P: The effect of C1-esterase inhibitor in definite and suspected streptococcal toxic shock syndrome. Report of seven patients. *Intensive Care Med* (2000); 26 (10): 1566-70
- Fu J**, Lin G, Wu Z, Ceng B, Wu Y, Liang G, Qin G, Li J, Chiu I, Liu D: Anti-apoptotic role for C1 inhibitor in ischemia/reperfusion-induced myocardial cell injury. *Biochem Biophys Res Commun* (2006); 349 (2): 504-12
- Gan LY**, Yu ZY, Cai MS, Zhao HP, Li X: Effects of low molecular weight heparin on vascular endothelial growth factor expression of early diabetic nephropathy. *Beijing Da Xue Xue Bao* (2005); 37 (4): 382-5
- Gaut JP**, Yeh GC, Tran HD, Byun J, Henderson JP, Richter GM, Brennan ML, Lulis AJ, Belaouaj A, Hotchkiss RS, Heinecke JW: Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001); 98 (21): 11961-6
- Gedik HZ**, Korkmaz K, Erdem H, Karakilic E, Lafci G, Ankarali H: Protective effect of heparin in the end organ ischemia/reperfusion injury of the lungs and heart. *J Cardiothorac Surg* (2012); 7 (1): 123
- Gelain DP**, de Bittencourt Pasquali MA, Comim CM, Grunwald MS, Ritter C, Tomasi CD, Alves SC, Quevedo J, Dal-Pizzol F, Fonseca Moreira JC: Serum Heat Shock Protein 70 Levels, Oxidant Status and Mortality in Sepsis. *Shock* (2011); 35 (5): 466-70
- Geroulanos S**, Douka ET: Historical perspective of the word "sepsis". *Intensive Care Med* (2006); 32 (12): 2077
- Greinacher A**, Weber AA: Therapie mit Antikoagulanzen, Thrombozytenfunktionshemmern und Thrombolytika. In: Lemmer B, Brune K (Hrsg): *Pharmakotherapie Klinische Pharmakologie*. 14. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2010, S. 110-3
- Guerrero R**, Velasco F, Rodriguez M, Lopez A, Rojas R, Alvarez MA, Villalba R, Rubio V, Torres A, del Castillo D: Endotoxin-induced Pulmonary Dysfunction is Prevented by C1-Esterase Inhibitor. *J Clin Invest* (1993); 91 (6): 2754-60
- Guo Z**, Wang S, Jiao Q, Xu M, Xu Z: Soluble TNFR II/IgG1 Fc fusion protein treatment in the LPS-mediated septic shock of rats. *Biomed Pharmacother* (2009); 63 (7): 537-42

- Haller M**, Kaufmann I, Schelling G: Nierenfunktionsstörung und Nierenersatztherapie. In: Kretz JF, Teufel F (Hrsg.): Anästhesie und Intensivmedizin. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2006, S. 564-7
- Hauber HP**, Zabel P: Pathophysiologie und Keimspektrum der Sepsis. *Internist* (2009); 50: 779-87
- Hecker M**, Seeger W, Mayer K: Die Berlin-Definition - Neue Kriterien und Klassifikation des ARDS. *Med Klin Intensivmed Notfmed* (2012); 107 (6): 488-90
- Henrich M**, Gruss M, Weigand MA: Sepsis-Induced Degradation of Endothelial Glycocalyx. *ScientificWorldJournal* (2010); 10: 917-23
- Herold G**, Mitarbeiter: Innere Medizin. Köln, 2010; a: S. 538-9; b: S. 558-9; c: S. 785-93
- Heusel JW**, Ballas ZK: Natural killer cells: emerging concepts in immunity to infection and implications for assessment of immunodeficiency. *Curr Opin Pediatr* (2003);15(6): 586-93
- Hof H**, Dörries R, Geginat G: Medizinische Mikrobiologie. 4.Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 2009, S. 47-133
- Hoque AM**, Papapetropoulos A, Venema RC, Catravas JD, Fuchs LC: Effects of antisense oligonucleotide to iNOS on hemodynamic and vascular changes induced by LPS. *Am J Physiol* (1998); 275(3 Pt 2): 1078-83
- Huber-Lang MS**, Sarma VJ, Lu KT, McGuire SR, Padgaonkar VA, Guo R-F, Younkin EM, Kunkel RG, Ding J, Erickson R, Curnutte JT, Ward PA: Role of C5a in Multiorgan Failure During Sepsis. *J Immunol* (2001); 166: 1193-9
- Huber-Lang MS**, Younkin EM, Sarma VJ, McGuire SR, Lu KT, Guo RF, Padgaonkar VA, Curnutte JT, Erickson R, Ward PA: Complement-Induced Impairment of Innate Immunity During Sepsis. *J Immunol* (2002); 169: 3223-31
- Igonin AA**, Protsenko DN, Galstyan GM, Vlasenko AV, Khachatryan NN, Nekhaev IV, Shlyapnikov SA, Lazareva NB, Herscu P: C1-esterase inhibitor infusion increases survival rates for patients with sepsis. *Crit Care Med* (2012); 40 (3): 770-7
- Ince C**: The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care* (2005); 9 (suppl 4): 13-9
- Jaimes F**, De La Rosa G, Morales C, Fortich F, Arango C, Aguirre D, Munoz A: Unfractionated heparin for treatment of sepsis: A randomized clinical trial (The HETRASE Study). *Crit Care Med* (2009); 37 (4): 1185-96
- Jansen PM**, Eisele B, de Jong IW, Chang A, Delvos U, Taylor Jr. FB, Hack CE: Effect of C1 Inhibitor on Inflammatory and Physiologic Response Patterns in Primates Suffering from Lethal Septic Shock. *J Immunol* (1998); 160: 475-84
- Jobim M**, Jobim LF: Natural killer cells and immune surveillance. *J Pediatr (Rio J)* (2008); 84 (4): 58-67
- Karlsson S**, Pettila V, Tenhunen J, Lund V, Hovilehto S, Ruokonen E: Vascular Endothelial Growth Factor in Severe Sepsis and Septic Shock. *Anesth. Analg* (2008); 106 (6): 1820-6
- Karlsson S**, Varpula M, Ruokonen E, Pettilä V, Parviainen I, Ala-Kokko TI, Kolho E, Rintala EM: Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study. *Intensive Care Med* (2007); 33 (3): 435-43
- Kauss IAM**, Cintia MCG, Cardoso LTQ, Anami EHT, Nunes LB, Ferreira GL, Matsuo T, Bonametti AM: The epidemiology of sepsis in a Brazilian teaching hospital. *Braz J Infect Dis* (2010); 14(3): 264-70
- Kawai T**, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* (2010); 11 (5): 373-84
- Komura H**, Miksa M, Wu R, Goyert SM, Wang P: Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor-Factor VIII Is Down-Regulated in Sepsis via the Lipopolysaccharide-CD14 Pathway. *J Immunol* (2009); 182: 581-7
- Kreymann G**, Wolf M: Geschichte und Definition der Sepsis- Brauchen wir eine neue Terminologie? *Anästhesiol, Intensivmed, Notfallmed, Schmerzther* (1996); 31 (1): 9-14
- Kumar A**, Roberts D, Wood KE, et al: Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* (2006); 34: 1589 -96
- Kumar A**, Venkateswarlu T, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE: Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Interleukin  $1\beta$  are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by Human septic shock. *J Exp Med* (1996); 183 (3): 949-58

- Küpper S**, Mees ST, Gassmann P, Brodde MF, Kehrel B, Haier J: Hydroxyethyl starch normalizes platelet and leukocyte adhesion within pulmonary microcirculation during LPS-induced endotoxemia. *Shock* (2007); 28 (3): 300-8
- Lever R**, Hoult JRS, Page CP: The effects of heparin and related molecules upon the adhesion of human polymorphonuclear leucocytes to vascular endothelium in vitro. *Br J Pharmacol* (2000); 129 (3): 533-40
- Li S**, Chen X, Wu T, Zhang M, Zhang x, Ji Z: Role of heparin on serum VEGF levels and local VEGF contents in reducing the severity of experimental severe acute pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol* (2012); 47 (2): 237-44
- Li X**, Zheng Z, Li X, Ma X: Unfractionated heparin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through blocking p38 MAPK and NF- $\kappa$ B activation on endothelial cell. *Cytokine* (2012); 60 (1): 114-21
- Liu CY**, Mueller MH, GrundyD, Kreis ME: Vagal modulation of intestinal afferent sensitivity to systemic LPS in the rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2007); 292 (5): 1213-20
- Liu D**, Cai S, Gu X, Scafidi J, Wu X, Davis III AE: C1 Inhibitor Prevents Endotoxin Shock Via a Direct Interaction with Lipopolysaccharide. *J Immunol* (2003); 171: 2594-601
- Liu D**, Lu F, Qin G, Fernandes SM, Li J, Davis AE: C1 Inhibitor-Mediated Protection from Sepsis. *J Immunol* (2007); 179: 3966-72
- Liu D**, Zhang D, Scafidi J, Wu X, Cramer CC, Davis III AE: C1 inhibitor prevents Gram-negative bacterial lipopolysaccharide-induced vascular permeability. *Blood* (2005); 105(6): 2350-5
- Lu F**, Fernandes SM, Davis AE: The role of the complement and contact systems in the dextran sulfate sodium-induced colitis model: the effect of C1 inhibitor in inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2010); 298 (6): 878-83
- Lüllmann H**, Mohr K, Hein L: *Pharmakologie und Toxikologie*, Georg Thieme Verlag KG, 17. Auflage, Stuttgart, 2010, S. 195-7
- Majdalawieh A**, Ro H-S: Regulation of I $\kappa$ B $\alpha$  Function and NF- $\kappa$ B Signaling: AEBP1 Is a Novel Proinflammatory Mediator in Macrophages. *Mediators Inflamm* (2010); 2010: 1-27
- Martin GS**, Mannino DM, Eaton S, Moss M: The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* (2003); 348 (16): 1546-54.
- Martin MA**, Silverman HJ: Gram-negative sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Clin Infect Dis* (1992); 14 (6):1213-28
- Marzi I**: Bedeutung der Leber für den Verlauf des SIRS nach Schock, Trauma und bei Sepsis. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzth* (1994); 29 (1): 41-6
- Matera G**, Cook JA, Hennigar RA, Tempel GE, Wise WC, Oglesby TD, Halushka PV: Beneficial effects of a 5-lipoxygenase inhibitor in endotoxic shock in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* (1988); 247(1): 363-71
- Matsuda A**, Wu R, Jacob A, Komura H, Zhou M, Wang Z, Aziz M, Wang P: Protective effect of milk fat globule-epidermal growth factor-factor VIII after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *Crit Care Med* (2011); 39 (9): 2039-47
- Matsui E**, Kitamura K, Yoshida M, Kato J, Asada Y, Sumiyoshi A, Eto T: Biosynthesis and Secretion of Adrenomedullin and Proadrenomedullin N-terminal 20 peptide in a Rat Model of Endotoxin Shock. *Hypertens Res* (2001); 24 (5): 543-9
- Matthay MA**, Zemans RL: The Acute Respiratory Distress Syndrome: Pathogenesis and Treatment. *Annu Rev Pathol* (2011); 6: 147-63
- Miksa M**, Wu R, Dong W, Das P, Yang D, Wang P: Dendritic cell-derived exosomes containing milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII attenuate proinflammatory responses in sepsis. *Shock* (2006); 25 (6): 586-93
- Miksa M**, Wu R, Dong W, Komura H, Amin D, Ji Y, Wang Z, Wang H, Ravikumar TS, Tracey KJ, Wang P: Immature Dendritic Cell-Derived Exosomes Rescue Septic Animals Via Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor VIII. *J Immunol* (2009); 183: 5983-90
- Moerer O**, Burchardi H: Kosten der Sepsis. *Anaesthesist* (2006); 55 (1): 36-42
- Mohamed KM**, Le A, Duong H, Wu Y, Zhang Q, Messadi DV: Correlation between VEGF and HIF-1 $\alpha$  expression in human oral squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* (2004); 76 (2): 143-52

- Mu E, Ding R, An X, Li X, Chen S, Ma X:** Heparin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting nitric oxide synthase and TGF- $\beta$ /Smad signaling pathway. *Thromb Res* (2012); 129 (4):479-85
- Müller-Werdan U, Schumann H, Loppnow H, Fuchs R, Darmer D, Stadler J, Holtz J, Werdan K:** Endotoxin and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Exert a Similar Proinflammatory Effect in Neonatal Rat Cardiomyocytes, but have Different Cardiodepressant Profiles. *J Mol Cell Cardiol* (1998); 30 (5): 1027–36
- Müller-Werdan U, Schuster HP:** Abriss der Pathophysiologie als Grundlage der Therapie. In: Werdan K, Schuster HP, Müller-Werdan U (Hrsg.): Sepsis und MODS. 4.Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005, S. 23-62
- Okazaki R, Iwasaki Y, Miyauchi Y, Hirayama Y, Kobayashi Y, Katoh T, Mizuno K, Sekiguchi A, Yamashita T:** Lipopolysaccharide Induces Atrial Arrhythmogenesis via Down-Regulation of L-Type Ca<sup>2+</sup> Channel Genes in Rats. *Int Heart J* (2009);50(3): 353-63
- Paredes-Gamero EJ, Medeiros VP, Farias EHC, Justo GZ, Trindade ES, Andrade-Lopes AL, Godinho RO, de Miranda A, Ferreira AT, Tersariol ILS, Nader HB:** Heparin Induces Rat Aorta Relaxation via Integrin-Dependent Activation of Muscarinic M3 Receptors. *Hypertension* (2010); 56 (4): 713-21
- Polderman KH, Girbes ARJ:** Drug intervention trials in sepsis: divergent results. *Lancet* (2004); 363 (9422): 1721-3
- Radke A, Mottaghy K, Goldmann C, Khorram-Sefat R, Kovacs B, Janssen A, Klosterhalfen B, Hafemann B, Pallua N, Kirschfink M:** C1 inhibitor prevents capillary leakage after thermal trauma. *Crit Care Med* (2000); 28 (9):3224-32
- Rajabi M, Struble E, Zhou Z, Karnaukhova E:** Potentiation of C1-esterase inhibitor by heparin and interactions with C1s protease as assessed by surface plasmon resonance. *Biochim Biophys Acta* (2012); 1820 (1): 56-63
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Gründling M, John S, Kern W, Kreymann G, Krüger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stüber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T:** Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis. *Anaesthesist* (2010); 59 (4): 347-70
- Reithmann C, Hallström S, Pilz G, Kapsner T, Schalg G, Werdan K:** Desensitization of rat cardiomyocyte adenylyl cyclase stimulation by plasma of noradrenaline-treated patients with septic shock. *Circ Shock* (1993); 41 (1): 48-59
- Schiffer ERC, Reber G, de Moerloose P, Morel DR:** Evaluation of unfractionated heparin and recombinant hirudin on survival in a sustained ovine endotoxin shock model. *Crit Care Med* (2002); 30 (12): 2689-99
- Schuster HP, Müller-Werdan U:** Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen. In: Werdan K, Schuster HP, Müller-Werdan U (Hrsg.): Sepsis und MODS. 4.Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005, S. 3-9
- Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci N:** Sepsis-Associated Disseminated Intravascular Coagulation and Thromboembolic Disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis* (2010); 2 (3): e2010024
- Shapiro NI, Yano K, Okada H, Fischer C, Howell M, Spokes KC, Ngo L, Angus DC, Aird WC:** A prospective, observational study of soluble FLT-1 and vascular endothelial growth factor in sepsis. *Shock* (2008); 29 (4): 452-7
- Shen L, Mo H, Cai L, Kong T, Zheng W, Ye J, Qi J, Xiao Z:** Losartan prevents sepsis-induced acute lung injury and decreases activation of nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinases. *Shock* (2009); 31(5): 500-6
- Shin JS, Park SJ, Ryu S, Kang HB, Kim TW, Choi JH, Lee JY, Cho YW, Lee KT:** Potent anti-inflammatory effect of a novel furan-2,5-dione derivative, BPD, mediated by dual suppression of COX-2 activity and LPS-induced inflammatory gene expression via NF- $\kappa$ B inactivation. *Br J Pharmacol* (2012); 165 (6):1926-40
- Silvestre JS, Théry C, Hamard G, Boddart J, Aguilar B, Delcayre A, Houbbron C, Tamarat R, Blanc-Brude O, Heeneman S, Clergue M, Duriez M, Merval R, Lévy B, Tedgui A, Amigorena S, Mallat Z:** Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med* (2005); 11 (5): 499-506

- Singer M, Jones AM:** Bench-to-bedside review: The role of C1-esterase inhibitor in sepsis and other critical illnesses. *Crit Care* (2011); 15 (203): 1-9
- Sonntag J, Wagner MH, Liu G, Vogel M, Walka M, Maier RF:** Effect of C1-Inhibitor in a Rat Model of Necrotizing Enterocolitis. *Biol Neonate* (1999); 76 (4): 235-41
- Stone KD, Prussin C, Metcalfe DD:** IgE, Mast Cells, Basophils, and Eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* (2010); 125 (2): 73-80
- Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER:** Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* (2010); 31 (8): 318-24
- Sun HM, Shi Y, Song Y, Lin XQ, Shen XK, Hong LZ:** Effect of heparin upon inflammatory reaction of endotoxin-induced acute lung injury in rat. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* (2009); 89 (38): 2722-5
- Susic D, Mandal AK, Kentera D:** Heparin lowers the blood pressure in hypertensive rats. *Hypertension* (1982); 4 (5): 681-5
- Taube C:** Pharmaka mit Wirkung auf Blutgerinnung. In: Oberdisse E, Hackenthal E, Kuschinsky K (Hrsg): *Pharmakologie und Toxikologie*. 3.Auflage, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 2002, S.449-50
- Tei R, Kaido T, Nakase H, Sakaki T:** Protective effect of C1 esterase inhibitor on acute traumatic spinal cord injury in the rat. *Neurol Res* (2008); 30 (7): 761-7
- Tsai YC, Cheng PY, Kung CW, Peng YJ, Ke TH, Wang JJ, Yen MH:** Beneficial effects of magnolol in a rodent model of endotoxin shock. *Eur J Pharmacol* (2010); 641 (1): 67-73
- Tsushima K, King LS, Aggarwal NR, De Gorordo A, D'Alessio FR, Kubo K:** Acute Lung Injury Review. *Intern Med* (2009); 48 (9): 621-30
- Uchiba M, Okajima K, Murakami K, Okabe H, Takatsuki K:** Endotoxin-induced pulmonary vascular injury is mainly mediated by activated neutrophils in rats. *Thromb Res* (1995); 78 (2): 117-25
- van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VWM:** Targets for pharmacological intervention of endothelial hyperpermeability and barrier function. *Vascul Pharmacol* (2002); 39 (4-5): 257-72
- Vesteinsdottir E, Karason S, Sigurdsson E, Gottfredsson M, Sigurdsson GH:** Severe sepsis and septic shock: a prospective population-based study in Icelandic intensive care units. *Acta Anaesthesiol Scand* (2011); 55(6): 722-31
- Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le Gall J-R, Payen D:** Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study. *Crit Care Med* (2006); 34 (2): 344-53
- Wang P, Ba ZF, Reich SS, Zhou M, Holme KR, Chaudry IH:** Effects of nonanticoagulant heparin on cardiovascular and hepatocellular function after hemorrhagic shock. *Am J Physiol* (1996); 270 (4 Pt 2): 1294-302
- Ward PA:** The Harmful Role of C5a on Innate Immunity in Sepsis. *J Innate Immun* (2010); 2: 439-45
- Werdan K, Buerke M, Kuhn C, Müller-Werdan U, Schuster HP:** Systematik der Therapie bei Sepsis und Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS). In: Werdan K, Schuster HP, Müller-Werdan U (Hrsg.): *Sepsis und MODS*. 4.Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 2005, S. 89-90
- Wilson JX, Young GB:** Sepsis-Associated Encephalopathy: Evolving Concepts. *Can J Neurol Sci* (2003); 30 (2): 98-105
- Wynn J, Cornell TT, Wong HR, Shanley TP, Wheeler DS:** The Host Response to Sepsis and Developmental Impact. *Pediatrics* (2010); 125 (5): 1031-41
- Yano K, Liaw PC, Mullington JM, Shih SC, Okada H, Bodyak N, Kang PM, Tolti L, Belikoff B, Buras J, Simms BT, Mizgerd JP, Carmeliet P, Karumanchi SA, Aird WC:** Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality. *J Exp Med* (2006); 203 (6): 1447-58
- Zarychanski R, Doucette S, Fergusson D, Roberts D, Houston DS, Sharma S, Gulati H, Kumar A:** Early intravenous unfractionated heparin and mortality in septic shock. *Crit Care Med* (2008); 36 (11): 2973-9
- Zhang H, Qin G, Liang G, Li J, Chiu I, Barrington RA, Liu D:** Suppression of complement regulatory protein C1 inhibitor in vascular endothelial activation by inhibiting vascular cell adhesion molecule-1 action. *Biochem Biophys Res Commun* (2007); 358 (4): 1120-7

## 8. Thesen

Anhand der dargestellten und diskutierten Ergebnisse erfolgt nun die Auswertung der unter Kapitel 2 aufgestellten Thesen:

1. Das gewählte Tiermodell zusammen mit der Endotoxinkonzentration eignet sich, übereinstimmend mit der Literatur, einen septischen Schock zu induzieren und zu untersuchen.
2. Die Gabe von C1-INH (152 min) bzw. Heparin (158 min) führt zu einem signifikant verlängerten Überleben im septischen Schock gegenüber den Tieren, die allein LPS erhielten (77 min).
3. C1-INH wirkt sich im Verlauf des septischen Schocks in Form eines geringeren Anstiegs des Hämatokrits günstig auf einen Endothelschaden aus.
4. Von einer Verbesserung der Mikrozirkulation und damit einer günstigeren Perfusion der Organe durch C1-INH im septischen Schock ist u.a. aufgrund der verminderten Expression des Proteins VEGF auszugehen.
5. Die Auswertung der MPO-Untersuchungen und der histologischen Schnitte zeigen eine geringere Aktivität von Entzündungszellen in der LPS Shock + C1-INH Gruppe.
6. Bezüglich des mittleren arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz, ist ein günstigerer Einfluss von C1-INH auf die Hämodynamik im septischen Schock im Vergleich zur Vehicle Gruppe zu beobachten.
7. Anhand der verminderten VEGF-Expression, ein Marker für die Perfusion und O<sub>2</sub>-Versorgung der Organe, in der LPS Shock + Heparin Gruppe muss von einer verbesserten Sauerstoffversorgung gegenüber der Vehicle Gruppe ausgegangen werden. Dies steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen bezüglich der Hämodynamik und der MPO-Aktivität.
8. Nach Auswertung der histologischen Untersuchungen kann die These einer anti-entzündlichen Eigenschaft des Heparins bestätigt werden. Jedoch sprechen MPO-Aktivität und der deutliche Anstieg des Hämatokrits in der LPS Shock + Heparin Gruppe gegen diese Annahme.
9. Heparin kann den Zellstress, in dieser Arbeit durch das Protein p38 gemessen, vor allem in der Leber reduzieren.
10. Der Blutdruck fiel initial nach LPS-Gabe in der LPS Shock + Heparin Gruppe noch stärker ab als in der Vehicle Gruppe und passte sich im Verlauf nie wieder denen der SHAM Gruppe an. Somit hat Heparin keinen günstigen Einfluss auf die Hämodynamik.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

- Name: Frederic Putzschke
- Adresse: Streiberstraße 21; 06110 Halle
- Geburtsdatum: 31.07.1987
- Geburtsort: Karl-Marx-Stadt
- Familienstand: verheiratet

### Schulbildung

- 1993 - 1997 Besuch der Grundschule Lunzenau
- 1997 - 2005 Besuch des Gymnasiums Burgstädt
- 07/2005 Abitur (Durchschnittsnote: 1,6)

### Grundwehrdienst

- 10/2005 - 06/2006 Panzeraufklärungsbatallion 13 in Gotha

### Hochschulausbildung

- 10/2007 - 10/2013 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- 09/2009 1. Staatsexamen (Durchschnittsnote: 2,0)
- 08/2010 - 07/2012 studentische Hilfskraft auf der herz-/thoraxchirurgischen Intensivstation im Universitätsklinikum Halle (Saale)
- 10/2013 2. Staatsexamen (Durchschnittsnote: 2,0)

### Famulaturen

- 03/2010 Krankenhaus Rochlitz, Station für Unfallchirurgie
- 07/2010 chirurgische Praxis Dr. Ost, Chemnitz
- 07 - 08/2010 Universitätsklinikum Halle (Saale), Station für Kardiologie
- 02/2011 Universitätsklinikum Halle (Saale), Station für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
- 02 - 03/2011 Kreiskrankenhaus Mittweida, Notfallambulanz
- 07 - 08/2013 Scarborough Regional Hospital, Trinidad & Tobago, Notfallambulanz

### Praktisches Jahr

- 08 - 12/2012 Chirurgie-Tertial: Carl-von-Basedow-Klinikum, Merseburg
- 12/2012 - 03/2013 Wahltertial Orthopädie: Kantonsspital Bruderholz, Schweiz
- 03/2013 - 07/2013 Innere-Tertial: St. Elisabeth u. St. Barbara Klinikum, Halle

### Klinische Tätigkeit

- 04 - 09/2014 Unfallchirurgie; Carl-von-Basedow-Klinikum, Merseburg
- seit 10/2014 Kardiologie; Carl-von-Basedow-Klinikum, Merseburg

Halle, den 16.12.2014

---

Frederic Putzschke

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Frederic Putzschke, geboren am 31.07.1987 in Karl-Marx-Stadt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Promotion ist an keiner weiteren Fakultät eingereicht bzw. abgelehnt worden. Ein früherer Promotionsversuch fand nicht statt.

Halle, den 16.12.2014

---

Frederic Putzschke

## Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Betreuer Prof. Dr. med. Michael Buerke für die Überlassung des Themas und die gute Betreuung bedanken. Ohne sein großes Engagement - auch an freien Tagen - wäre die Durchführung der Experimente nicht möglich gewesen.

Mein weiterer Dank gilt dem Leiter der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III Prof. Dr. med. Karl Werdan für die Bereitstellung der entsprechenden Räumlichkeiten und seine konstruktive Kritik und Anregungen bei der Bearbeitung des Themas.

Auch der Universitätsklinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Wolfgang Ch. Marsch bin ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung der histologischen Präparate zu großem Dank verpflichtet.

Außerdem danke ich Frau Schulz und den Mitarbeiterinnen des Zentrums für medizinische Grundlagenforschung für ihre Unterstützung bei der Laborarbeit, der Pflege der Tiere und bei Fragen jedweder Art.

Zu guter Letzt danke ich meiner Frau Tina und meinen Eltern Monika & Axel für ihre Geduld, Unterstützung und zahlreichen Anregungen nicht nur bei der Entstehung dieser Arbeit, sondern auch während des ganzen Studiums.