

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Innere Medizin III
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Direktor: Prof. Dr. med. Karl Werdan

**Protektive Effekte von Simvastatin
beim Endotoxinschock**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)
vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Martin Gustav Otto Schnell
geboren am 31.10.1975 in Rastatt

Betreuer: Prof. Dr. med. Michael Buerke

Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Buerke
Prof. Dr. med. Andreas Simm
Prof. Dr. med. Ulf Sibelius

Datum der Verteidigung: 10.12.2014

Datum der Verfahrenseröffnung: 14.01.2014

Referat

Hintergrund: Es wurden die Effekte des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Simvastatin in einem Endotoxinschockmodell in Bezug auf die Makro- und Mikrozirkulationsstörung, die Leukozytenakkumulation in den Schockorganen, die histopathologischen Veränderungen sowie die genregulatorischen Effekte im Endotoxinschock untersucht.

Studienmodell und Methoden: Der Endotoxinschock wurde bei Ratten durch die intravenöse Injektion des Lipopolysaccharids von Escherichia coli (Serotyp O127:B8) in einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht induziert. Der Therapiearm des Modells erhielt Simvastatin in einer Dosis von 100 µg/kg 24 Stunden vor der Schockinduktion. Der Untersuchungszeitraum betrug 4 Stunden.

Ergebnisse: Durch die Simvastatingabe konnte die endotoxininduzierte, letale, hypotone Kreislaufdysregulation vermieden werden. Im Therapiearm zeigte sich eine normotone Erhöhung des mittleren arteriellen Drucks um rund 100%. Als Parameter für die verminderte endotheliale Schrankenstörung wurde der Hämatokrit durch die Statingabe um 12% gesenkt. Die Leukozytenakkumulation in der Lunge und im Dünndarm konnten durch das Statin vermindert werden (67% und 92%). Die histopathologischen Veränderungen in Dünndarm, Leber und Niere im Endotoxinschock wurden durch die Simvastatingabe vermindert. Simvastatin hemmt in unterschiedlichem Maße die Induktion der Hitze-Schock-Proteine 25-, 60- und 70 in den Schockorganen. Simvastatin inhibiert den Transkriptionsfaktor NF-κB über die Beeinflussung dessen Aktivierungskaskade. Simvastatin hemmt die Expression von Adhäsionsmolekülen in Herzgefäßen (β₁-Integrin um den Faktor 7,2 und VCAM um den Faktor 0,6). Die Simvastatingabe führt zu einer Verlängerung der Überlebenszeit in der Endotoxämie von zumindest 32%.

Schlußfolgerungen: Es konnten antiinflammatorische Effekte des HMG-CoA-Reduktase-Inhibitors Simvastatin im Endotoxinschock in Ratten aufgezeigt werden. Diese Effekte konnten hämodynamisch, biochemisch, histopathologisch und auf zellregulatorischer Ebene dargestellt werden. Daraus könnten sich therapeutische Ansätze in der Sepsis und im septischen Schock ergeben.

Schnell, Martin Gustav Otto: Protektive Effekte von Simvastatin beim Endotoxinschock. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2013

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 EINLEITUNG	1
1.1 Schock	1
1.1.1 Allgemeine Definition des Schocks	1
1.1.2 Sepsis und septischer Schock	1
1.2 Hämodynamische Veränderungen bei der Sepsis	6
1.2.1 Veränderungen der Makrozirkulation	6
1.2.2 Veränderungen der Mikrozirkulation	6
1.3 Endotoxine	14
1.4 Therapeutische Ansätze der Sepsis	15
2 ZIELSTELLUNG	20
3 MATERIAL UND METHODIK	21
3.1 Material	21
3.1.1 Allgemein	21
3.1.2 Endotoxinschockmodell	22
3.1.3 Bestimmung des Hämatokrits	22
3.1.4 Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität	23
3.1.5 Bestimmung der mRNA-Expression im Endotoxinschock	23
3.1.6 Histologie	24
3.2 Methodik	25
3.2.1 Endotoxinschockmodell	25
3.2.2 Bestimmung des Hämatokrits	28
3.2.3 Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität	28
3.2.4 Histologie	29
3.2.5 Bestimmung der mRNA-Expression im Endotoxinschock	29
4 ERGEBNISSE	33
4.1 Schockmodell	33
4.1.1 Allgemeines	33
4.1.2 Hämodynamische Parameter	33
4.1.3 Hämatokrit	35
4.1.4 Mittlere Überlebenszeiten	35

4.2.	Leukozytenakkumulation in den Schockorganen	36
4.2.1	Effekte des LPS auf die MPO-Aktivität in der Lunge	36
4.2.2	Effekte des LPS auf die MPO-Aktivität im Darm	37
4.3	Histologie	38
4.3.1	Darm	38
4.3.2	Herz	40
4.3.3	Leber	41
4.3.4	Niere	43
4.4	Bestimmung der mRNA-Expression im Endotoxinschock	44
4.4.1	Darm	44
4.4.2	Herz	46
4.4.3	Leber	50
5	DISKUSSION	52
5.1	Hämodynamik und Mortalität im Endotoxinschock	52
5.2	Endotheliale Permeabilitätsstörung im Endotoxinschock	53
5.3	Leukozytenakkumulation im Endotoxinschock	54
5.4	Histologische Aspekte des Endotoxinschocks	55
5.5	Genregulation der Hitzeschockproteine im Endotoxinschock	57
5.6	NF- κ B-Regulation im Endotoxinschock	60
5.7	Genregulation der Adhäsionsmoleküle im Endotoxinschock	63
5.8	Klinische Bedeutung und Einsatz des Simvastatins in der Sepsis	64
6	ZUSAMMENFASSUNG	67
7	LITERATURVERZEICHNIS	68
8	THESEN	78
9	Tabellarischer Lebenslauf	
10.	Selbstständigkeitserklärung	
11.	Erklärung über frühere Promotionsversuche	
12.	Danksagung	

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

λ	Wellenlänge
ΔE	Extinktionsdifferenz
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
CAM	cellular adhesion molecule
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBP	cAMP responsive element-binding protein
CD	cluster of differentiation
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cNOS	constitutive nitric oxide synthase
CRP	c-reaktives Protein
DAB	Diaminobenzidin
DIG	disseminierte intravasale Gerinnung
DNA / DNS	deoxyribonucleic acid / Desoxyribonuleinsäure
dpi	dots per inch
E	Extinktion
E.coli	Escherichia coli
eNOS	endotheliale NO-Synthetase
et al	et alii
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FMN	Flavin-Mononukleotid
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
HK	Hämatokrit
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym A
HSF	heat shock transcription factor
HSP	heat shock protein
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-Kinase-Komplex

IL	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
kDa	kiloDalton
kg	Kilogramm
LBP	lipopolysaccharide binding peptide
LDL	low density lipoprotein
LFA-1	leukocyte function associated-1
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginin-methylester
LPS	Lipopolysaccharid
MadCAM-1	mucosal addressin cell adhesion molecule-1
MAP	mean arterial pressure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol/l	Millimol / Liter
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger ribonucleic acid
n	Fallzahl
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphatase
NFκB	nuclear factor kappa B
NO	nitric oxide = Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthetase
O ₂	Sauerstoff
p	p-Wert, Signifikanzwert
Pa	Partialdruck
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PECAM	platelet endothelial cell adhesion molecule
PG	Prostaglandin
PMNs	Polymorphmononukleäre Leukozyten
rpm	rounds per minute
RR	Blutdruck
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
TLR	Toll-like-Receptors
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
U	Units
VCAM	vascular cell adhesion molecule

1 EINLEITUNG

1.1 Schock

1.1.1 Allgemeine Definition des Schocks

Der Schock stellt ein vital bedrohliches Endstadium und zugleich die schwerste Komplikation unterschiedlicher Krankheitsverläufe mit vielfältiger Ätiologie dar. Der Schock wird in Abhängigkeit von seiner Pathogenese in fünf Typen unterteilt (Tabelle 1). Eine mehr klinisch orientierte Definition lautet: „Schock ist die inadäquate Organperfusion, selbst nach adäquater Volumenauffüllung, die sich oft als persistierende Hypotension oder als Indikation für eine vasoaktive Medikamentengabe zur Blutdruckerhöhung darstellt“ (Johnson, D. *et* Mayers, I. 2001). Ohne eine suffiziente Therapie tritt jeder schwere Schockzustand in die sogenannte Schockspirale ein, die einen Circulus vitiosus beschreibt, der das pathophysiologische Geschehen unabhängig von der auslösenden Noxe fortschreiten lässt. Sämtliche Formen des Schocks münden schließlich in eine gemeinsame Endstrecke, dem Multiorganversagen mit hoher Letalität (Larsen 1994).

1.1.2 Sepsis und septischer Schock

Die Definitionen der Bakteriämie, der Septikämie, des Syndroms der systemischen Entzündungsreaktion und des septischen Schocks waren zunächst unscharf und wurden oft synonym verwandt. Die Definitionen der American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference von 1992 (Tabelle 2) sind im klinischen Kontext als Arbeitsdefinitionen aufzufassen, die fließend ineinander übergehen können. Die S2-Leitlinie der Deutschen Sepsis-Gesellschaft und der Deutschen interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin zur Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis definiert die Begriffe in Ihrer Fassung von 2010 folgendermaßen: „Die Sepsis, die schwere Sepsis und der septische Schock definieren ein Krankheitskontinuum, das über eine Kombination aus Vitalparametern, Laborwerten, hämodynamischer Daten und Organfunktionen definiert wird.“ Eine Definition der Sepsis von Schuster *et* Werdan (2005) lautet: „Sepsis ist 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.“

Epidemiologie:

Die Sepsis ist die zweithäufigste Todesursache bei Erwachsenen auf Intensivstationen nach dem akuten Koronarsyndrom mit seinen Folgen. Bezogen auf die Häufigkeit von Todesursachen stationärer Patienten rangiert die Sepsis an 13. Stelle. Es besteht eine zunehmende Inzidenz, die für die Bundesrepublik Deutschland bei 4500-9500 Erkrankungen pro Jahr liegt (Reinhart *et al.* 2003). 1996 demonstrierten Brun-Buisson, C. *et al.*, dass die Inzidenz der Bakteriämie und der bakteriellen schweren Sepsis in einem Kollektiv von 85750 stationären Patienten bei 1% beziehungsweise 0,3% lag. Von insgesamt 11828 Patienten auf Intensivstationen zeigten 9% ein septisches Syndrom. 6,3% litten unter einer schweren Sepsis. In zwei prospektiven Studien mit einem Kollektiv von mehr als 5000 Intensivpatienten lag die Häufigkeit des systemischen Entzündungssyndroms bei 44 bis 68% (Sands, K.E. *et al.* 1997).

Ätiologie der Sepsis und des septischen Schocks:

Auslöser des Krankheitsgeschehens ist die Invasion eines Erregers. Risikogruppen für eine Erregerinvasion im Vergleich zur Normalbevölkerung sind: Immunsupprimierte Patienten, Unfallopfer, onkologische Patienten, Diabetiker, Patienten auf Intensivstationen. Die jeweiligen Erregerspektren sind abhängig von: Der Erregereintrittspforte, dem erregerspezifischen Vorkommen, der bereits erfolgten antibiotischen Therapie, den Erregervirulenzfaktoren und der lokalen Immunitätslage des Wirtes. Eine Bakteriämie lässt sich durchschnittlich bei nur 30% der Patienten mit schwerer Sepsis oder septischem Schock nachweisen. Bei 30% der Fälle kann bei klinisch manifester Infektion kein Erregernachweis geführt werden.

Innerhalb eines Zeitraumes von zehn Jahren wurden von Geerdes, H.F. *et al.* (1992) 980 Fälle von Septikämien untersucht. Tabelle 3 zeigt das daraus resultierende Erregerspektrum in relativer Verteilung.

Klinik:

Neben allgemeinen Zeichen der Sepsis wie Fieber, Schüttelfrost, Tachykardie und eine Veränderung des Bewusstseinszustandes sind die klinischen Symptome abhängig von der Lokalisation des Infektionsherdes. Der früheste Indikator ist oft eine Hyperventilation mit einer daraus resultierenden respiratorischen Alkalose. Die Haut der Patienten stellt sich im Gegensatz zu anderen Formen des Schocks warm, rosig und trocken dar (Lehr H.-A. *et al.* 2000). Zeichen des Schocks sind die arterielle Hypotonie verbunden mit einer Olig- oder Anurie. Laborchemisch bestehen Entzündungszeichen wie Leukozytose, CRP-Anstieg und Anstieg des Procalcitonins, sowie Zeichen des anaeroben Stoffwechsels. Bedingt durch die sich entwickelnde

Niereninsuffizienz steigern die harnpflichtigen Substanzen Kreatinin und Harnstoff an, und es kommt zu Elektrolytentgleisungen. Die organspezifischen Folgen des septischen Schocks manifestieren sich vornehmlich an den Organen Lunge (50%), Leber (45-55%), Herz (35%), Niere (20%), Gastrointestinaltrakt (15-25%) und Gehirn (10%) (Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. (1997).

Tabelle 1: Schockformen, deren Ursachen und Beispiele

(Tabelle modifiziert nach Larsen 1994)

Schockform	Ursachen	Beispiele
Hypovolämischer Schock	Flüssigkeitsverluste, Blutverluste, Plasmaverluste	Erbrechen, Diarrhö, inadäquate Diurese, Endokrinopathien, Trauma mit Hämorrhagie, Verbrennungen
Kardiogener Schock	Kontraktionsschwäche, Volumenbelastung, Druckbelastung, Diastolische Füllungsbehinderung, Herzrhythmusstörungen	Myokardinfarkt, Myokarditis, Kardiomyopathien Klappeninsuffizienzen, Shuntvitien Klappenstenosen, Lungenembolie, Herzbeuteltamponade, Perikarditis Kammerflimmern, Kammerflattern, Bradykardie
Anaphylaktischer Schock	Allergische Reaktion vom Soforttyp auf ein Antigen	Jodhaltige Kontrastmittel, Antibiotika, Medikamente, u.v.m.
Septischer Schock	Reaktion auf Produkte und Strukturbestandteile von Mikroorganismen	Grampositive und -negative Bakterien, Pilze und Parasiten
Neurogener Schock	Neurogene Dysregulation der Kreislauffunktion	Querschnittsläsion, Hirnstammläsion, Spinalanästhesie, Periduralanästhesie, Narkotika und Tranquilizer

Tabelle 2: Definitionen des American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine Consensus Conference 1992

Zustand	Definition
Syndrom der systemischen Entzündungsreaktion SIRS (systemic inflammatory response syndrome)	Systemische Reaktion auf ein breites Spektrum von Reizen; Nachweis einer systemischen Reaktion bestehend aus mindestens zwei der folgenden Parameter: 1. Temperatur > 38°C oder < 36°C 2. Herzfrequenz > 90/min 3. Atemfrequenz > 20/min oder PaCO ₂ < 32 mmHg 4. Leukozyten > 12000 Zellen/µl, < 4000 Zellen/µl oder >10% unreife Neutrophile im Differentialblutbild
Bakteriämie	Kultureller Nachweis eines bakteriellen Pathogens im Blut
Sepsis	Klinischer Nachweis einer Infektion <u>und</u> Nachweis eines SIRS
Schwere Sepsis	Sepsis <u>mit</u> Organdysfunktion(en) / Organhypoperfusion <u>oder</u> arterieller Hypotension (systolischer Blutdruck < 90 mmHg oder Abfall um > 40 mmHg ohne anderen erkennbaren Grund) Mögliche Zeichen der Organdysfunktion: 1. Hypoxämie (PaO ₂ < 75mmHg unter Raumluft oder PaO ₂ /FiO ₂ -Verhältniss < 250mmHg unter O ₂ -Applikation) 2. Metabolische Azidose (BaseExcess<5 mmol/l, oder Lactatkonzentration >1,5 mal der Referenz) 3. Renale Dysfunktion (Diurese <0,5 ml/kg/h für mind. 2 h trotz Infusionstherapie oder Kreatinin > 1,5 mal der Referenz) 4. Akute Enzephalopathie
Septischer Schock	Schwere Sepsis mit arterieller Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitsgabe mit Nachweis von Organperfusionsstörungen (Hypoxämie, metabolischer Azidose, Oligurie, Enzephalopathie). Bei gleichzeitiger Gabe von positiv inotropen oder vasokonstriktiven Substanzen muß keine Hypotension vorliegen.

Tabelle 3: Relatives Erregerspektrum bei Septikämien
(Geerdes, H.F. *et al.* 1992)

Gram-positiv		Gram-negativ	
<i>Staphylokokkus aureus</i>	17,4%	<i>Escherichia coli</i>	24,2%
<i>Koagulase-negative Staphylokokken</i>	9,5%	<i>Klebsiellen</i>	5,1%
<i>Enterokokken</i>	7,1%	<i>Enterobacter</i>	3,8%
<i>Viridans-Streptokokken</i>	5,9%	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,8%
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4,6%	<i>Bacteroides fragilis</i>	0,9%
Andere Streptokokken	3,9%	Andere	10,0%
Andere	1,8%		
Gesamt	49,8%	Gesamt	46,9%

Allgemeine therapeutische Maßnahmen:

Lokale Maßnahmen zur Sanierung von Infektionsherden sind vornehmlich chirurgischer Art. Flankierend erfolgen eine zunächst kalkulierte, und später eine resistenzgerechte antibiotische Therapie. In Abhängigkeit von der Kreislaufsituation ist eine Stabilisierung mittels Volumensubstitution und Gabe von inotropen und adrenergen Substanzen notwendig. Unter Berücksichtigung der Ventilations- und Oxygenierungsverhältnisse stellt die Intubation die Atmung sicher. Nierenersatzverfahren werden bei schockbedingtem Nierenversagen notwendig. Supportive Maßnahmen wie die Dekubitus- und die Thromboseprophylaxe, Magenulcusprophylaxe, eine suffiziente Atemwegshygiene und die Durchführung einer gegebenenfalls notwendigen parenteralen Ernährung verhindern Sekundärkomplikationen.

Prognose:

Die Prognose ist vom Schweregrad der Sepsis und der ursächlichen Erkrankung abhängig. 40-70% der Patienten auf Intensivstationen zeigen ein systemisches Entzündungssyndrom (SIRS = systemic inflammatory response syndrome). Die Mortalität des SIRS liegt bei 7-8%, und die des septischen Schocks bei über 50%. Die höchste Mortalität mit 72% wurde von Mc Lauchlan, G.J. *et al.* 1995 bei Patienten mit einer Peritonitis als Ursache der Sepsis beschrieben. Die Langzeitprognose der Sepsis

mit einer Einjahresüberlebensrate von nur 30 % ist ungünstig (Schoenberg, M.H. *et al.* 1998).

1.2 Häodynamische Veränderungen bei der Sepsis

1.2.1 Veränderungen der Makrozirkulation

Der initiale Blutdruckabfall bewirkt durch Stimulation zentraler und peripherer Druckrezeptoren die Ausschüttung von Katecholaminen aus gefäßinnervierenden Nervenendigungen und aus dem Nebennierenmark. Die Folgen hiervon sind eine positive Chronotropie, Inotropie und Dromotropie am Herzen, während im Gefäßsystem eine Vasokonstriktion im Bereich von Arteriolen und venösen Kapazitätsgefäßen erfolgt. Die daraus resultierende Minderperfusion der Nieren führt zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, was einerseits über die Wirkung des Angiotensin II die adrenerge Vasokonstriktion verstärkt, und andererseits über die Aldosteronsekretion eine vermehrte Rückresorption von Natrium und Wasser ermöglicht. Durch diese sympathiko-adrenalen Gegenregulationsvorgänge soll ein ausreichender Organperfusionsdruck aufrechterhalten werden. Bedingt durch die charakteristische Verteilung von α - und β -Rezeptoren erfolgt eine Umverteilung der zirkulierenden Restblutmenge, welche als Zentralisation bezeichnet wird. Diese Zentralisation dient der hinreichenden Perfusion der primär lebenserhaltenden Organe Herz und Gehirn. Dieses initiale Schockgeschehen ist reversibel (Werdan, K. *et Müller-Werdan, U.* 1996).

Aus der Dekompensation dieser Mechanismen resultiert das irreversible Schockstadium. Nach zunächst vorhandener kompensatorischer Rekrutierung von interstitieller Flüssigkeit in die Strombahn, kommt es bedingt durch die anhaltende Minderperfusion der Gewebe einerseits zum Nachlassen des arteriellen Widerstandes bei noch erhaltener venulärer Konstriktion, sowie andererseits zu hypoxischen Endothelschädigungen. Die sich hieraus entwickelnde Steigerung des hydrostatischen Drucks im Kapillarbett und die Hämostase bewirken eine Zunahme der Gefäßpermeabilität, wodurch es zu Flüssigkeitsverlusten und dementsprechend zur Verstärkung der Hypovolämie kommt. Diese rheologischen Veränderungen bilden die Grundlage für metabolische Entgleisungen, die sich als Laktatazidose äußern. Abbildung 1 zeigt schematisch die Pathophysiologie des Schocks:

1.2.2 Veränderungen der Mikrozirkulation

Der Verlust des peripheren arteriellen Widerstandes im septischen Schock ist mit einer Verminderung des Blutflusses auf mikrozirkulatorischer Ebene verbunden. Durch die erhöhte Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von aktivierten

Leukozyten und Endothelien kommt es zur Zellakkumulation in den Gefäßen, und zur Transmigration in die entsprechenden Organe. Verstärkt werden diese Prozesse durch die Gerinnungsaktivierung, die die Formation von Thromben induziert. Durch eine überschießende Aktivierung des Kininsystems kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen Gerinnung und Fibrinolyse, was die Entstehung einer disseminierten intravasalen Gerinnung fördert. Proinflammatorische Mediatoren verursachen den Verlust der endothelialen Barrierefunktion, weshalb es zu Flüssigkeitsverlusten an das Interstitium kommt. Aufgrund der Hypoxie finden sich auf zellulärer Ebene anaerobe Bedingungen. Der Energiemangel der Zellen führt zum Versagen der membranständigen Ionenpumpensysteme, und damit zur Beeinträchtigung der zellulären Homöostase. Die hypoxischen Bedingungen in der Zelle und die damit verbundenen Störungen der Zellintegrität bedingen den Zelltod (Armsted, V.E. *et al.* 1997, Lehr, H.-A. *et al.* 2000, Jacobson, J.R. *et al.* 2005).

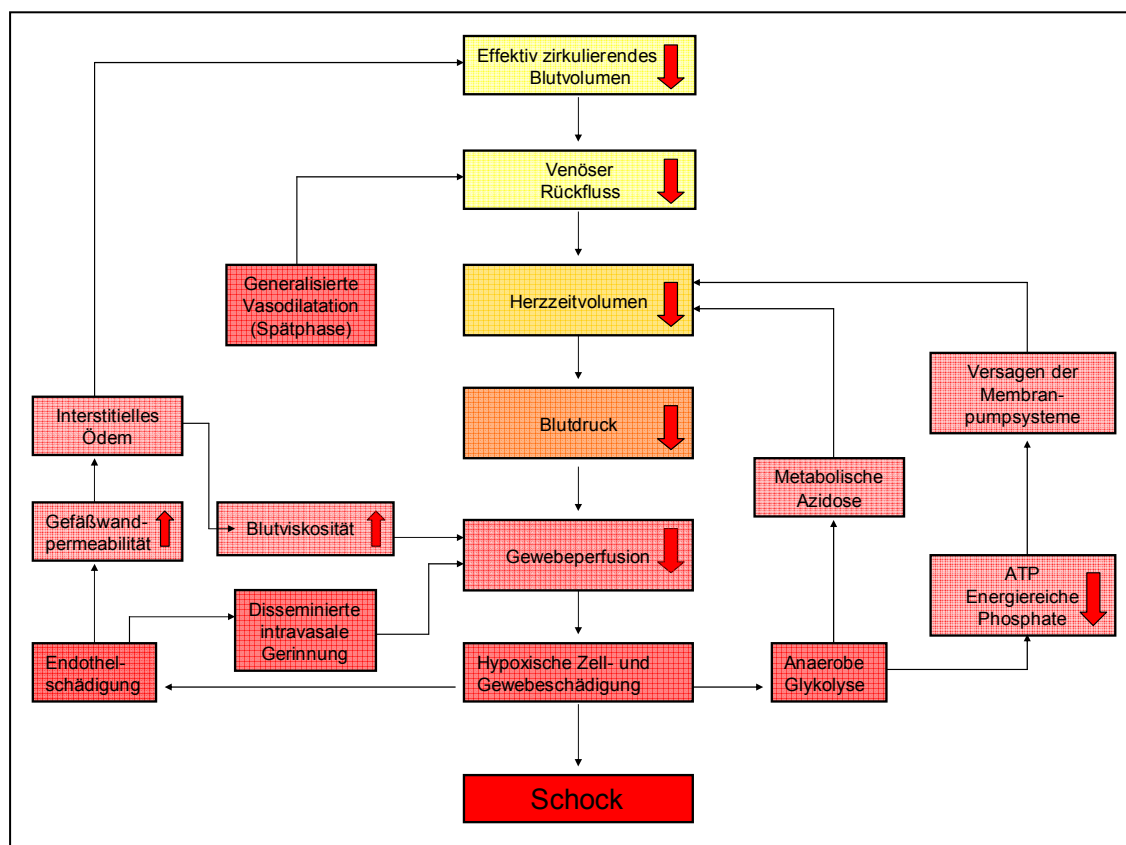


Abbildung 1: Pathophysiologie des Schocks

Neutrophile Granulozyten

Bei Kontakt mit Fremdanthigenen und der damit verbundenen Makrophagenaktivierung kommt es zur Freisetzung von Chemokinen, die eine Kaskade von Reaktionen auslösen, deren Ergebnis die Migration von frei im Blutstrom zirkulierenden PMNs

(polymorphmononukleäre Leukozyten (PMN)) in die befallene Organregion ist (*Chemotaxis*), und die Phagozytose der Mikroorganismen zur Folge hat (Nussler, A.K. *et al.* 1998). Aktivierte PMNs setzen Substanzen frei, die eine zytotoxische Wirkung besitzen. Die Sekretion von Lipidmediatoren wie PAF und Leukotrien B₄ führt durch Interaktion mit der NADPH-Oxidase und der Xanthinoxidase zur Bildung von Sauerstoffradikalen, was als *respiratory burst* bezeichnet wird (Endres, M. *et al.* 2004). Werden die zelleigenen Schutzmechanismen durch den Ansturm von Radikalen überfordert, so kann es zur Nekrose oder Apoptose kommen (Werdan, K. *et al.* 1996).

Endothelzellen

Proinflammatorische Reize können durch endotheliale Mediatoren und Adhäsionsmoleküle moduliert werden.

Zelladhäsionsmoleküle

Die Gruppe der Zelladhäsionsmoleküle kann in drei Familien unterteilt werden: Die Selektine, Integrine und die immunglobulinähnlichen Zelladhäsionsmoleküle.

Selektine:

Man unterscheidet das L-, E-, und P-Selektin. Es sind Glykoproteine, die mit einem lektinähnlichen Molekülanteil mit Carbohydratstrukturen ihrer Liganden in Wechselwirkung treten.

Das L-Selektin wird konstitutiv an der Zelloberfläche von Leukozyten exprimiert und wird im Anschluss an die Leukozytenaktivierung innerhalb von Minuten von der Oberfläche abgespalten, was als *shedding* bezeichnet wird (Gerli, R. *et al.* 2001). Die Expression von E-Selektin ist auf aktivierte Endothelzellen beschränkt. Nach Aktivierung des Endothels durch Zytokine oder LPS kommt es zu einer *de novo*-Synthese des E-Selektins. Das P-Selektin liegt in gespeicherter Form in den Weibel-Pallade-Körperchen der Endothelzellen und in den α -Granula der Thrombozyten vor. Nach Stimulation dieser Zellen durch verschiedene Mediatoren wird das P-Selektin an der Zelloberfläche exprimiert. Ähnlich wie beim E-Selektin findet auch eine Neusynthese dieses Glykoproteins nach Aktivierung des Endothels statt (Armstead, V.E. *et al.* 1997, Sperandio, M. 2006, Hordijk, P.L. 2006).

Integrine:

Integrine sind transmembranäre, heterodimere Glykoproteine, die für die feste Bindung der Leukozyten an das Endothel, und die darauf folgende Aktivierung und

Transmigration unerlässlich sind. Die entsprechenden Bindungspartner auf den Endothelzellen sind immunglobulinähnliche Zelladhäsionsmoleküle (CAMs = cellular adhesion molecules). Alle Integrine auf Leukozyten exprimieren eine gemeinsame $\beta 2$ -Einheit (CD18), die mit drei immunologisch verschiedenen α -Einheiten (CD11a, b, c) kombiniert ist. Das Heterodimer CD11a/CD18 – auch als LFA-1 (leukocyte function associated-1) bezeichnet – findet sich konstant auf allen Leukozyten exprimiert, während das CD11b/CD18 und das CD11c/CD18 erst nach Leukozytenaktivierung durch bestimmte Mediatoren aus Granula freigesetzt, und an der Oberfläche präsentiert werden. Spezifischer Bindungspartner für das CD11b/CD18 ist das ICAM-1, während das LFA-1 sowohl mit ICAM-1 als auch mit ICAM-2 interagieren kann. Unabhängig von den $\beta 2$ -Integrinen können Integrine mit einer $\alpha 4$ -Untereinheit an den Liganden VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und auch an MadCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule-1) binden.

Immunglobulinähnliche Adhäsionsmoleküle:

Bestehend aus einer unpaaren Proteinkette, deren extrazellulärer Teil aus einer variablen Anzahl von immunglobulinähnlichen Domänen besteht, werden sie der Immunglobulinsuperfamilie zuordnet. Als Liganden der leukozytären $\beta 2$ -Integrine sind das ICAM-1 und das ICAM-2 für das *sticking* mit entscheidend. ICAM-1 wird außer von Endothelzellen auch von Fibroblasten, Epithelzellen und Leukozyten gebildet. Auf der Endothelzelle wird es konstitutiv in geringen Mengen exprimiert, und nach der Aktivierung des Endothels durch Mediatoren langsam durch *de novo*-Proteinsynthese verstärkt präsentiert (Lefer, A.M. *et al.* 1994). Ein weiterer Vertreter dieser Gruppe ist das VCAM-1, welches mittels $\alpha 4$ -Integrin ebenfalls Neutrophile bindet. An der Transmigration der Leukozyten durch die Endothelschicht ist das PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1) beteiligt. Es findet sich auf Endothelzellen, Thrombozyten, Neutrophilen, Monozyten und T-Zellen.

Leukozyten-Endothel-Interaktion

Der Ablauf der Leukozytenrekrutierung zeichnet sich durch einen sequentiellen Charakter aus, der als Leukozyten-Endothel-Interaktion bezeichnet wird. Dieser Prozess beginnt mit der Margination der Leukozyten, gefolgt von dem *rolling*, der Adhärenz (*sticking*) und der Leukozytenaktivierung, und schließlich der Transmigration der Leukozyten durch die Endothelschicht. Innerhalb des Gefäßsystems sind die postkapillären Venolen der bevorzugte Ort der Emigration von Leukozyten (Nussler, A.K. *et al.* 1998). Abbildung 2 stellt schematisch den Ablauf der Leukozytenadhäsion und Transmigration dar.

Margination:

Aufgrund rheologischer Verhältnisse tendieren Leukozyten eher dazu sich im Blutstrom nahe der Endotheloberfläche zu bewegen. Dieses Phänomen bezeichnet man als Margination, wobei der initiale Kontakt der Zellen mit dem Endothel, nach Verlassen des axialen Blutstroms, ein zufälliges Ereignis darstellt (Carlos, T.M. *et* Harlan, J.M. 1994, Ley, K. 1996).

Rolling:

Nach dem Kontakt der Leukozyten mit dem Endothel verlangsamt sich ihre Geschwindigkeit und sie rollen auf der Oberfläche der Gefäßwand entlang. Diese Interaktion wird durch Selektine und ihre Liganden vermittelt. Unter basalen Bedingungen findet keine Interaktion statt. Das konstitutiv exprimierte L-Selektin ist das initial verantwortliche Adhäsionsmolekül, welches eine geringe Bindung ermöglicht, was an der hohen Velozität der Leukozyten zu erkennen ist. Dabei kommt es zur Endothelzellaktivierung und zur Expression weiterer Bindungsmoleküle. Die Bindung wird im Folgenden durch das P-Selektin verstärkt, was eine Verlangsamung des *rollings* bewirkt. Das P-Selektin kann allein an Stelle des L-Selektins die initiale Kontaktaufnahme übernehmen, wenn eine hinreichend große Menge von P-Selektin auf der Endotheloberfläche exprimiert ist. Das E-Selektin wird erst Stunden nach der Endothelaktivierung durch Leukozyten aktiviert und verstärkt dann die Adhäsionsprozesse (Lefer *et al.* 1994, Nussler, Sperandio, M. 2006, Hordijk, P.L. 2006).

Aktivierung und Adhärenz (*sticking*):

Das *rolling* ermöglicht den neutrophilen Granulozyten den Kontakt mit membrangebundenen Mediatoren, was zur Aktivierung des Granulozyten führt. Dadurch werden β 2-Integrine mobilisiert, die für die feste, scherkraftunabhängige Adhäsion verantwortlich sind, was als *sticking* bezeichnet wird. Dabei erfolgt das *shedding* des L-Selektins. Zytokine, wie TNF- α , IL-1 und IFN- γ sorgen für die weitere *de novo*-Synthese von Adhäsionsmolekülen (E-Selektin und ICAM-1), und vermitteln dadurch eine Verstärkung der Leukozytenadhärenz.

Transendotheliale Migration:

In Abhängigkeit von stimulierenden Mediatoren, wandern die Neutrophilen zwischen oder durch die Endothelzellen in den subendothelialen Raum. Dabei ist die feste Adhäsion an das Endothel zwar eine notwendige, aber nicht hinreichende Bedingung

für die Transmigration, da die ausreichende Stimulation der Leukozyten entscheidend ist für die folgende Diapedese. Behilfliche Strukturen bei diesem Vorgang sind vor allem das PECAM-1, das ICAM-1 sowie auch die Integrine (Grandel, U. *et al.* 2002, Sperandio, M. 2006, Hordijk, P.L. 2006).

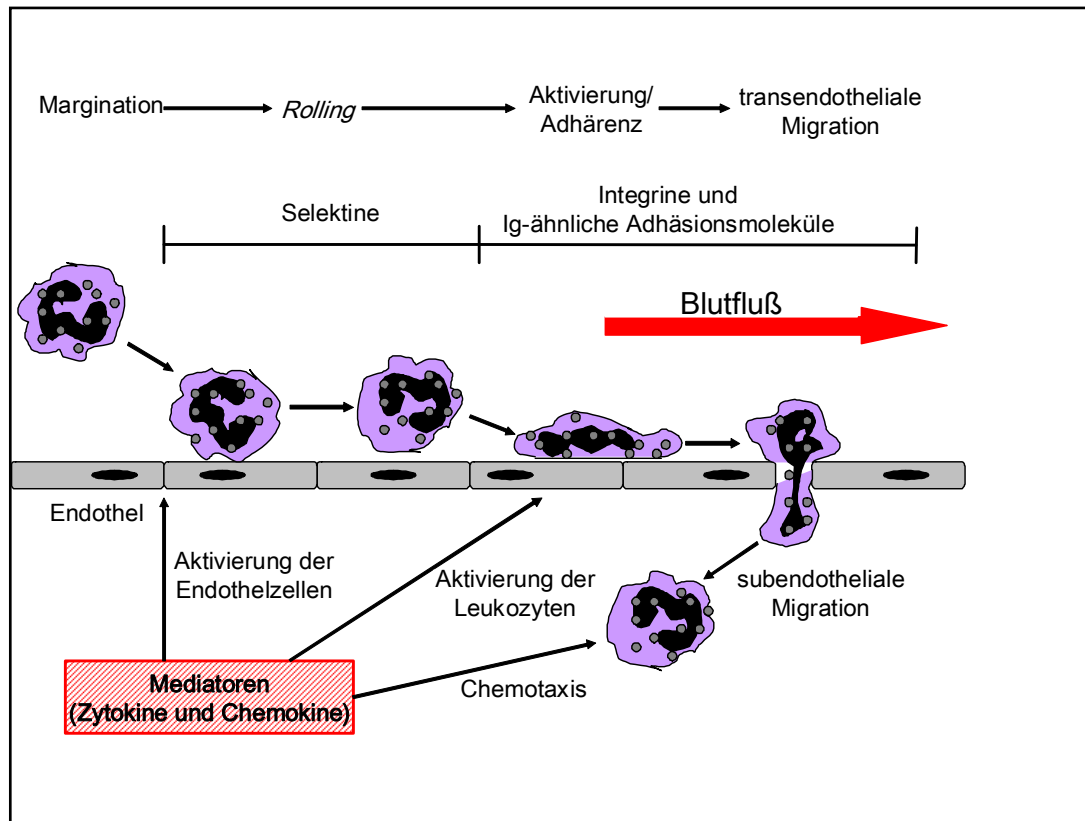


Abbildung 2: Ablauf der Leukozyten-Endothel-Interaktion.

Stickstoffmonoxid (NO)

NO ist ein inertes freies Radikal mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden. Aufgrund seiner geringen Größe und seiner lipophilen Natur diffundiert es leicht durch Zellmembranen.

NO wird von NO-Synthetasen (NOS) gebildet, welche L-Arginin als Substrat benötigen. Endprodukte der Reaktion sind NO und das L-Citrullin. Bei der Interaktion von NO mit verschiedenen Molekülen und Ionen entstehen seine Abbauprodukte Nitrat und Nitrit.

Es gibt drei Isoformen der NO-Synthase, die nach deren ursprünglichen Entdeckungsorten bezeichnet werden: Die neuronale NOS (nNOS, NOSI), die induzierbare NOS (iNOS, NOSII) und die endotheliale NOS (eNOS, NOSIII). Jede dieser Isoformen ist auf unterschiedlichen Genen kodiert und die Expression ist nicht auf einen bestimmten Zelltyp limitiert. Die nNOS und die eNOS werden konstitutiv unter physiologischen Bedingungen exprimiert, und werden deshalb

zusammenfassend als cNOS (c für constitutive) bezeichnet. NOS-Enzyme sind nur in Anwesenheit der entsprechenden Kofaktoren Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphatase (NADPH), Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Mononukleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin (H₄B) aktiv. Die NO-Synthese durch die iNOS ist nur durch die Anzahl der aktivierten Enzyme sowie das Angebot an Substrat und Kofaktoren limitiert. Die Aktivität der cNOS-Enzyme wird durch einen Kalzium/Calmodulin-abhängigen Mechanismus reguliert. Die Bindung vasoaktiver Substanzen (z.B. Azetylcholin, Bradykinin, Histamin u.a.) an einer Endothelzelle führt zu einem rezeptorinduzierten Kalziumeinstrom, worauf Kalzium an Calmodulin bindet, welches wiederum die cNOS bindet und aktiviert. Entstandenes NO diffundiert zu den glatten Muskelzellen und aktiviert die Guanylatzyklase. Daraufhin steigt der intrazelluläre cGMP-Gehalt, was zu einer Relaxation der Muskelzelle und Vasodilatation *via* Proteinkinasenaktivierung führt (Johnson, M.L. *et al.* 1998).

NO und Sepsis:

Ein wesentliches Merkmal des fortgeschrittenen septischen Schocks ist die therapierefraktäre Hypotension, die mit einer erhöhten NO-Synthese koinzidiert. Akute Effekte des LPS-induzierten Schocks spielen sich in einem Zeitfenster von circa 0 bis 4 Stunden aber auch später ab, und sind gekennzeichnet durch einen sofortigen Blutdruckabfall, eine Hämokonzentration und durch ein interstitielles Ödem (Filep, J.G. *et al.* 1997). Unter den späteren –subakuten- Effekten sind die Verminderung des zirkulierenden Blutvolumens, der Abfall des onkotischen Druckes und die therapierefraktäre Hypotonie zu subsumieren. Bei *in vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass iNOS-abhängiges NO für die Effekte der subakuten Phase verantwortlich ist (Grandel, U. *et al.* 2001, Kilbourn, R.G. *et al.* 1997).

Nuclear factor-kappa-B (NF-κB)

Der NF-κB stellt eine Gruppe proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren mit mehreren Untereinheiten dar. Er reguliert die Synthese von mehr als 100 Genprodukten. Hierzu gehören inflammatorische Zytokine und Chemokine, Adhäsionsmoleküle, akute Phase Proteine und Enzyme. Neben dem Lipopolysaccharid wurde eine Vielzahl von Aktivatoren des NF-κB identifiziert. Der NF-κB besteht aus Homodimeren oder Heterodimeren der Untereinheiten RelA (p65), RelB, cRel, NF-κB1 (p50/p105) und NF-κB2 (p52/p100), die der Rel-Familie angehören. p 100 und p 105 sind Vorstufen der Untereinheiten p 52 und p 50. RelA und NF-κB1 stellen den Hauptanteil der Untereinheiten in der Zelle und sind potentesten Aktivatoren von NF-κB-regulierten Genen. NF-κB liegt als inaktive dimere Form gebunden an I-κB im

Zytoplasma vor. Isoformen des I- κ B sind das I- κ B α , I- κ B β , I- κ B γ , I- κ B ϵ und bcl-3. Der Großteil der NF- κ B-Aktivität wird durch I- κ B α reguliert. Die I- κ B-Familie reguliert die DNA-Bindungsfähigkeit und Translokation des NF- κ B in den Nukleus, indem sie die entsprechenden Bindungsstellen des NF- κ B maskieren. Die DNA-Bindungsstellen für den NF- κ B finden sich im Bereich der Promotorregionen der entsprechenden DNA-Produkte. Neben den I- κ Bs besitzen auch die Vorläuferproteine p 100 und p 105 die Funktion von I- κ Bs, da sie in gleicher Weise über eine Maskierung der NF- κ B-Bindungsstellen an der DNA die Transkription inhibieren können. Diverse Wege führen zu einer Aktivierung des NF- κ B. Gemeinsame Endstrecke ist die Aktivierung des I- κ B-Kinase-Komplexes (IKK), was zu einer Phosphorylierung des I- κ B und dessen Abspaltung vom NF- κ B führt. Der freie NF- κ B kann nun in den Nukleus transloziert werden, wo er in Assoziation mit dem Transkriptionskofaktor CBP (=cAMP responsive element-binding protein) die Transkription induziert. Die transkriptionale Aktivität ist abhängig von der Menge an verfügbarem I- κ B, von der Zusammensetzung der NF- κ B-Untereinheiten und von der Rezeptorkinetik des CBP (Boone, D.L. *et al.* 2002).

Abbildung 3 zeigt schematisch die Aktivierung und Inaktivierung der Transkription durch den NF- κ B. Der aktivierte NF- κ B bedingt die Synthese proinflammatorischer Genprodukte. Daraufhin kommt es zur Transkription von I- κ B α . Das I- κ B α inaktiviert den NF- κ B im Nukleus, und transloziert ihn wieder zurück ins Zytoplasma.

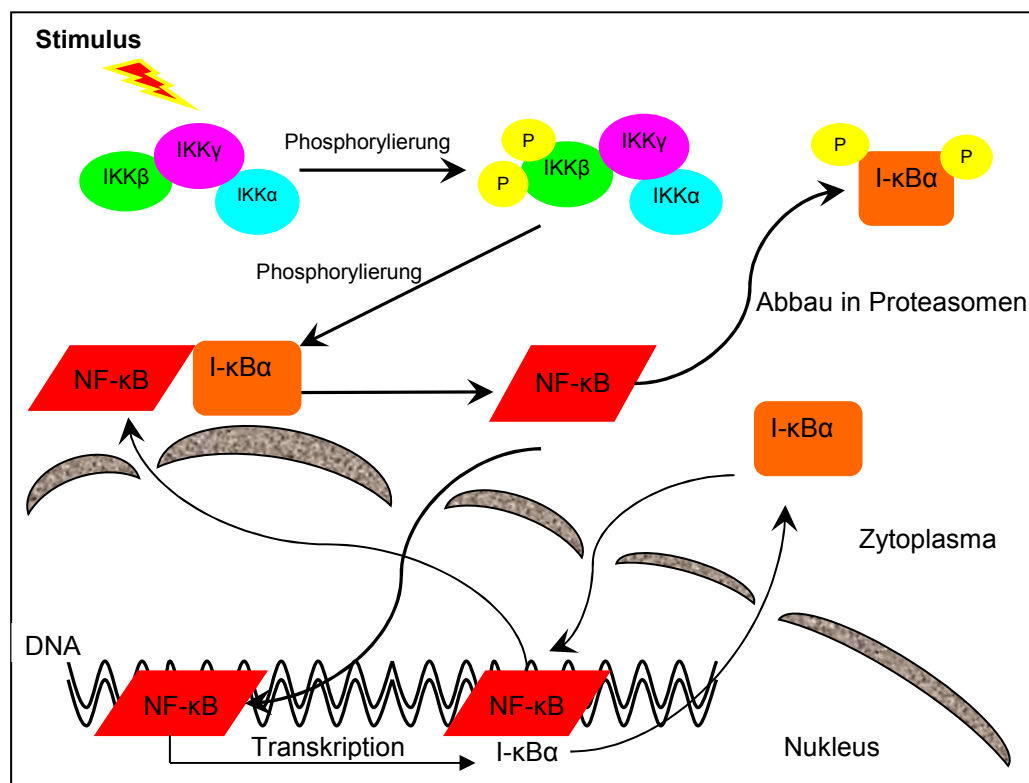


Abbildung 3: Aktivierung und Inaktivierung von NF- κ B und der Transkription.

1.3 Endotoxine

Typisch für ein gramnegatives Bakterium ist der dreischichtige Aufbau der Zellhülle mit einer äußeren und inneren Zytoplasmamembran, sowie einem periplasmatischen Raum. Die äußere Membran besteht aus Proteinen, Phospholipiden und verschiedenen anderen amphiphilen Makromolekülen wie den Kapselantigenen (K-Antigene), dem enterobakteriellen Common Antigen (ECA), Lipoproteinen und den Endotoxinen. Die äußere Membran reguliert die Nährstoffaufnahme, sie erschwert oder verhindert das Eindringen von schädlichen Stoffen und ermöglicht eine Resistenz gegenüber Serumkomponenten beziehungsweise Phagozyten des Abwehrsystems höherer Organismen. Die Endotoxine sind an vielen dieser Prozesse entscheidend beteiligt, und sind darüber hinaus essentiell für die Biogenese und Architektur der äußeren Zellmembran und insofern unentbehrlich für Wachstum und Überleben gramnegativer Bakterien.

Chemisch sind Endotoxine Lipopolysaccharide. Endotoxine besitzen drei strukturell zu unterscheidende Einheiten: Eine O-spezifische Kette und die Kernregion, die zusammen den Polysaccharidanteil ausmachen, sowie eine daran gebundene Lipoid-A-Komponente (Schletter, J. *et al.* 1995). Abbildung 4 zeigt den Aufbau des Endotoxins.

Die O-spezifische Kette besteht aus repetitiven Oligosaccharideinheiten, deren Abfolge den Serotyp des Bakteriums bedingt. Die Kernregion gliedert sich in eine äußere- und innere Kernregion. Das an den Polysaccharidanteil kovalent gebundene Lipoid-A besteht aus einem β -(1-6)-verknüpften D-Glukosamin-Disaccharid, mit daran kovalent gebundenen Fettsäuren. Das Lipoid-A stellt das eigentliche endotoxische Prinzip der Lipopolysaccharide dar. Eine strukturelle Veränderung des Lipoid-A-Anteils verändert seine Bioaktivität.

Interaktion des Organismus mit Lipopolysacchariden

Die Bioaktivität des Lipoid-A kann durch mehrere Serumbestandteile moduliert werden. Das LPS-binding protein (LBP), ein Akute-Phase-Protein, spielt eine Rolle bei der Monomerisierung von LPS-Aggregaten und beim Transfer von LPS zum m CD14-Receptor (m für membrane). Über diesen Receptor induziert das LPS eine Zellaktivierung und die Exkretion von proinflammatorischen Zytokinen. Die lösliche Form des CD14-Receptors (s CD14) scheint CD14-negative Zellen wie Endothelzellen und epitheliale Zellen zu aktivieren (Pugin, J. *et al.* 1993, Haziot, A. *et al.* 1996, Perera, P.Y. *et al.* 1997).

In Studien an *Drosophila* konnten Toll-Rezeptoren identifiziert werden, die pathogene Antigene erkennen und daraufhin Transkriptionsfaktoren aktivierten (Imler, J.L. *et*

Hoffmann, J.A. 2000). Bei Säugetierzellen hat man fünf Typen dieser Rezeptoren identifiziert, die man als Toll-like-Receptors (TLR) bezeichnet. TLR4-Rezeptoren findet man auf Zellen des monozytären Phagozytosesystems. Medzhitov, R. *et al.* bewiesen 1997, dass TLR4-tragende Zellen den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivierten, was die Produktion von proinflammatorischem Interleukin-1, -6 und -8, induzierte.

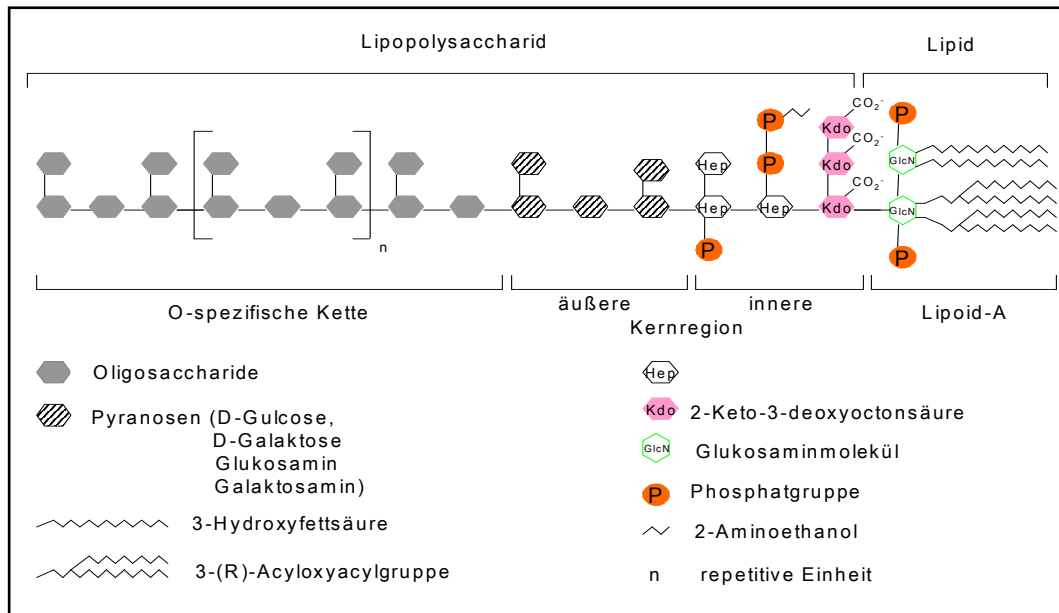


Abbildung 4: Aufbau des Endotoxins

1.4 Therapeutische Ansätze in der Sepsis

Glukokortikoide:

Es besteht eine aktuelle Empfehlung zur niedrigdosierten Glukokortikoidgabe (Hydrokortison 200-300mg/Tag) innerhalb von 24 Stunden bei Patienten mit therapierefraktärem septischem Schock (S2 Leitlinie der deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin, 2010).

Mediatorantikörper:

Bei einer Vielzahl von klinischen Studien mit Mediatorantikörpern konnte bislang keine signifikante Verbesserung in der Sepsis nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu einer enormen Zahl unterschiedlicher tierexperimenteller Untersuchungen, die positive Effekte zeigten. Im Zentrum des Interesses standen vor allem die Mediatoren TNF- α , Interleukin 1, 2 und 6, C5a und C3a, des Weiteren Fettsäuremetaboliten wie Thromboxan_{A2}, PGF_{2a}, PGE₂, PGI₂ und PAF.

Induktion von Hitze-Schock-Proteine (engl. heat shock proteins, HSP)

Die Hitze-Schock-Proteine werden den sogenannten Chaperonen zugeordnet, die an der Faltung und Organisation unterschiedlicher Proteine des endoplasmatischen Retikulums beteiligt sind. Gleichsam sind sie bei der Signaltransduktion, Apoptoseinduktion, Stabilisierung von Mikrofilamenten, Translokation von Proteinen durch Membranen, Regulation von Rezeptoren für die Translokation, Modulierung des Immunsystems und bei der Zytokininduktion Bestandteile eines komplexen Regelkreises. In unterschiedlichen Versuchsmodellen wurde nachgewiesen, dass die Induktion von heat shock-Proteinen als Reaktion auf verschiedenste Stressreize hin, mit einer erhöhten Resistenz gegenüber zellulären Noxen koinzidiert. Die HSPs haben Molekulargewichte von 27 bis 110 kDa und können bezüglich ihrer Größe und Funktion in Gruppen unterteilt werden:

HSP 70

Zur HSP 70-Familie zählen 5 Isoformen mit einer Größe von 66 bis 78 kDa. Die wichtigsten Isoformen sind das konstitutiv exprimierte HSP 73, und das durch Zellstress induzierbare HSP 72. Die konstitutive Form des HSP 70 findet sich in allen intrazellulären Kompartimenten, während die induzierbare Form hauptsächlich eine zytoplasmatische oder nukleäre Lokalisation hat. Zellstress bewirkt eine Konformationsänderung von Proteinen und führt zu einer erhöhten Genexpression von HSPs. HSPs liegen als heterodimere Komplexe mit ihrem Transkriptionsfaktor (HSF=heat shock transcription factor) im Zytoplasma vor. Der Anstieg ungefalteter Proteine in einer Zellstresssituation bedingt die Auflösung der Komplexe, und entsprechend steigt die Konzentration an freien Transkriptionsfaktoren, der eine erhöhte Genexpression der HSPs folgt. Nach Beendigung der Stressreize sinkt die Konzentration an ungefalteten Proteinen, es kommt zur Dimerbildung und die Synthese von heat shock-Proteinen nimmt ab (Slutsky, A.S. 2002).

HSP 60

Über die Bedeutung des HSP 60 ist wenig bekannt. Wie andere Hitze-Schock-Proteine besitzt es Chaperonfunktionen an der mitochondrialen Membran.

HSP 27

Das HSP 27 bewirkt eine verminderte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, und schützt vor der TNF- α -induzierten Apoptose (Sutherland, C.L. *et al.* 1999). Die Induktion von HSP 25, das Analogon zu humanen HSP 27 der Ratte, korrelierte mit erniedrigten Mortalitätsraten in einem endotoxämischen Schockmodell. Insbesondere

fand sich eine geringere kardiale Dysfunktion im endotoxämischen Schock bei HSP27-überexprimierenden Mäusen. Diese Daten führten zu der Annahme, dass HSP 27 eine antiinflammatorische Wirkung besitzt (Hashiguchi, N. *et al.* 2001, You, W. *et al.* 2009).

Veränderung des NO-Metabolismus:

Die Hemmung der cNOS im Verlauf der Sepsis erhöht die Mortalität. Die Inhibition der iNOS verhindert die Entstehung eines Schocks und verlängert die Überlebenszeit (Meyer, J. *et al.* 1994). Eine unspezifische NOS-Hemmung in der akuten Phase des septischen Schocks führt eher zur Prognoseverschlechterung. Im Gegensatz dazu wird im subakuten Stadium des Schocks eine signifikante Verbesserung der Perfusion und Mortalität unter iNOS-Inhibition gefunden (Nava, E. *et al.* 1992).

Inhibitoren der Leukozytenmigration:

In-vivo- und *in-vitro*-Studien konnten nachweisen, dass durch den genetisch determinierten Mangel an Adhäsionmolekülen oder auch eine durch Antikörper hervorgerufene Hemmung der entsprechenden Strukturen eine Verminderung der Leukozytenrekrutierung erreicht werden kann. Resultat ist eine Hemmung der entzündlichen Aktivität in den betroffenen Organen (Ley, K. 1996, Lefer, A.M. *et al.* 2001, Prüfer, D. *et al.* 1999).

HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren in der Sepsis

Simvastatin ist ein Abkömmling des Lovastatins, und gehört zur Gruppe der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren. Es wird schnell oral resorbiert und ist in seiner Bioverfügbarkeit unabhängig von der Nahrungsaufnahme. Die maximale Plasmakonzentration findet sich 2 Stunden nach oraler Aufnahme. Die Plasmaproteinbindung liegt bei über 95%. Simvastatin wird bei der hepatischen Passage zu mehreren aktiven Metaboliten umgebaut. Die Ausscheidung der Metabolite erfolgt biliär. Statine hemmen kompetitiv das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der Cholesterinsynthese, die HMG-CoA-Reduktase. Dadurch wird die Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonat gehemmt. In der Folge kommt es zum therapeutisch erwünschten Absinken der Serum-LDL-Konzentration, sowie auch zu einer geringen Abnahme der Serumtriglyzeridkonzentration. Die Erfolge von HMG-CoA Reduktase Inhibitoren zur Reduktion der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität konnte in primären und sekundären Präventionsstudien nachgewiesen werden (4S Study Group 1994, Shepherd, J. *et al.* 1995, Bronheim, D. 2007). Positive Effekte der Statine konnten auch im Rahmen von perioperativen Verläufen, bei Infektionen und bei Multiorganversagen mehrfach nachgewiesen werden (Schmidt, H. *et al.* 2006,

Kopterides P. *et al.* Falagas M.E. 2009, Mekontso Dessap, A. *et al.* 2011, Al Harbi *et al.* 2011).

Mehrere Untersuchungen konnten eine verbesserte endotheliale Funktion nach medikamentöser Senkung der Serumcholesterolkonzentration nachweisen (Stroes, E.S. *et al.* 1995). Man erkannte jedoch auch eine Verbesserung der Endothelfunktion unabhängig von der cholesterolsenkenden Wirkung der Statine (Laufs, U. *et al.* 1998, Pruefer, D. *et al.* 1999)

Hauptursache zirkulatorischer Störungen ist die pathologische Endothelfunktion, was im Falle der Sepsis, als auch bei ischämischen Geschehen der Fall ist (Buerke, M. *et al.* 2001). Wichtige Faktoren sind die initial verminderte Stabilität der eNOS mit verminderter NO-Produktion, bei im weiteren Verlauf überschießender NO-Produktion durch die iNOS. Simvastatin konnte als endogener NO-Induktor über die eNOS identifiziert werden (Lefer, A.M. *et al.* 1999). Der Ablauf der NO-induzierenden Wirkung von Statinen hängt mit seiner inhibitorischen Eigenschaft bezüglich des Isoprenoids Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) zusammen, welches ein wichtiger Faktor bei der posttranslationalen Modifikation unterschiedlicher Proteine ist. Zu diesen Proteinen zählen die eNOS und auch Ras-ähnliche Proteine wie die Rho-GTPase. Die Inhibition der Rho-GTPase resultiert in einer erhöhten Synthese der eNOS, was seine Wirkung als NO-Induktor erklärt (Laufs, U. *et al.* Liao, J.K. 1998, Cernuda-Morollon, E. *et al.* Ridley, A.J. 2006). Daneben finden sich klare Hinweise darauf, dass Statine die iNOS-induzierte therapierefraktäre Vasodilatation im Schock abschwächen können (Alvarez de Sotomayor M. *et al.*, 2008).

Daneben hemmen Statine die Expression von Adhäsionsmolekülen wie P-Selektin, ICAM-1, VCAM-1 und von β 2-Integrinen, was zu einer Verminderung der Leukozytenzahl in den untersuchten Organen führt (Pruefer, D. *et al.* 1999, Lefer, A.M. *et al.* 1999). Diese antiadhäsiven Effekte scheinen auch NO-abhängig zu sein. Sämtliche Teileffekte konvergieren letztlich auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B, dessen Aktivität durch Statine gehemmt wird (Fraunberger, P. *et al.* 2009). Die Abbildung 5 stellt schematisch den antiinflammatorischen Wirkmechanismus der Statine dar.

Andere nachgewiesene Effekte der Statine sind: Neutralisierung und Inhibition der Synthese von freien Radikalen, antithrombotische Effekte, Verhinderung von vaskulären Restenosen aufgrund von antiatherosklerotischen Effekten, Förderung der Angiogenese, Verminderung der endothelialen Permeabilität bei Inflammation, Verbesserung der myokardialen Kontraktilität durch Hemmung der TNF- α -Sekretion und der Apoptose, sowie durch direkte Beeinflussung von Ionenkanälen (Lefer, A.M. *et al.* 1999, Endres, M. *et al.* Laufs, U. 2004, Buerke, U. *et al.* 2008).

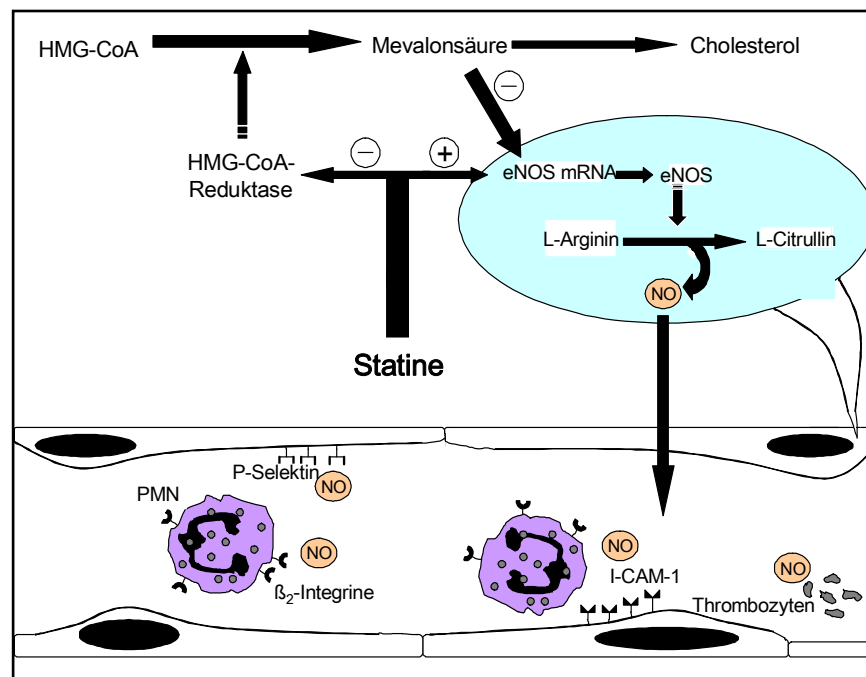


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus und der antiinflammatorischen Effekte von Statinen

2. ZIELSTELLUNG

Studien zum Thema Bakteriämie, Sepsis, Entzündung und Schock stellen die Ursachen der Organschädigung als Störung der Makro- und Mikrozirkulation, sowie einer veränderten Leukozyten-Endothel-Interaktion dar. Im Bereich der Mikrozirkulation konnten mehrere therapeutische Ansätze identifiziert werden. Experimentelle und klinische Studien erbrachten eine Vielzahl an Hinweisen für antiinflammatorische Effekte durch HMG-CoA-Reduktasehemmer unabhängig von deren cholesterolsenkenden Wirkung.

Simvastatin als ein Vertreter der HMG-CoA-Reduktasehemmer reduziert die Expression von Adhäsionmolekülen und hemmt dadurch die Neutrophilenmigration und die damit verbundene leukozytenabhängige Organschädigung. Gleichsam wirkt Simvastatin auf der Ebene der Mikrozirkulation protektiv, indem es den NO-Metabolismus beeinflusst. Des Weiteren wurde beschrieben, dass Simvastatin antiinflammatorische Effekte bei der Genregulation besitzt. Daneben hat es eine neutralisierende und reduzierende Wirkung auf die Radikalfreisetzung, antithrombotische Effekte, verbessert die myokardiale Kontraktilität in der Sepsis und reduziert die Mortalität beim akuten Koronarsyndrom.

Im Rahmen eines in-vivo-Schockmodells sollten die protektiven Effekte des Simvastatins unter septischen Bedingungen hinsichtlich der Zytoprotektion, der PMN-Akkumulation, der endothelialen Schrankenstörung und der mRNA-Expression charakterisiert werden. Hierzu wurde vor einem vierstündigen Beobachtungszeitraum zur Schockinduktion das Endotoxin von E.coli (Serotyp O127:B8) appliziert. Einem Teil der Versuchstiere wurde 24 Stunden vor dem Toxinapplikation Simvastatin verabreicht. Kreislaufparameter, Hämatokrit und Überlebenszeiten wurden dokumentiert. Danach wurden vergleichende histologische Präparate der Schockorgane Leber, Niere, Herz, und Dünndarm angefertigt. Die Myeloperoxidaseaktivität als Abbild der Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in den Organen wurde quantifiziert. Des Weiteren sollte der Einfluss der Simvastatinapplikation auf die Genregulation im septischen Schock mittels cDNA-Expression Array charakterisiert werden.

3.1 MATERIAL

3.1.1 Allgemein

- UNOPETTE Test 5856 (Becton Dickinson, New Jersey)
- Eimalkanülen 0,45 mm × 12 mm (Braun, Melsungen)
- Pipetten 0,5-10 µl, 10-100 µl, 50-200 µl und 100-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
- Pipettiergerät Eppendorf Reference (Eppendorf, Hamburg)
- ph-Meter CG 837 (Schott, Hofheim)
- Reagenzglasschüttler REAX top (Heidolph Elektro GmbH & Co KG, Schwabach)
- Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg)
- Elektronischer Digitalthermometer ama-digit PRECISION (Amarell, Labotec)
- Labortechnik Vertriebs GmbH, Wiesbaden)
- Laborwaage Precisa 40 SM – 200 A (PAG OERLINKON AG, Zürich)

Kunststoffmaterial

- Zentrifugenröhrchen, konisch 15 ml und 50 ml (NUNC, Wiesbaden)
- Zentrifugenröhrchen, rund 10 ml (Griener, Frickhausen)
- Standarttips für Pipetten 10 µl und 1000 µl (Eppendorf, Hamburg)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml (Eppendorf, Hamburg)
- Einweg-Pasteurpipetten 3 ml (Labotec Labortechnik Vertriebs GmbH, Wiesbaden)
- Einmalspritzen 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml und 20 ml (Braun, Melsungen)

Glasmaterial

- Duran® (Schott, Mainz)
- Bechergläser 25 ml, 50 ml, 100 ml, 150 ml und 250 ml
- Erlenmeyerkolben 25 ml, 50 ml, 100 ml, 500ml und 1000 ml
- Messzylinder 5 ml, 10 ml, 25 ml und 100 ml

Reagentien und Lösungen

- Aqua bidest. (Klinikapothek, Mainz)
- Isotonische Kochsalzlösung 0,9% (Braun, Melsungen)
- Steriles und pyrogenfreies, bidestilliertes Wasser, Ampuwa® (Fresenius, Bad Homburg)
- Salzsäurelösung 1 normal (Merck, Darmstadt)
- Natronlauge 1 normal (Merck, Darmstadt)
- Ethanol absolut (> 99 Vol.%) (Riedel-de Haen AG, Seelze)

3.1.2 Endotoxinschockmodell

Geräte und Instrumente

- Druckwandler KAISER P23 Db (Diefenbach, Frankfurt)
- Druckmodule AV 01 DC Amplifier (Diefenbach, Frankfurt)
- Druckaufnahmegerät Servomed® (Hellige GmbH, Freiburg)
- Monitor für Druckaufnahmegerät pm 015 rgd (Hellige GmbH, Freiburg)
- Arterienklemmen:
 - Rochester-Pean, gerade, 16 cm (Medicon Instrumente, Tuttlingen)
 - Dandy-Baby Arterienklemme, feines Modell, gebogen, 13 cm (Medicon Instrumente, Tuttlingen)
 - Diefenbach-Gefäßklemme, breites Maul, 35 mm, gerade (Medicon Instrumente, Tuttlingen)
- Scheren:
 - Inzisionsschere, gerade, 13 cm (Medicon Instrumente, Tuttlingen)
 - Nelson-Präparierschere, Standardmodell, gerade, 13 cm (Medicon Instrument, Tuttlingen)
 - Mikroschere micro 2000® (Medicon Instrumente, Tuttlingen)
- Pinzetten:
 - Anatomische Pinzette, schlank, gerade, 13 cm (Medicon Instrumente, Tuttlingen)
 - Chirurgische Pinzette, standard (Medicon Instrumente, Tuttlingen)
- Katheterschlauch Intramedic® Polyethylen Tubing PE 50 (Becton Dickinson, Heidelberg)
- Katheterschlauchadapter Intramedic® Luer Stub Adapter 20 Gauge (Becton Dickinson, Heidelberg)

Sonstiges Material

- Thrombophob® 25.000, Heparin-Natrium (Nordmark, Uetersen)
- Pentobarbital-Natrium Narcoren® (Merial GmbH, Halbergmoos)
- Lipopolysaccharid von Escherichia coli Serotyp O127:B8 (gefriergetrocknetes Pulver, phenol-extrahiert) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- Simvastatin Zocor® forte (Dieckmann Arzneimittel GmbH, Haar)

3.1.3 Bestimmung des Hämatokrits

Geräte und Material

- Hämatokritzentrifuge Typ 2010 (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Hämatokritkappilaren (Länge 75 mm, Ø 1,4 mm) (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)

- Kapillarenkitt (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)

3.1.4 Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität

Geräte und Material

- Zentrifugenröhrchen 30 ml (Labotec Labortechnik Vertriebs GmbH, Wiesbaden)
- Zentrifugenröhrchen 50 ml konisch (NUNC, Wiesbaden)
- Homogenisator Ultra-Turrax® T25 (Janke & Kunkel, Staufen)
- Zentrifuge Rotina® 48 RC (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Ultrazentrifuge Sorvall® RC 5C (DU PONT)
- Zentrifugenrotor Sorvall® SS-34 (DU PONT)
- Einmalküvetten aus Polystyrol (Rudolf Brand GmbH & Co, Wertheim)
- Spektrometer S.250 v. (Secomamm, Domont Cedex, Frankreich)

Reagentien und Lösungen

- HTAB-Puffer, pH 6,0:
 - 250 mg Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Sigma Chemical Company, Deisenhofen)
 - 45 ml Aqua bidest (Klinikapothek Uniklinik Mainz)
 - 5 ml Kaliumdihydrogenphosphat 50 mmol/l (Merck, Darmstadt)
- ODI-Lösung, pH 6,0:
 - 8,35 mg o-Dianisidine (Sigma Chemical Company, Deisenhofen)
 - 5 ml Dulbecco PBS Ca²⁺-frei (Klinikapothek Mainz)
 - 0,5 ml H₂O₂ 30% (Klinikapothek Mainz)

3.1.5 Bestimmung der mRNA-Expression im Endotoxinschock

Geräte und Material

- Strahlenschutzschilde VWRbrand® (Merck, Darmstadt)
- Strahlenschutzbehälter VWRbrand® (Merck, Darmstadt)
- Hybridisierungsöfen OV₂® (Biometra, Göttingen)
- Hybridisierungsgefäße OV₂® (Biometra, Göttingen)
- Geigerzähler 1210B (Berthold, Deutschland)
- Photometer zur RNA-Konzentrationsmessung Gene Quant® (Pharmacia Amersham biotech)
- Zentrifuge Rotina® 48 RC (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Thermocycler PTC 100® (Mj-Research Inc., Watertown MA, USA)

- Atlas cDNA-Expression-Kit™ (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)
- Röntgenfilm Biomax® MS (KODAK)
- Röntgenfilmkassette Hypercassette® (Amersham pharmacia biotech, Little chalfont)
- Röntgenfilmentwickler X-ray film processor® (Fuji GmbH, Düsseldorf)
- Software zur Filmauswertung AtlasImage™ 2.0 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA)

Reagentien und Lösungen

- Denaturierungslösung pH 4, 500 ml:
 - Guanidinthiocyanat 31,9 g (Sigma Chemical Company, Steinheim)
 - Ammoniumthiocyanat 9,9 g (Sigma Chemical Company, Steinheim)
 - Deionisiertes Wasser 55 ml (Klinikapotheke Mainz)
 - 2 molare Natriumacetatlösung 5 ml (Sigma Chemical Company, Steinheim)
- Gesättigte Phenollösung:
 - Phenol 100 g (Sigma Chemical Company, Steinheim)
 - Glycerol 26 ml (Sigma Chemical Company, Steinheim)
 - 2 molare Natriumacetatlösung 8,25 ml (Sigma Chemical Company, Steinheim)
 - Deionisiertes Wasser 30,75 ml (Klinikapotheke Mainz)
- Chloroform (Sigma Chemical Company, Steinheim)
- Isopropanol (Sigma Chemical Company, Steinheim)
- SDS-Lösung (20%) (Bio-Rad Laboratories, CA)
- SSC Lösung, pH 7, 1000ml:
 - Natrium-Chlorid 175,3 g (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
 - Trinatriumcitratdihydrat 88,2 g (Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)
- (α -³²P)dATP (wässrige Lösung, Aktivität 9,25 MBq) (Amersham pharmacia biotech., Braunschweig)

3.1.6 Histologie

- Roti®-Histokitt (Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe)
- Deckgläser: Menzel-Gläser® 24 X 50 mm (Gerhard Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig)
- 70% Alkohol: Alkopharm 70 (Brüggemann Alcohol, Heilbronn)
- Formaldehydlösung 37% (Merck, Darmstadt)
- Mikroskop: SM-LUX (Leitz, Wetzlar)
- Compound: Tissue-Tek® (Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, NL)
- Mikrotom-Klingen: Microtome Blades Type R35 (Feather, Japan)

- Mikrotom: Cryostat MTE (SLEE Technik, Mainz)
- Objektträger: Super Frost® Plus (Gerhard Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig)
- Xylolersatz: XEM-200 (Uniapotheke, Mainz)
- Eosin: 1%ige Lösung Certistain® (Merck, Darmstadt)
- Hämatoxylin: MAYERS Hämalaulösung 20%ig (Merck, Darmstadt)

3.2. METHODIK

3.2.1 Endotoxinschockmodell

Durchführung

Männliche Sprague Dawley Ratten wurden im Schockmodell untersucht, wobei während des gesamten Versuchsablaufs das deutsche Tierschutzgesetz berücksichtigt wurde. Zu Beginn der Untersuchungen lag eine Tierversuchsgenehmigung vor. Die Ratten stammten aus einer Zuchtreihe des Pharmakologischen Instituts der Universität Mainz ab, und hatten ein mittleres Gewicht von 200g bei einem Alter von 9 bis 12 Wochen.

Zu Beginn der Operation wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Pentobarbitalinjektion narkotisiert. In der Folge wurde die Vena jugularis zur weiteren Pentobarbitalgabe katheterisiert. Entsprechend wurden die Pentobarbitalgaben wiederholt, bis keine Reaktion mehr auf Schmerz eintrat. Bei ausreichender Schmerztoleranz wurde die Halsregion medial längsinzidiert, die Trachea präpariert und daraufhin quer eröffnet. Über die Tracheotomie wurde ein Polyethylen-tubus einen Zentimeter nach distal vorgeschoben und mittels Bindfaden fixiert. Die linke Arteria carotis communis wurde nach distal ligiert. Nach zentral wurde ein Katheter zum Kreislaufmonitoring und zu Blutentnahmen vor der Aorta platziert und fixiert. Das Operationsgebiet wurde danach mit in Kochsalzlösung getränkten sterilen Kompressen abgedeckt. An die Operation schloss sich eine Stabilisierungsphase von 10 Minuten an, in der kontinuierlich der Blutdruck und die Atmung beobachtet wurden. Nur Tiere, die nach dieser Phase einen mittleren arteriellen Druck von mindestens 110 mmHg hatten, nahmen am weiteren Verlauf des Modells teil. Während des gesamten Versuchszeitraums wurde die Körpertemperatur mittels Heizkissen mindestens über 36° Celsius gehalten, um hypothermiebedingte Phänomene auszuschließen.

Durch Vorversuche wurden sowohl die Dosierung und Applikationsform für das Toxin als auch für das Simvastatin ermittelt, die zu Unterschieden zwischen den Versuchsgruppen führen sollten. Es wurde eine maximale Beobachtungszeit von 240

Minuten festgelegt. Wenn das Tier die gesamte Beobachtungszeit überlebte, wurde es durch eine Pentobarbitalinjektion getötet. Der Beginn der Zeitmessung wurde bei den Tieren mit Toxinbehandlung durch die Injektion des Bakterientoxins definiert. Bei den Tieren ohne Toxininjektion begann die Zeitmessung unmittelbar nach der Stabilisierungsphase. Der Tod des Tieres wurde definiert als die Koinzidenz von Pulslosigkeit und einem mittleren arteriellen Druck unter 40 mmHg oder das irreversible Sistieren der Atmung. Die rektal gemessene Körpertemperatur der Versuchstiere wurde bei einem Wert von 36°C bis 37°C als Normothermie definiert, und als Aufnahmekriterium in die Versuchsreihe angesehen. Des Weiteren wurde ein mittlerer arterieller Druck von 110 bis 140 mmHg als Normotonie, und eine Herzfrequenz zwischen 340 und 440 Schlägen pro Minute als Normfrequenz definiert.

Während des Versuchs wurden folgende Parameter kontinuierlich festgehalten:

- Herzfrequenz: in Schlägen pro Minuten
- mittlerer arterieller Druck: in mmHg
- rektale Temperatur: in Grad Celsius
- Hämatokrit: in Prozent am Vollblutvolumen

Abbildung 6 zeigt schematisch den Versuchsablauf, sowie die Messzeitpunkte.

Nach Versuchsende wurden das Jejunum, die Leber, die Nieren, die Lungen, das Herz für weitere Untersuchungen entnommen und bei -70°C eingefroren.

Einteilung der Versuchsgruppen

Die Tiere wurden zufällig in verschiedene Versuchsgruppen mit unterschiedlicher experimenteller Behandlung aufgeteilt. Es ergaben sich folgende Versuchsgruppen:

- | | |
|--------------|---|
| „Kontrolle“: | Diese Versuchsgruppe erhielt weder das bakterielle Toxin noch ein Medikament, wurde jedoch der gleichen Anästhesie und Operation unterzogen. |
| „Sham“: | Diese Tiere erhielten bei sonst gleichem Versuchsablauf 24 Stunden vor dem Experiment 100 µg/kg Körpergewicht Simvastatin als intraperitoneale Injektion. |
| „LPS“: | Diese Tiere bekamen nach der Stabilisierungsphase 10 mg/kg LPS von <i>Escherichia coli</i> (Serotyp O127:B8) intravenös injiziert. |

„LPS-plus-Simvastatin“: Diese Gruppe erhielt 24 Stunden vor der Operation eine intraperitoneale Injektion von Simvastatin in einer Dosis von 100 µg/kg, und nach der Stabilisationsphase LPS (10 mg/kg).

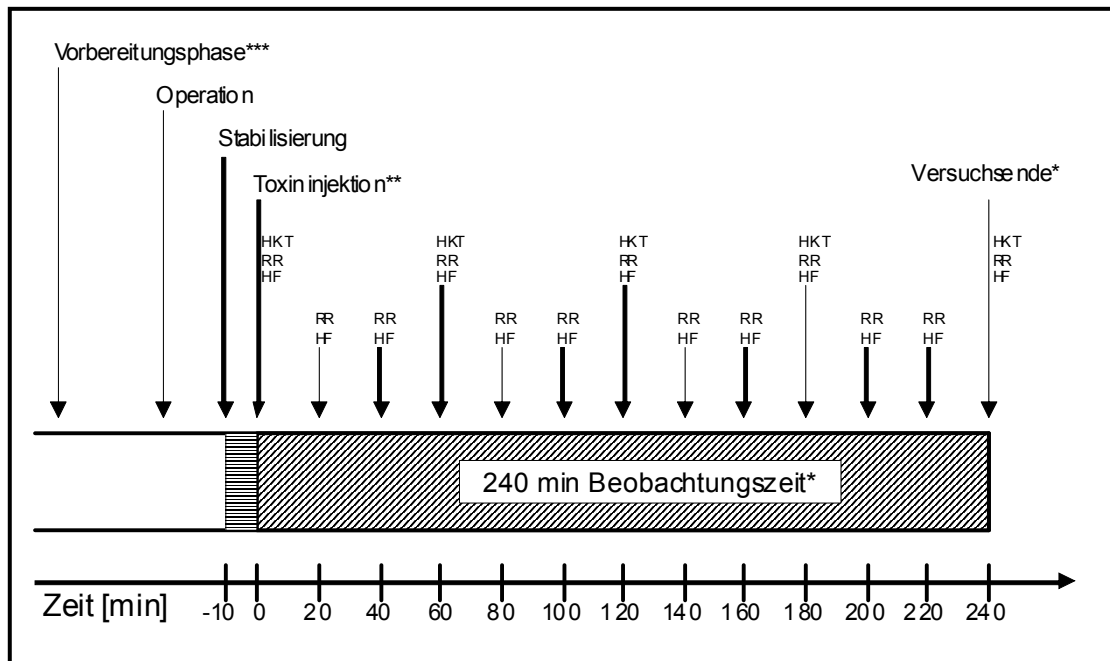


Abbildung 6: Zeitliches Schema des Versuchsablaufes

- * Das Versuchsende wurde durch die Überlebenszeit des Versuchstieres definiert, oder es erfolgte nach 240 Minuten eine letale Injektion von Pentobarbital.
- ** Die Toxininjektion stellt den Beginn für die Beobachtungszeit dar. Für Versuchsgruppen ohne Toxininjektion schloss sich die Beobachtungszeit unmittelbar an die Stabilisierungsphase an.
- *** Die Vorbereitungsphase begann für Tiere, die Simvastatin erhielten 24 Stunden zuvor mit der intraperitonealen Injektion von 100 µg/kg des Medikaments.

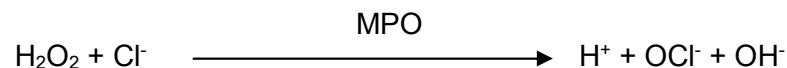
- HKT: Gibt den Zeitpunkt für die Hämatokritbestimmung an.
- RR: Gibt den Zeitpunkt für die Blutdruckmessung an.
- HF: Gibt den Zeitpunkt für die Herzfrequenzmessung an.

3.2.2 Bestimmung des Hämatokrits

Zur Bestimmung des Hämatokrits wurde die Mikrohämatokritmethode verwendet. Der Volumenanteil der Erythrozyten lässt sich unter Zuhilfenahme einer Auswertungsschablone ablesen. Das Vollblut wurde über den arteriellen Katheter abgenommen.

3.2.3 Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität

Die Myeloperoxidase findet man in neutrophilen Granulozyten und zu einem geringen Teil auch in Monozyten, wobei in Monozyten lediglich ein Hundertstel der Myeloperoxidaseaktivität zu finden ist als in neutrophilen Granulozyten. Demzufolge korreliert die gemessene Myeloperoxidaseaktivität in einem Organ gut mit dessen Granulozyteninfiltration. Substrat der katalysierten Reaktion ist H_2O_2 , welches aus dem Superoxidradikalanion O_2^- entsteht, das von membranassoziierten NADPH-Oxidasen katalysiert wird. In Anwesenheit von H_2O_2 bildet die Myeloperoxidase hypochlorige Säure (HOCL):



In den Organen Jejunum, Leber, Niere, Lunge und Herz wurde jeweils die Myeloperoxidaseaktivität bestimmt. Um das Enzym aus dem Gewebe freizusetzen und in einer wässrigen Phase zu lösen, wurde die Organprobe bei 0 Grad Celsius in einem zehnfachen Volumenanteil von HTAB-Puffer homogenisiert. Diese Suspension wurde bei 4° Celsius und 12500 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der dadurch gewonnene Überstand wurde zur weiteren Messung abpipettiert. In eine Küvette wurden je 50 µl des Überstandes und 950 µl der ODI-Lösung verbracht. Bei der nun ablaufenden Redoxreaktion oxidierte die Myeloperoxidase das Diaminobenzidin (DAB), wobei ein Farbumschlag der Lösung erfolgte, der photometrisch in Abhängigkeit von der Zeit gemessen wurde.

Die Reaktion zeigt folgende Formel:



Die Extinktion (E) wurde eine Minute nach Zugabe des Diaminobenzidins und nach Ablauf von zwei Minuten gemessen, wobei eine Wellenlänge von $\lambda = 460 \text{ nm}$ am Photospektrometer eingestellt wurde.

Aus der Differenz beider Extinktionswerte erhielt man die Extinktionsdifferenz ΔE :

$$\Delta E = E_{120} - E_{60}$$

Die Myeloperoxidaseaktivität (MPO-Aktivität) errechnete sich aus folgender Gleichung:

$$\text{MPO-Aktivität} / I = \frac{\Delta E}{e \times d \times t \times q}$$

- MPO-Aktivität: angegeben in internationalen Enzymeinheiten (U)
1U (Unit) ist definiert als der Substratumsatz von 1 μmol in einer Minute bei 25°C.
- e: molarer Extinktionkoeffizient von oxidiertem DAB bei $\lambda = 460 \text{ nm}$
 $e = 1,13 \text{ l} / (\mu\text{mol} \times \text{cm})$
- d: Lichtweg in der Lösung: $d = 1 \text{ cm}$
- t: Reaktionszeit: $t = 1 \text{ min}$
- q: Volumenanteil des Überstandes am Gesamtvolumen der Lösung in der Küvette: $q = 0,05$ bei 50 μl

Vereinfacht ergab sich daraus die Formel:

$$\text{MPO-Aktivität} / I = \Delta E \times 17,7 \times U/I$$

Im Folgenden wurde die Myeloperoxidaseaktivität als Units(U) pro Gramm Feuchtgewicht der jeweiligen Organprobe angegeben.

3.2.4 Histologie

Die Organe Herz, Darm, Leber und Niere wurden nach Versuchsende entnommen, und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurden histologische Präparate mit einer Stärke von 5 μm angefertigt. Zur Färbung der Schnitte wurde die Hämatoxylin-Eosin-Methode gewählt.

3.2.5. Bestimmung der mRNA-Expression im Endotoxinschock

Einführung in die Methode

Diese Methode ermöglicht die synchrone Detektion verschiedener mRNAs in einer Organprobe. Eine Organuntersuchung beinhaltet dabei eine RNA-Isolation aus dem zu

untersuchenden Organ, das Erstellen einer cDNA aus der gewonnenen RNA, die radioaktive Markierung der cDNA, die Hybridisierung derselben auf einer Nylonmembran, die Belichtung eines Röntgenfilms durch die Membran, sowie die densitometrische Auswertung des Röntgenfilms. Damit die Kompatibilität der einzelnen Verfahren gewahrt blieb, wurde streng nach den Richtlinien des Herstellers des Produktes vorgegangen. Organproben des Jejunum, der Leber und des Herzens wurden nach dieser Methode untersucht.

RNA-Isolation

Folgende Arbeitsschritte wurden bei 0 Grad Celsius durchgeführt, um RNA-Verluste durch RNase-kontaminierte Gefäße oder Werkzeuge zu vermeiden: Die Organproben wurden mit Denaturierungslösung versetzt und homogenisiert. Nach Inkubation und Zentrifugation konnte ein Überstand abpipettiert werden. Der Überstand wurde mit Phenol versetzt und auf Eis inkubiert. Chloroform wurde hinzugegeben. Nach dem Mischen dieser Lösung und sich daran anschließender Inkubation, erfolgte eine erneute Zentrifugation. Die dabei gewonnene obere Phase wurde nochmals dem beschriebenen Vorgang unterzogen und danach mit Isopropanol versetzt, inkubiert und anschließend wiederum zentrifugiert. Am Boden des Reagenzröhrchens wurde daraufhin ein Pellet sichtbar, welches mit Ethanol bedeckt zentrifugiert wurde. Nach Verwerfen des Überstandes trocknete das Pellet an der Luft und wurde in deionisiertem Wasser resuspendiert. Die entstandene RNA-Lösung wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -70°C eingefroren.

Reinheitsbestimmung der RNA-Probe

Die Reinheitsbestimmung erfolgte photospektrometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bestimmt wurden die Gesamtkonzentration der RNA, die RNA-Reinheit sowie die Proteinkonzentration der Lösung. Die RNA-Reinheit lag nach den Isolationsprozeduren bei 70-90% bei einem mittleren Proteingehalt der Lösung von 9,1 mg/ml. Nachdem die Konzentration der RNA in der Lösung bekannt war, konnten alle Proben mit Aqua destilata auf eine Konzentration von 2 µg/µl nivelliert werden.

Um statistischen und wirtschaftlichen Überlegungen gerecht zu werden, wurden die RNA-Isolate der Organproben einer Versuchgruppe in einem Lösungsansatz gepoolt. Dadurch wurden methodenbedingte Mittelwerte gewonnen.

Herstellung der cDNA-Proben

Aliquots der gepoolten RNA-Lösungen wurden mit der Primerlösung des Herstellers versetzt. In diesem Gemisch enthalten waren nur Primer, die ausschließlich an solche

RNAs binden konnten, die auch für die spätere Auswertung von Interesse waren. Deren Konzentrationen wurde in einer nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktion erhöht. Anschließend wurde zur Reinigung dieses Ansatzes eine Säulenchromatographie durchgeführt, deren Eluat dann die jeweilige cDNA-Probe darstellte.

Hybridisierung der Membran

Die cDNA-Probe wurde mit Denaturierungslösung zur Teilung der Nukleotidstränge versetzt. Der Probenansatz wurde mit dem Phosphorisotop ^{32}P zur radioaktiven Markierung der cDNA und zur späteren Röntgenfilmschwärzung inkubiert. Eine Nylonmembran wurde mit diesem Ansatz hybridisiert. Die Membran trägt die komplementären Nukleotide eines cDNA-Stranges, die in Form eines Punktepaares aufgebracht sind. In dieser Form wurden vom Hersteller 588 cDNA-Antisense-Proben aufgetragen. Die Membran trägt zusätzlich neun Housekeepinggene, die unabhängig von Anpassungsvorgängen oder pathologischen Prozessen des untersuchten Organs in gleicher Menge pro Zeiteinheit exprimiert werden. Mit Hilfe dieser Housekeepinggene konnte bei der späteren densitometrischen Auswertung eine Äquilibration der Röntgenfilme vorgenommen werden. Die mit der cDNA-Probe hybridisierte und gereinigte, noch feuchte Membran wurde anschließend in Folie eingeschweißt.

Belichtung des Röntgenfilms

Die eingeschweißte Membran wurde zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Expositions-kammer verbracht. Nach einer Belichtungszeit von 72 Stunden bei einer Temperatur von -70°C erfolgte die Filmentwicklung mit einem automatischen Röntgenfilmentwicklungsgerät. Abbildung 7 zeigt einen repräsentativen Röntgenfilm.

Auswertung des Röntgenfilms und Darstellung der Ergebnisse

Die Röntgenfilme wurden mit einer Auflösung von 600 dpi in einen PC eingescannt. Die Schwärzungen der Röntgenfilme wurden mit einer auf Densitometrie basierenden Software erfasst. Die Röntgenfilme wurden untereinander durch Abgleich mit den Schwärzungen der Housekeepinggen-mRNAs vergleichbar gemacht. Jedem Punktepaar wurde ein Nettograustufenwert zugewiesen. Voraussetzung für die densitometrische Vergleichbarkeit der Röntgenfilme der einzelnen Versuchsgruppen war ein jeweils durch die Auswertungssoftware klar identifizierbares Punktepaar. Dieser Umstand erklärt, weshalb nicht für jede Versuchsreihe und jedes Organ die gleichen mRNA-Bestimmungen durchgeführt werden konnten.

Die erhobenen Werte stellen somit Relativwerte mit Bezug zum Wert der Kontrolltiergruppe dar. Im Ergebnisteil der Arbeit sind sie als Vielfache des Wertes der Kontrolltiergruppe dargestellt.

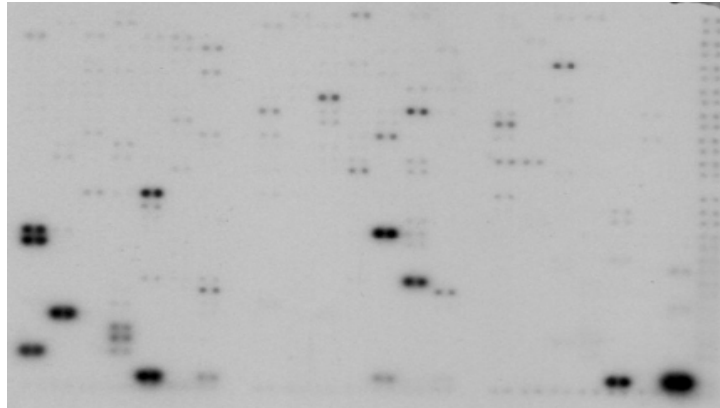


Abbildung 7: Beispiel eines Röntgenfilms zur densitometrischen Auswertung:
Erkennbar sind die einzelnen mRNAs anhand der Schwärzungen des Röntgenfilms in Form von Doppelpunkten. Am seitlichen Rand des Röntgenfilms befinden sich die Housekeepinggene.

4. ERGEBNISSE

4.1. Schockmodell

4.1.1. Allgemeines

Im Schockmodell wurden insgesamt 28 männliche Sprague Dawley Ratten beobachtet. Für die sechs Versuchsgruppen ergaben sich folgende Fallzahlen (Tabelle 4):

Tabelle 4: Verteilung der Fallzahlen auf die Versuchsgruppen. Anzahl der Tiere, die das Versuchsende erreichten.

Versuchsgruppe	Fallzahl n	Versuchsende erreicht
Kontrolle	8	8
Sham	5	5
LPS	8	0
LPS-plus-Simvastatin	7	7
Gesamtzahl	28	20

4.1.2. Hämodynamische Parameter

In der Abbildung 8 wird der Verlauf des mittleren arteriellen Druckes mit den Standardabweichungen über die Versuchsdauer in den einzelnen Versuchsgruppen dargestellt. Die beobachtete Fallzahl in den Versuchsgruppen zu den regelhaften Beobachtungszeitpunkten werden in der Tabelle 5 gezeigt.

Die Injektion von LPS führte in der LPS-Gruppe und in der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe zu einem gleichartigen Blutdruckabfall innerhalb der ersten zwanzig Minuten, der im Mittel bei 70 mmHg lag. Dieser Blutdruckabfall konnte durch die Vorbehandlung mit dem Statin nicht verhindert werden. Im Weiteren Versuchsablauf steigen die Blutdruckmittelwerte für beide Toxingruppen bis zur 120. Minute stetig an, und erreichen annähernd gleiche Werte um 100 mmHg. Die mit Simvastatin behandelten Tiere erholen sich weiterhin im Sinne einer Steigerung des MAP. In der LPS-Gruppe sinkt der MAP statistisch signifikant wieder ab ($p < 0,05$ in der 120.-, 140.- und 160. Minute), und die Tiere versterben vor Versuchsende im septischen Schock.

Die Kontrollgruppe zeigt einen unauffälligen Verlauf der mittleren arteriellen Blutdruckwerte.

Tabelle 5: Anzahl der Versuchstiere in den Versuchsgruppen zu den Untersuchungszeitpunkten.

Versuchsreihe	initial	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min	140 min	160 min	180 min	200 min	220 min	240 min
Kontrolle	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Sham	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
LPS	8	8	8	8	8	8	8	6	4	4	1	0	0
LPS-plus-Simvastatin	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

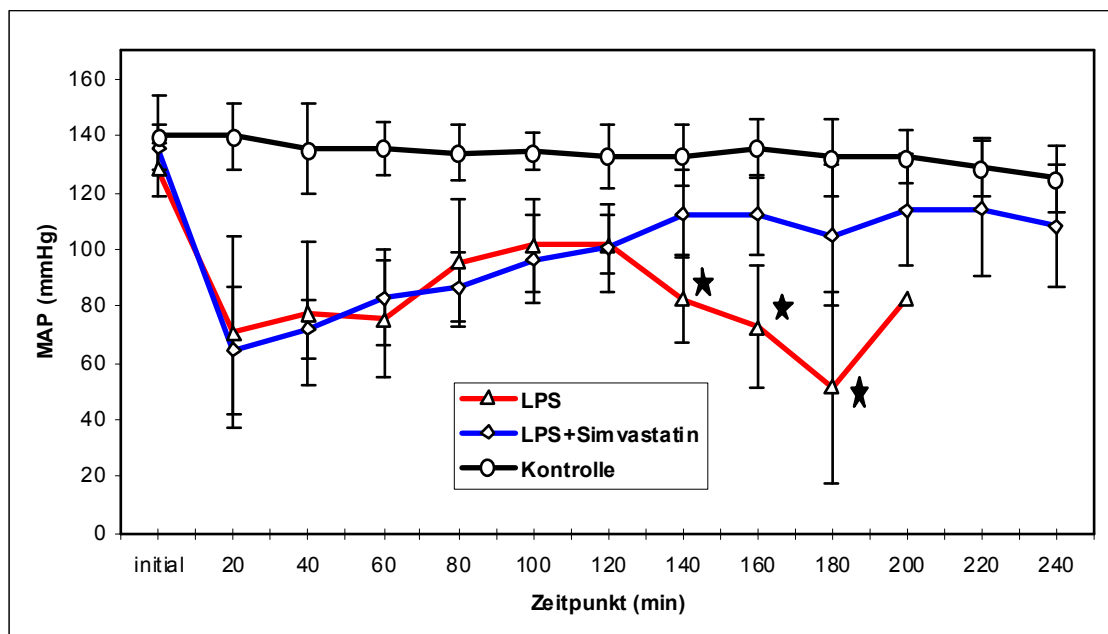


Abbildung 8: Zeitliche Verläufe der mittleren arteriellen Blutdrücke (MAP) des Schockmodells. ★ $p < 0.05$

Auswirkungen des Lipopolysaccharids auf die Herzfrequenz:

Die Abbildung 9 stellt die zeitlichen Verläufe der Herzfrequenzen der Versuchsgruppen mit den Standardabweichungen dar.

Die LPS-Gruppe zeigt einen signifikanten Herzfrequenzanstieg über eine Zeitdauer von 200 Minuten, und erreicht zu diesem Zeitpunkt ein Maximum von 564 Schlägen pro Minute.

Die mit Simvastatin vorbehandelten Tiere sind anfangs ebenfalls tachykard, jedoch nicht in dem Ausmaß wie der LPS-Gruppe. Zum Versuchsende nähert sich der Kurvenverlauf dem der Kontrollgruppe an. Die Kontrollgruppe zeigt einen unauffälligen Verlauf der Herzfrequenzen.

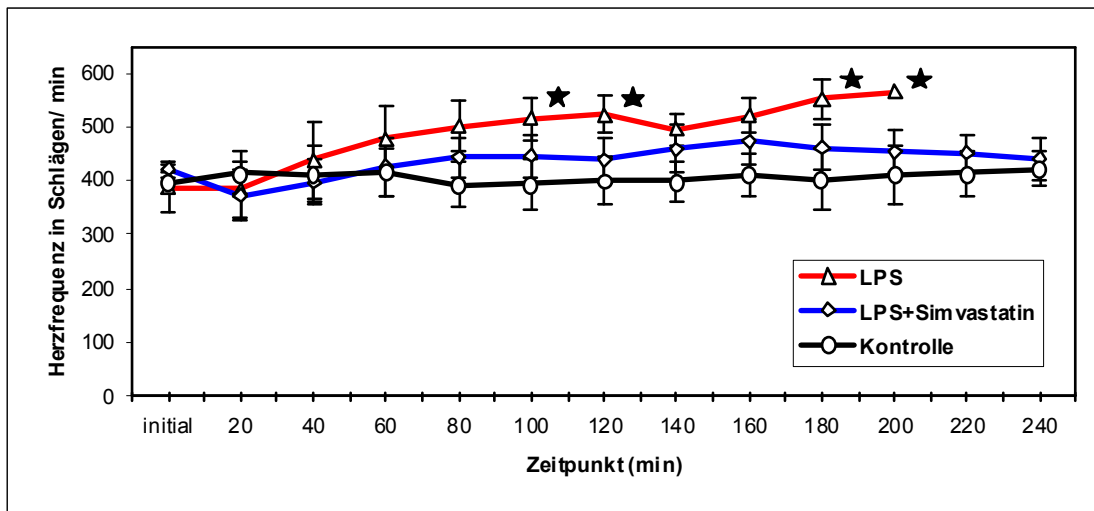


Abbildung 9: Zeitliche Verläufe der mittleren Herzfrequenzen des Schockmodells.

★ $p < 0,05$

4.1.3. Auswirkungen des Lipopolysaccharids auf den Hämatokrit

Abbildung 10 zeigt den zeitlichen Verlauf der Hämatokritveränderungen mit Standardabweichungen. Die Versuchsgruppen haben anfangs vergleichbare Hämatokritwerte von 40%. Die Werte der Toxingruppen steigen innerhalb der ersten Stunde nach Toxingabe im Vergleich zur Kontrollgruppe an. Im Folgenden trennen sich signifikant die Datenreihen der Toxingruppen voneinander, wobei die LPS-Gruppe ein Maximalmittelwert von 55,5% annimmt (180. Minute). Die LPS-plus-Simvastatin-Gruppe erreicht einen maximalen Hämatokrit von 49,1% (120. Minute), um am Versuchsende einen geringeren Wert von 45,4% zu erreichen. Die Wertereihe der Kontrollgruppe stellt sich unauffällig dar.

4.1.4. Mittlere Überlebenszeiten

Abbildung 11 zeigt die mittleren Überlebenszeiten der Versuchsgruppen. Die mittlere Überlebenszeit der LPS-Versuchsgruppe ist mit 181,5 Stunden gegenüber den anderen Gruppen, die allesamt die gesamte Beobachtungszeit überlebten signifikant verringert.

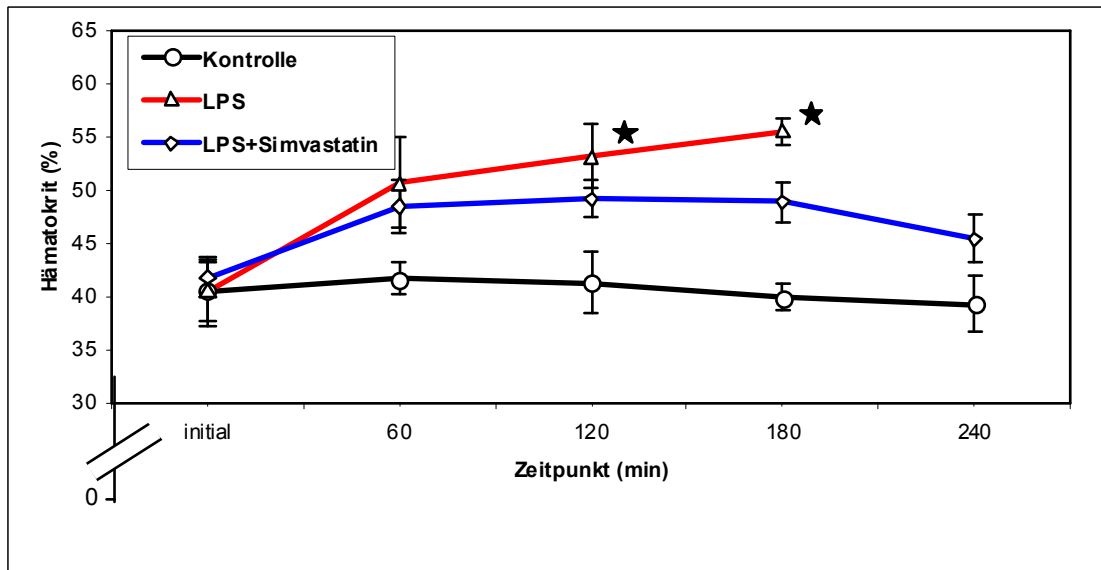


Abbildung 10: Zeitliche Verläufe der mittleren Hämatokritwerte des Schockmodells.

★ $p < 0,05$

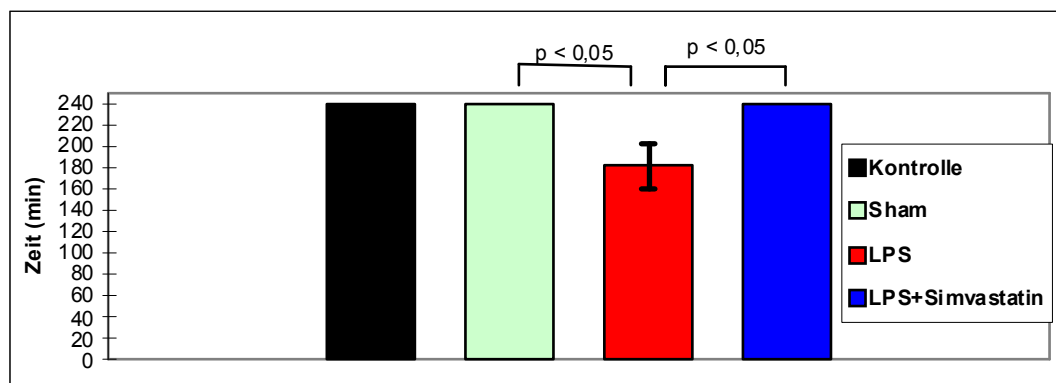


Abbildung 11: Mittlere Überlebenszeiten der Versuchsgruppen des Schockmodells.

4.2. Leukozytenakkumulation in den Schockorganen

4.2.1. Effekte des LPS auf die MPO-Aktivität in der Lunge

Abbildung 12 stellt die mittlere MPO-Aktivität in den Lungenproben der Versuchsgruppen mit den Standardabweichungen dar.

Die Gabe von LPS führt zu einer deutlichen Erhöhung der MPO-Aktivität um nahezu das Dreifache im Vergleich zur Kontrolle. Die Statingabe vor Toxininjektion bewirkt eine signifikant geringere Granulozyteninfiltration der Lunge, welche dem Granulozytengehalt der Lungen der Kontrollgruppe entspricht.

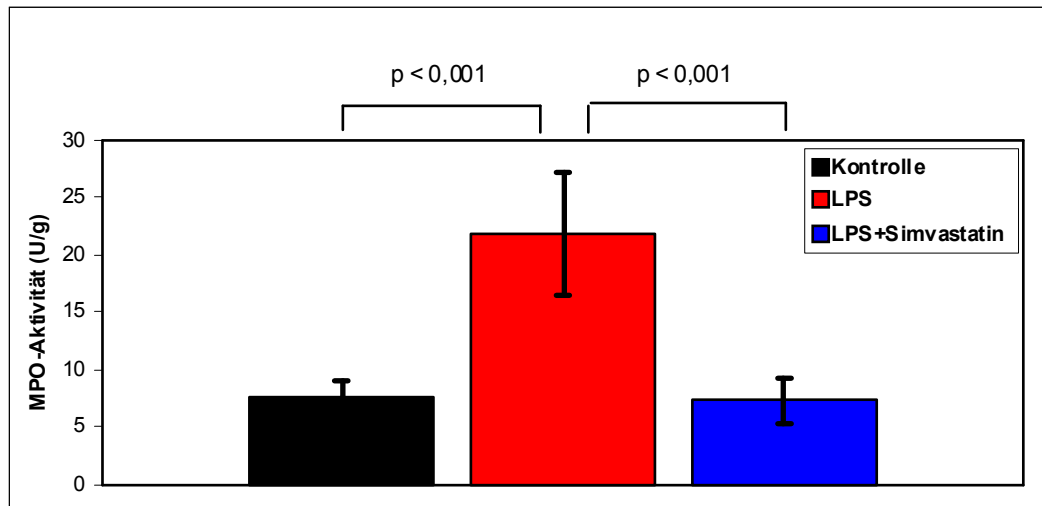


Abbildung 12: Mittlere MPO-Aktivität der Versuchsgruppen in der Lunge.

4.2.2. Effekte des LPS auf die MPO-Aktivität im Darm

Abbildung 13 stellt die zeigt die mittlere MPO-Aktivität in den Darmproben der Versuchsgruppen mit den Standardabweichungen dar.

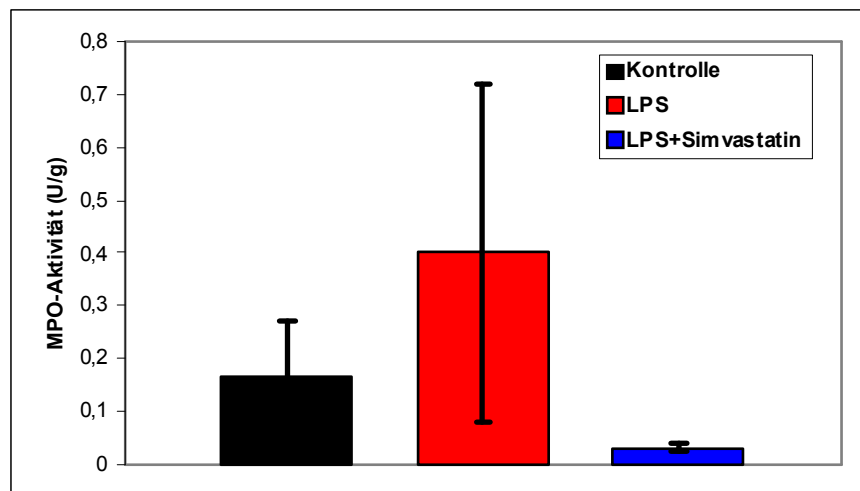


Abbildung 13: Mittlere MPO-Aktivität der Versuchsgruppen im Darm.

Es besteht eine erhöhte mittlere Enzymaktivität in den Darmproben der LPS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Statingruppe wurde eine sehr geringe Enzymaktivität gemessen, die noch unter der der Kontrollgruppe liegt.

4.3. Histologie

4.3.1. Darm

Das proximale Jejunum ließ bei den mit LPS behandelten Tieren eine ausgeprägte Schädigung der Mukosa erkennen. Man findet eine starke Ulzeration im Bereich der Lamina propria epithelialis, sowie auch der tiefer gelegenen Schichten. Große Teile des Epithels sind abgestoßen. Im Vergleich zur Histologie der Kontrollgruppe erkennt man hydropisch deformierte Drüsenzellen. Die palisadenförmige Anordnung der Drüsenzellen ist aufgehoben. Die Serosa wirkt im Vergleich zur Kontrollgruppenhistologie verbreitert. Man erkennt multiple Thromben in der Gefäßlichtung im Sinne einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIG). Bei stärkerer Vergrößerung kann man die granulozytäre Infiltration des Jejunums, als Zeichen der entzündlichen Pathogenese dieser morphologischen Veränderungen erkennen. Es ergibt sich das typische Bild eines ischämischen Darmes.

Die Makroskopie bei der Organentnahme war gekennzeichnet durch zahlreiche Nekrosen der Darmwand, sowie multiple Einblutungen. Die Darmschlingen waren dilatiert, und zeigten eine träge Peristaltik.

Die Abbildungen 14 und 15 stellen die histologischen Befunde dar.

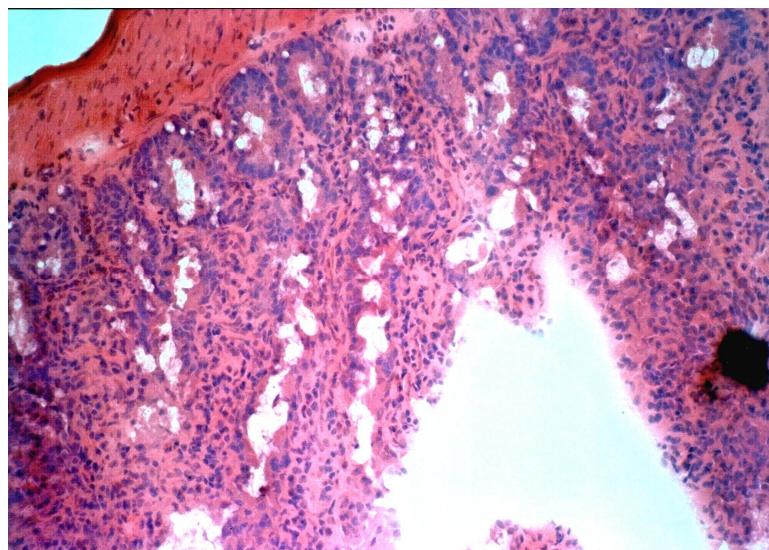


Abbildung 14: Histologisches HE-Präparat des proximalen Jejunums der LPS-Gruppe. Vergrößerung 100fach.

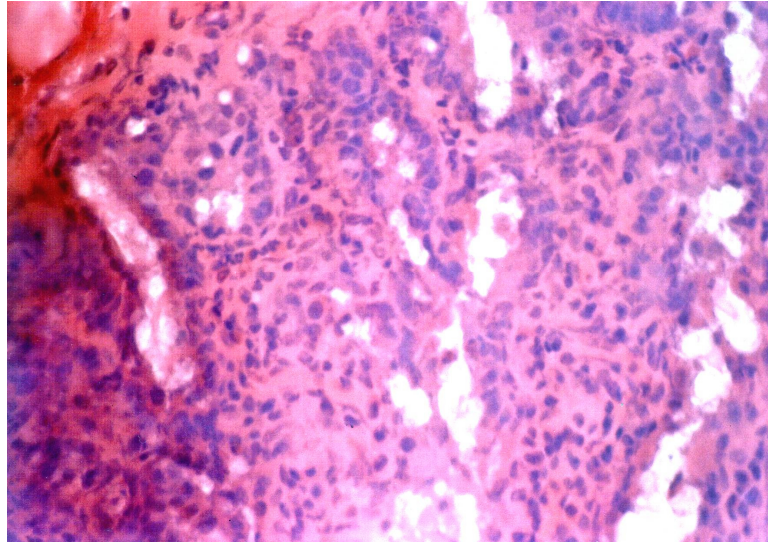


Abbildung 15: Histologisches HE-Präparat des proximalen Jejunums der LPS-Gruppe. Vergrößerung 400fach.

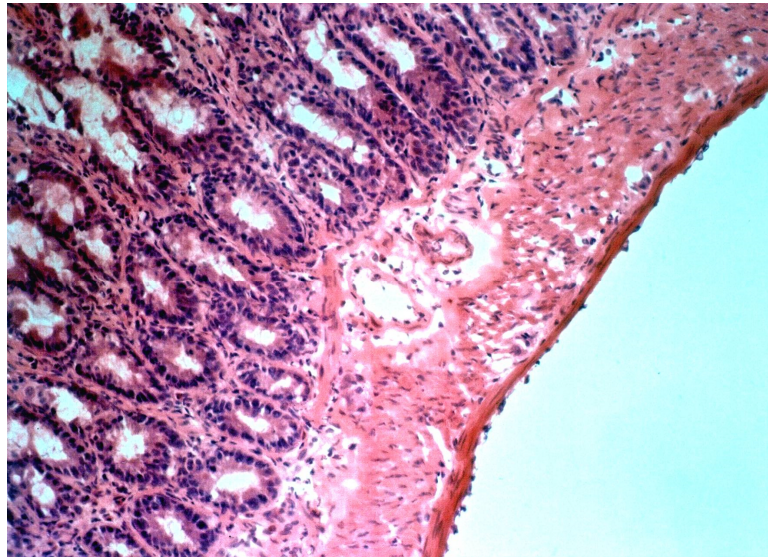


Abbildung 16: Histologisches HE-Präparat des proximalen Jejunums der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe. Vergrößerung 200fach.

Im Gegensatz dazu erkennt man in der Abbildungen 16 die nur sehr geringen histologischen Veränderungen des Jejunums in der LPS-plus-Simvastatingruppe: Bis auf eine leichte Schwellung der Drüsenzellen sind keine geweblichen Destruktionen zu erkennen. Es finden sich keine granulozytären Infiltrationen. Die Gefäßlumina sind nicht thrombotisch verlegt. Die Serosa ist zart. Makroskopisch waren keine pathologischen Auffälligkeiten zu verzeichnen.

4.3.2. Herz

Die histologische Aufarbeitung der Herzproben der LPS-Gruppe ergab nur diskrete Veränderungen der Organtextur. Hier korrelierte die palpatorisch verminderte Konsistenz des Organs mit einer makroskopisch erkennbaren Dilatation der Ventrikel und einer lichtmikroskopischen Gefügedilatation im Vergleich zur LPS-plus-Simvastatingruppe. Entzündliche oder ischämische Areale waren nicht aufzufinden. Dies demonstrieren die Abbildungen 17 und 18.

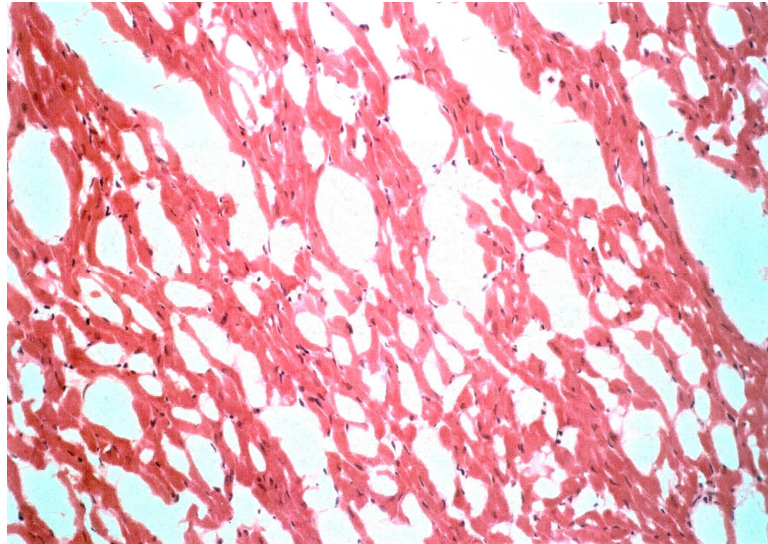


Abbildung 17: Histologisches HE-Präparat des Herzens der LPS-Gruppe. Vergrößerung 200fach.

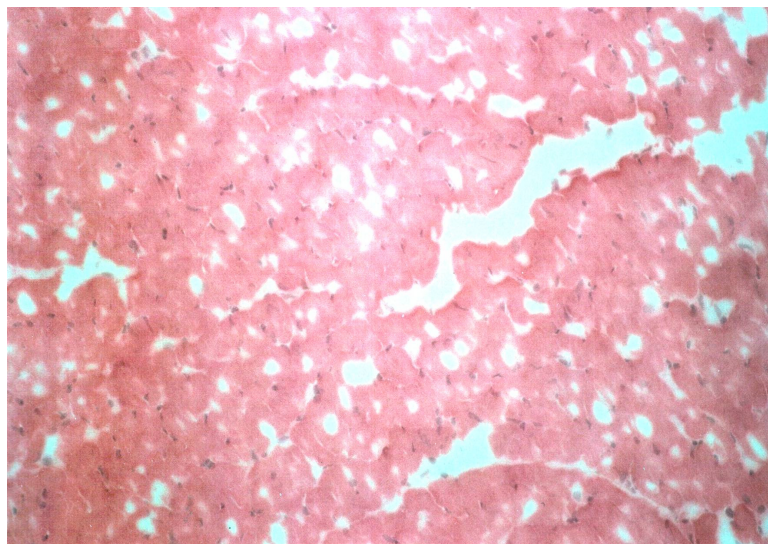


Abbildung 18: Histologisches HE-Präparat des Herzens der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe. Vergrößerung 200fach.

4.3.3. Leber

Die Analyse der Leberproben zeigte nur pathologische Veränderungen in der LPS-Versuchsreihe. Bei der Organentnahme fiel eine blutschwere, dunkle Leber auf, wie sie in der LPS-plus-Simvastatingruppe nicht in diesem Ausmaß festgestellt werden konnte.

Die histologische Aufarbeitung der Organe zeigen die Abbildungen 19 und 20.

Die erste Abbildung zeigt die typische Anordnung der Leberzellplatten um die Zentralvene, sowie die dazugehörigen Portalfelder. Augenscheinlich ist die Auflockerung der Leberzellarchitektur um die Zentralvene herum, was als Korrelat der blutgestauten Lebersinusoide zu werten ist. Erythrozyten sind hier nur noch als homogene amorphe Masse zwischen den Leberzellen auszumachen. Im Bereich der Portalfelder sind rundzellige Infiltrate als Zeichen einer entzündlichen Organaffektion zu erkennen. Die stärkere Vergrößerung in der Abbildung 20 zeigt eine läppchenzentrale Auflösung der Leberzellmembranen, was als Homogenisierung der Schnittfläche in Erscheinung tritt. Diese Befunde sind vereinbar mit den typischen pathologischen Veränderungen des Schocks.

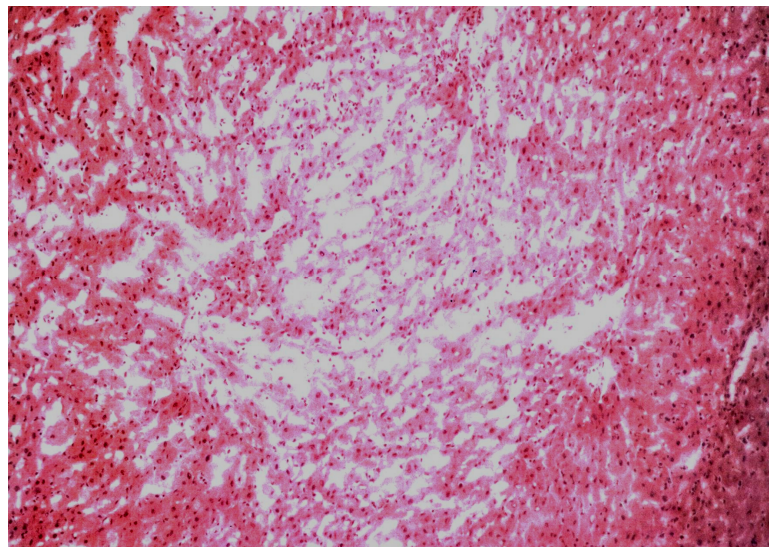


Abbildung 19: Histologisches HE-Präparat der Leber der LPS-Gruppe. Vergrößerung 200fach.

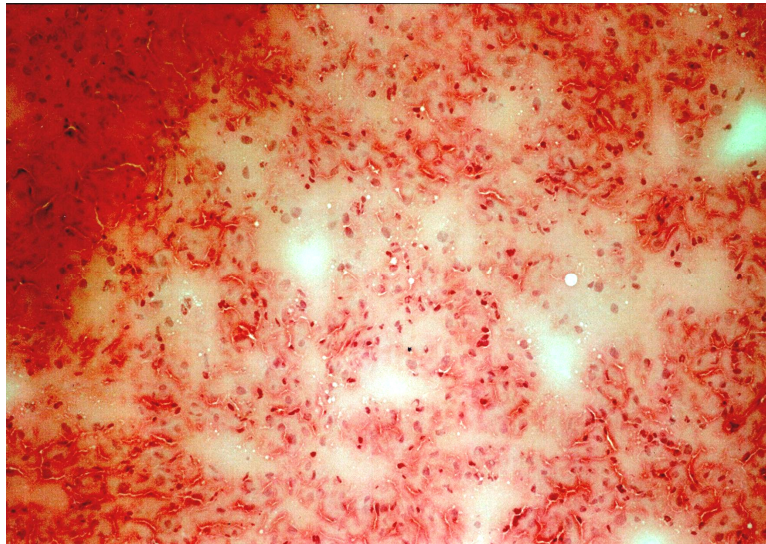


Abbildung 20: Histologisches HE-Präparat der Leber der LPS-Gruppe. Vergrößerung 400fach.

Die Abbildungen 21 und 22 stammen von der LPS-plus-Simvastatingruppe, und demonstrieren die deutlich geringere Schädigung der Leber durch die Statinvorbehandlung. Die geringer vergrößerte Aufnahme zeigt keine Auflockerung des Organparenchyms. Die 200fache Vergrößerung zeigt intakte Hepatozyten ohne Zelllysen. Fettvakuolen bestehen im Vergleich zur Abbildung der LPS-Gruppe in deutlich geringerer Anzahl. Granulozytäre Infiltrate findet man in beiden Abbildungen nicht.

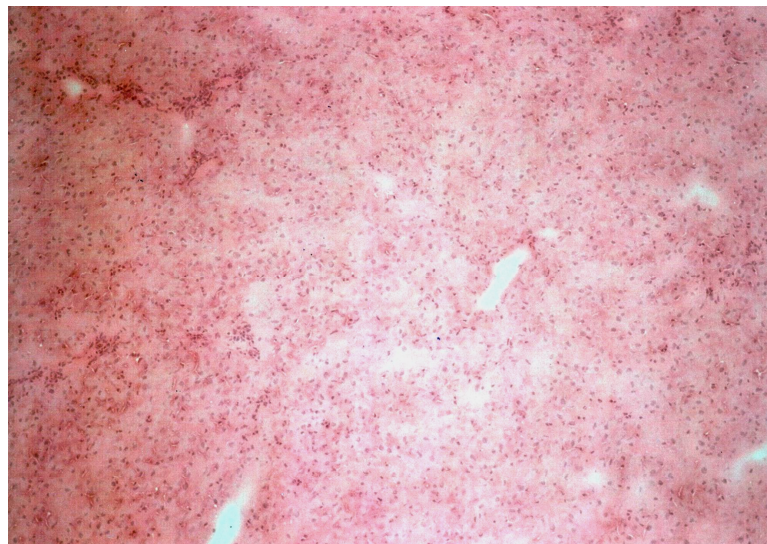


Abbildung 21: Histologisches HE-Präparat der Leber der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe. Vergrößerung 100fach.

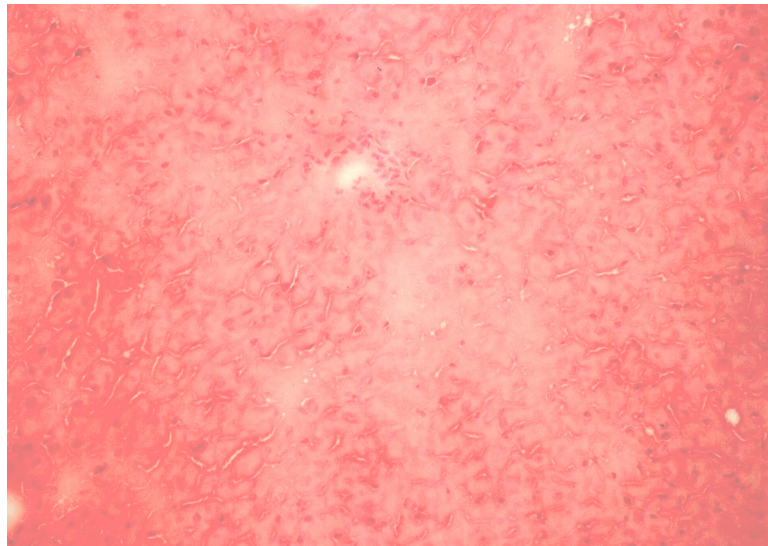


Abbildung 22: Histologisches HE-Präparat der Leber der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe. Vergrößerung 200fach.

4.3.4. Niere

Die Nieren sind besonders häufig in die Pathophysiologie des Schocks involviert mit Ausbildung einer akuten Niereninsuffizienz. Schocktypische Veränderungen der Organtextur ergaben sich nur in der LPS-Gruppe. In der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe erhielten wir histologische Normalbefunde. Typisch für die Morphologie der Niere im Rahmen des Schocks sind tubuläre Nekrosen sowie hyaline Mikrothromben.

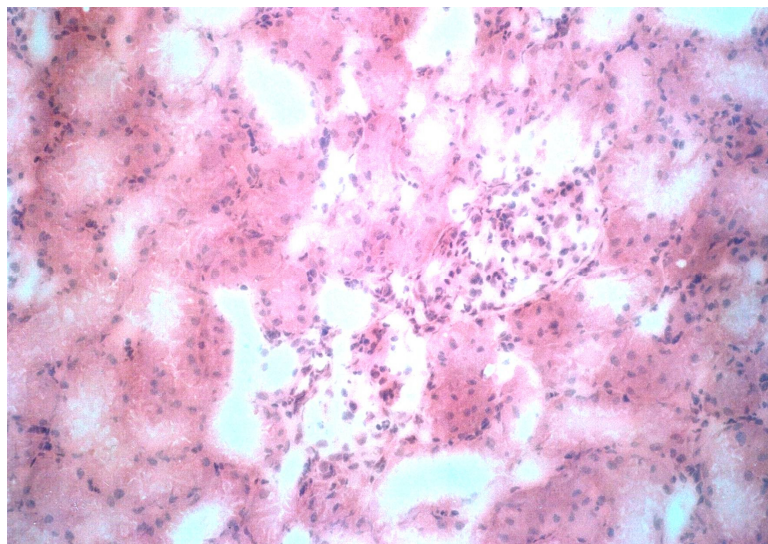


Abbildung 23: Histologisches HE-Präparat der Niere der LPS-Gruppe. Vergrößerung 200fach.

Die Abbildung 23 zeigt Nierengewebe der LPS-Gruppe. In der Mitte erkennt man ein Glomerulum, an dessen Kapillarschlingen teilweise Granulozyten adhäreren. Des Weiteren stellen sich die Nierentubuli dar, die unscharf als Zeichen der Zelllyse begrenzt sind. Im Tubuluslumen finden sich abgestoßene, bereits nekrotische Tubulusepithelzellen, die sich zu amorphen, hyalinen Gebilden formiert haben. Insgesamt erkennt man das Vollbild einer schockgeschädigten Niere.

Die Makropathologie der entnommenen Nieren war gekennzeichnet durch geschwollene, konsistenzvermehrte und im Vergleich zur Kontrollgruppe dunklere Organe. Die Organoberfläche erschien dabei glatt und homogen gefärbt.

4.4. Bestimmung der mRNA-Expression im Endotoxinschock

4.4.1 Darm

Hitzeschockproteine













Abbildung 24 und Tabelle 4 stellen die Ergebnisse der Hitzeschockprotein-Bestimmung dar. Es wurden die mRNAs der Hitzeschockproteine mit einer Größe von 27, 60 und 70 kDa analysiert.

Das HSP 27 der LPS-Versuchsgruppe zeigt eine um den Faktor 1,11 höhere Expression verglichen mit der Kontrolle. In doppeltem Maße findet dies unter Vorbehandlung mit dem Statin statt. Eine Steigerung um den Faktor 5,47 erkennt man in der Sham-Gruppe.

Beim HSP 60 ist nach LPS-Applikation ebenfalls eine Steigerung der Expression um den Faktor 1,66 erkennen, welche unter Statinvorbehandlung unter dem Wert der Kontrollgruppe liegt. Die alleinige Simvastatingabe bewirkt eine Erhöhung der HSP 60-Expression um den Faktor 1,86.

Das HSP 70 wird unter LPS-Reiz um den Faktor 3,99 vermehrt exprimiert, und erfährt eine Reduzierung nach Statinvorbehandlung. Die Shamgruppe weist erniedrigte RNA-Mengen des HSP 70 im Vergleich zur Kontrollgruppe auf.

Tabelle 4: Röntgenfilmschwärzungen durch die mRNAs der HSPs 27, 60 und 70. Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Darm.

	Sham	LPS	LPS+Simva	Kontrolle
HSP 27				
HSP 60				
HSP 70				

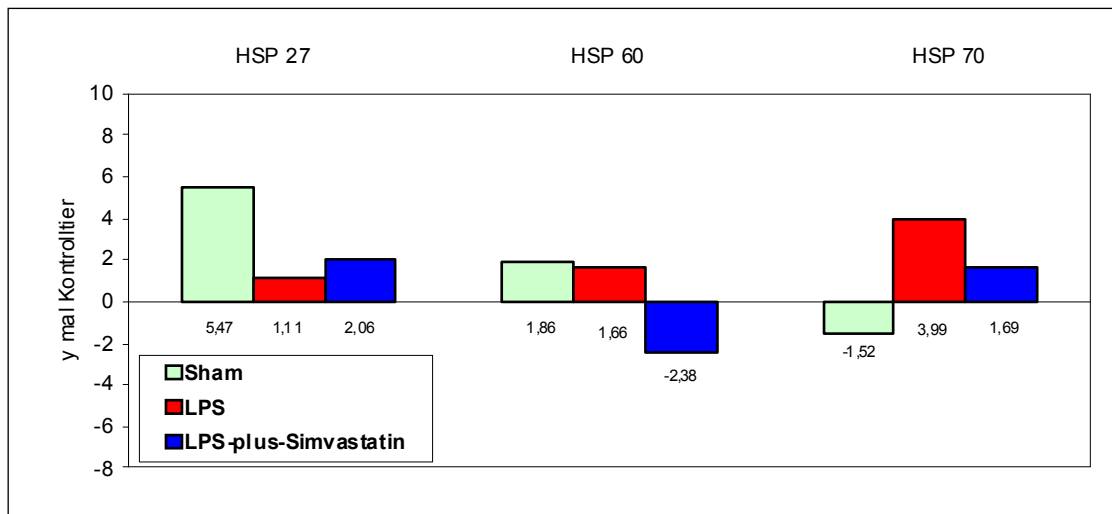


Abbildung 24: Ergebnisse des cDNA Expression-Array für die Hitzeschockproteine. Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Darm.

I- κ B α

Abbildung 25 zeigt die Konzentrationen von I- κ B α gemessen im Darmgewebe der LPS-Versuchsreihe. Tabelle 5 gibt die entsprechenden Spots auf den Röntgenfilmen wieder.

Man erkennt eine nahezu 2,5-fach erhöhte Konzentration des I- κ B α in der LPS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine Vorbehandlung mit Simvastatin, führt zu geringeren Mengen an I- κ B α . In der Sham-Gruppe ist die Konzentration an I- κ B α größer als in der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe.

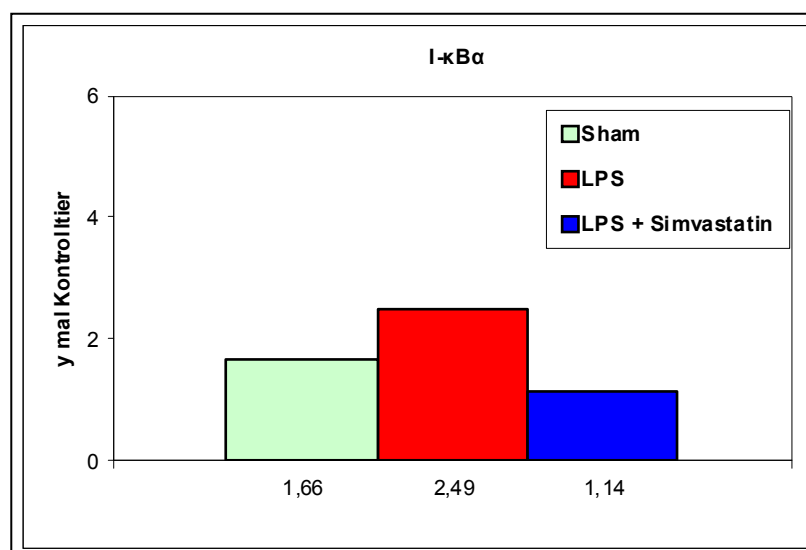






Abbildung 25: Ergebnisse des cDNA Expression-Array für das I- κ B α . Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Darm.

Tabelle 5: Röntgenfilmschwärzungen durch die mRNAs des I- κ B α .
Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Darm.

	Sham	LPS	LPS+Simva	Kontrolle
I- κ B α				

4.4.2 Herz

Hitzeschockproteine

Die Abbildung 26 zeigt die Ergebnisse für die Hitzeschockproteine am Organ Herz. Tabelle 6 stellt die Dichteunterschiede auf den Röntgenfilmen dar.

Für das HSP 27 zeigt sich eine Steigerung der HSP 27-mRNA-Konzentration um den Faktor 1,84 im Vergleich zum Wert der Kontrollgruppe. Sowohl in der toxinbehandelten- als auch in der ausschließlich statinbehandelten Gruppe kommt es zu einer rund 4-mal geringeren Expression von HSP 27 verglichen mit der Kontrolle.

Eine Steigerung der HSP 60-mRNA-Konzentration findet unter Toxinreiz statt bei Verminderung der Konzentrationen in den Statingruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Beim HSP 70 ist der Expressionsanstieg unter Toxinreiz noch vergleichbar mit dem der anderen HSPs. Nach Statinvorbehandlung folgt eine deutlich verminderte Expression unter die Nachweisgrenze, weshalb hier kein Wert angegeben ist.

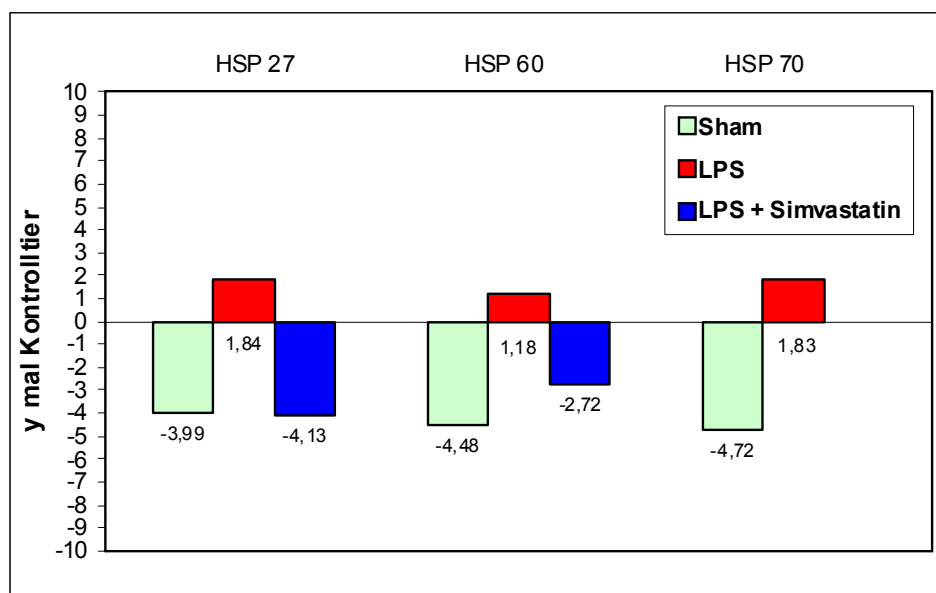














Abbildung 26: Ergebnisse des cDNA Expression-Array für die Hitzeschockproteine. Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Herz.





Tabelle 6: Röntgenfilmschwärzungen durch die mRNAs der HSPs 27, 60 und 70. Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Herz.

	Sham	LPS	LPS+Simva	Kontrolle
HSP 27				
HSP 60				
HSP 70				

I-κBα

Die Daten von I-κBα für das Organ Herz finden sich in der Abbildung 27, sowie in der Tabelle 7. Man erkennt eine Zunahme der Genexpression in der LPS-Gruppe um den Faktor 2,5 im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den statinbehandelten Versuchsgruppen findet man eine Abnahme der mRNA-Konzentration, wobei diese bei der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe mit einem Faktor von fast – 4,5 deutlicher ausgeprägt ist als in der Sham-Gruppe mit einem Faktor von – 1,2.

Tabelle 7: Röntgenfilmschwärzungen durch die mRNAs des I-κBα. Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Herz.

	LPS	LPS+Simva	Sham	Kontrolle
I-κBα				

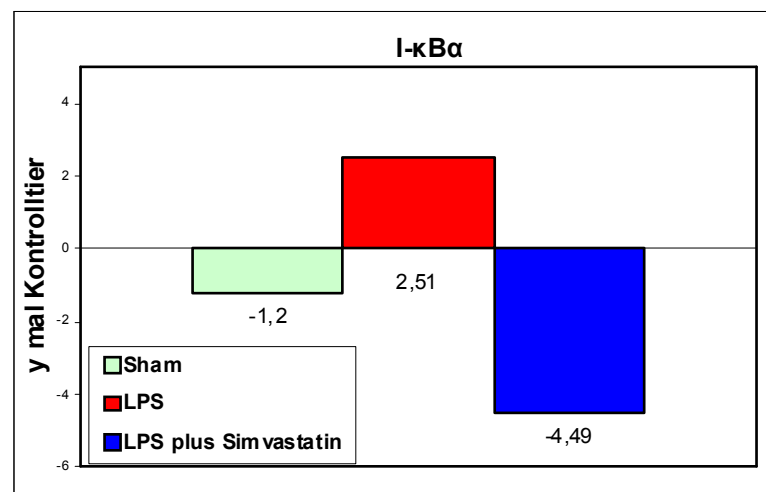


Abbildung 27: Ergebnisse des cDNA Expression-Array für das I-κBα. Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Herz.





p 105 (NF- κ B1)

Die Tabelle 8 und die Abbildung 28 stellen die Ergebnisse dar.

Man erkennt eine vermehrte Genexpression unter Toxinreiz, die durch die Gabe des Statins vermindert werden kann, vergleichbar mit den Ergebnissen des I- κ B α . Auch hier ist die Hemmung der Genexpression in der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe deutlich stärker als in der Sham-Gruppe.

Tabelle 8: Röntgenfilmschwärzungen durch die mRNAs des p 105.

Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Herz.

	LPS	LPS+Simva	Sham	Kontrolle
p 105				

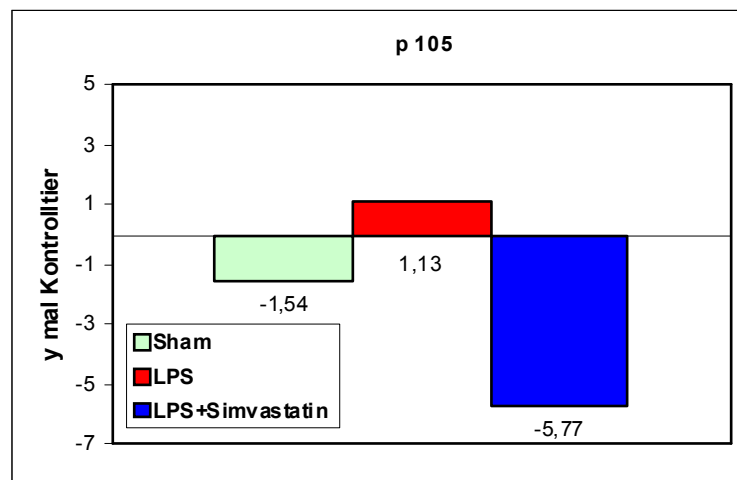


Abbildung 28: Ergebnisse des cDNA Expression-Array für das p 105. Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Herz.

VCAM-1

Die Abbildung 29 verdeutlicht die Wirkung des Simvastatins: Die LPS-Injektion führt zu einer Zunahme der Expression um den Faktor 2,47 verglichen mit der Kontrolle, während die Vorbehandlung mit dem Statin nur zu einer Erhöhung um den Faktor 1,88 führt. In der Sham-Gruppe kommt es zu einer Hemmung der VCAM-1-Expression unter das Niveau der Kontrolltiergruppe.

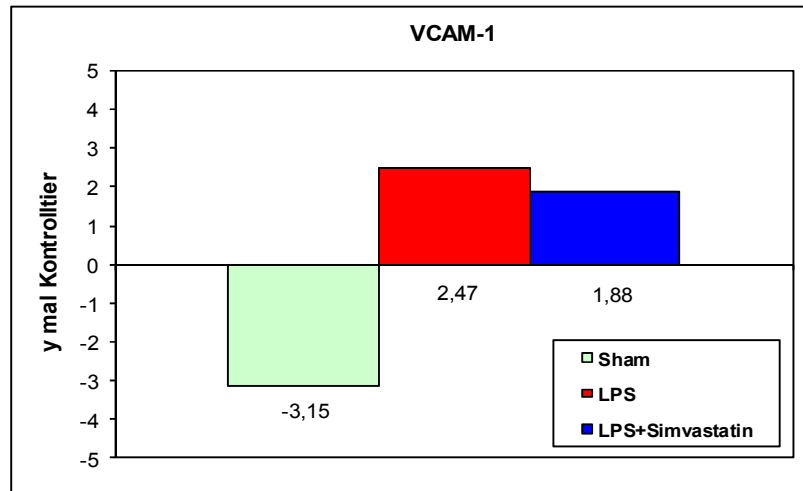






Abbildung 29: Ergebnisse des cDNA Expression-Array für das VCAM-1. Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Herz.





Tabelle 9: Röntgenfilmschwärzungen durch die mRNAs des VCAM-1. Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Herz.

	Sham	LPS	LPS+Simva	Kontrolle
V-CAM				

Integrin β_1

Die Abbildung 30 demonstriert, dass es durch die LPS-Injektion zu einem Anstieg des Integrin β_1 um nahezu das 6-fache des Kontrollwertes kommt. Im Gegensatz zeigt sich bei Statingabe ein Abfall der Expression unter den Kontrollwert.

Tabelle 10: Röntgenfilmschwärzungen durch die mRNAs des Integrin β_1 . Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Herz.

	Sham	LPS	LPS+Simva	Kontrolle
Integrin β_1				

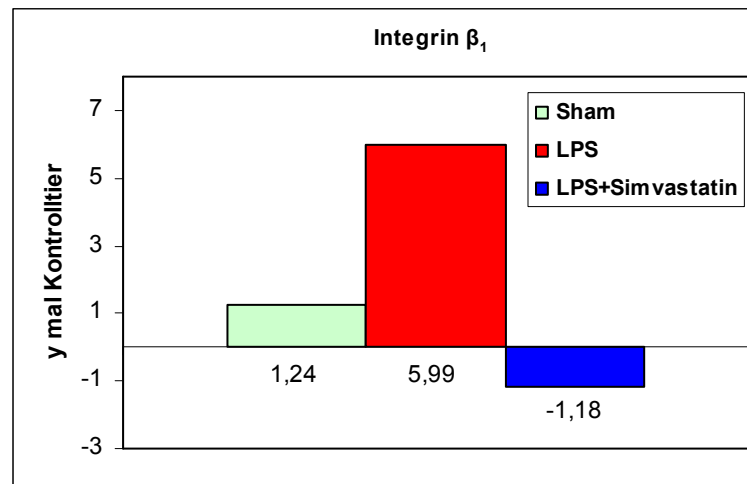


Abbildung 30: Ergebnisse des cDNA Expression-Array für das Integrin β_1 . Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Herz.

4.4.3 Leber

Hitzeschockproteine

Die Abbildung 31 und Tabelle 11 stellen die Daten für die HSPs 27, 60 und 70 dar.

Das HSP 27 zeigt eine Steigerung der HSP-Expression nach LPS-Injektion um das 5,54-fache des Wertes der Kontrolltierreihe, die durch die Behandlung mit dem Statin um den Faktor 1,31 deutlich gemindert werden kann. Die alleinige Gabe von Simvastatin führt ebenfalls zu einer gesteigerten Expression des HSP 27, die ausgeprägter ist als die der LPS-plus-Simvastatingruppe.

Unter Toxinreiz kommt es zu einer Abnahme der HSP-60-Transkription um den Faktor 1,05 der Kontrolle, was ebenfalls bei LPS-Injektion kombiniert mit einer Statinbehandlung der Fall ist. Beim HSP 60 steigt die Expression um mehr als den 3-fachen Kontrollwert in der Sham-Gruppe.

Für das HSP 70 ergeben sich rund 19-fach erhöhte Mengen an HSP 70-RNA im Vergleich zum Referenzwert, wenn LPS appliziert wurde. Unter Gabe von Simvastatin konnte dieser Effekt um etwas mehr als die Hälfte reduziert werden. In der Sham-Gruppe zeigt sich eine Steigerung der Transkription um den Faktor 1,31 verglichen mit der Kontrolltiergruppe.

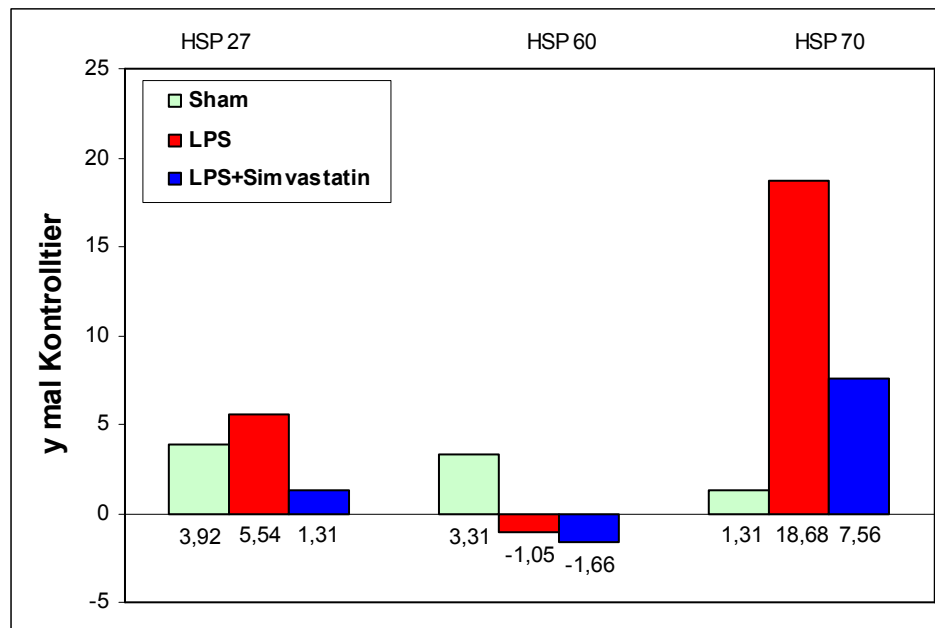


Abbildung 31: Ergebnisse des cDNA Expression-Array für die Hitzeschockproteine. Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Leber.

Tabelle 11: Röntgenfilmschwärzungen durch die mRNAs der HSPs 27, 60 und 70. Darstellung der Versuchsgruppen für das Organ Leber.

	Sham	LPS	LPS+Simva	Kontrolle
HSP 27				
HSP 60				
HSP 70				

5 DISKUSSION

In Abhängigkeit vom Immunstatus des Patienten, der zugrunde liegenden Erkrankung, der Erregervirulenz und dem Zeitpunkt des Therapiebeginns können sich ausgehend von einer lokalen Infektion eine Sepsis, und gegebenenfalls ein septischer Schock manifestieren. Was den Fortlauf und die Prognose der Erkrankung beeinflusst ist dann weniger die ursächliche Infektion, sondern vielmehr der induzierte Schock und das damit assoziierte Organversagen.

5.1. Hämodynamik und Mortalität im Endotoxinschock

Das Lipopolysaccharid von *E. coli* (Serotyp O127:B8) verursachte eine sofortige arterielle Hypotonie, die mit einer Tachykardie zur Aufrechterhaltung des Herzzeitvolumens kompensiert wurde. Die hypotonen Blutdruckwerte hielten bei zunehmender Tachykardie an, bis die Tiere im Kreislaufschock innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 4 Stunden verstarben (181,5 Minuten im Mittel). Im Falle der LPS-plus-Simvastatingruppe fand eine Erholung von den initial hypotonen Blutdruckwerten hin zu nahezu normotonen Blutdrücken statt. Zum Ende der Beobachtungszeit kehrten die zuvor tachykarden Herzfrequenzen der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe auf annähernd physiologische Werte zurück. Sämtliche mit Simvastatin vorbehandelte Tiere überlebten die maximale Beobachtungszeit.

Die hypotonieinduzierende Wirkung der Lipopolysaccharide wurde in einer Vielzahl von tierexperimentellen Arbeiten, aber auch in klinischen Studien beschrieben. Der Blutdruckabfall in der akuten Phase wird mit einer vermehrten NO-Freisetzung durch die eNOS erklärt. In der subakuten Phase des Schocks erfolgt die Freisetzung von NO durch iNOS, die durch das Lipopolysaccharid induziert wird (Hoque, A.M. *et al.* 1998, Chen, C.H., *et al.* 2007, Alvarez de Sotomayor M. *et al.*, 2008). Eine im Versuchsaufbau ähnliche Arbeit von Liu, S.F. *et al.* (1997) stellte den Zusammenhang zwischen NF- κ B und der iNOS her: In einem Rattenschockmodell wurde LPS intravenös appliziert. Die Untersuchung der iNOS-Aktivität in Herz und Leber ergaben erhöhte Werte für die LPS-Gruppe. Diese erhöhte Enzymaktivität der iNOS koinzidierte mit einer gesteigerten NF- κ B/DNA-Komplexbildung im Lungengewebe. Ein Inhibitor der NF- κ B-Aktivierung (Pyrrolidin dithiocarbamat (PDTC)) reduzierte dosisabhängig die iNOS-mRNA, die iNOS-Aktivität sowie auch die Nitrit- und Nitratkonzentrationen im Plasma als indirektes Zeichen einer verminderten NO-Produktion. Als Resultat dieser Effekte kam es zu einer signifikanten Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks im Vergleich zu der Versuchsgruppe.

Eine Überexpression der eNOS durch Simvastatin konnte als protektiv hinsichtlich der LPS-induzierten Hypotension erkannt werden (Rikitake, Y. *et al.* Liao, J.K. 2005, Cernuda-Morollon, E. *et al.* Ridley, A.J. 2006, McGown C.C. *et al.* Brookes, Z.L., 2007). Möglicherweise erklärt dies zum Teil die verlängerten Überlebenszeiten im Therapiearm unseres Schockmodells.

In einer klinischen Studie aus dem Jahr 2001 untersuchten A.P. Liappis *et al.* 388 Fälle von Bakteriämien innerhalb eines geriatrischen Krankenhauses, wobei 35 Patienten regelmäßig Statine einnahmen. Im Vergleich war die Mortalitätsrate in der Statingruppe mit 6% geringer als die der Kontrollgruppe mit 28%. Die Mortalitätsrate der Patienten, die direkt aufgrund der Infektion verstorben sind beträgt 3% in der Statingruppe, und 20% in der Kontrollgruppe. Durch eine multivariate Analyse der erhobenen Daten bezüglich begleitender Erkrankungen, Medikamenteneinnahme und Alter der Patienten konnte ein statinabhängiger Effekt statistisch bewiesen werden. Eine publizierte Metaanalyse von 20 klinischen Studien erbrachte klare Hinweise auf positive Effekte der Statine im Rahmen der Sepsis (Falagas, ME *et al.*, 2008). Mekontso Dessap A. *et al.* (2011) fand ebenso ein positives Outcome von Patienten mit septischem Krankheitsbild unter Statintherapie.

Die Mehrzahl der bislang veröffentlichten Studien hatte einen retrospektiven Charakter mit entsprechend eingeschränkter Aussagekraft. Insbesondere ist die Heterogenität der eingeschlossenen Patienten in klinischen Studien ein Problem, was die statistische Ausarbeitung von Signifikanzen erschwert. Eine generelle Empfehlung zur Statingabe in der Sepsis konnte bislang aufgrund der unklaren Studienlage nicht ausgesprochen werden.

5.2. Endotheliale Permeabilitätsstörung im Endotoxinschock

Im Verlauf des Schocks kommt es zu einer Verringerung des effektiv zirkulierenden Blutvolumens durch die generelle Vasodilatation sowie durch die endotheliale Schrankenstörung mit Trans- und Exsudation. Der Hämatokrit ist ein Parameter zur Darstellung der Schrankenstörung. Die Zunahme des Hämatokrits der LPS-Gruppe von initial 40,5% auf 55,5% ist Folge einer erhöhten Permeabilität des Gefäßendothels. Diese Beobachtungen decken sich mit den Ergebnissen anderer Untersucher (Filep, J.G. *et al.* 1997, Jacobson, J.R. *et al.* 2005). Der Hämatokrit der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe lag im Verlauf des Schockmodells unter dem der LPS-Gruppe. Im weiteren Verlauf fällt der Hämatokrit in der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe zunehmend ab, und ist bei Versuchsende knapp über dem Ausgangswert.

Die bis dato veröffentlichten Arbeiten konzentrieren sich auf die iNOS, die für die Plasmaverluste im septischen Schock und damit auch für den Hämatokritanstieg in der

subakuten Phase verantwortlich zu sein scheint (Kubes, P. *et al.* Granger, D.N. 1992, Kurose, I. *et al.* 1993). Die Untersuchungen von J.G. Filep *et al.* (1997) differenzieren hierbei zwischen der eNOS- und iNOS-Aktivierung als pathogenetisch entscheidende Faktoren: In ihrem septischen Schockmodell untersuchten sie die Wirkungen von N^G-nitro-L-arginin-methylester (L-NAME), einem nicht-selektiven NOS-Inhibitor, und Aminoguanidin, einem relativ selektiven Inhibitor der iNOS. Die Injektion von 10 mg/kg LPS führte bei den Ratten zum Abfall des Blutdruckes sowie zur Erhöhung des Hämatokrits. Wurden die Tiere mit L-NAME vorbehandelt, so resultierten größere Plasmaverluste aus dem zirkulierenden Blutvolumen verglichen mit der LPS-Versuchsgruppe, obwohl die hypotonieinduzierende Wirkung des LPS in der akuten Phase des Schocks abgefangen werden konnte. Die Vorbehandlung mit Aminoguanidin zeigte verminderte Plasmaverluste. Zusammengefasst ergibt sich daraus, dass eine Hemmung der eNOS eher schädigende Effekte, während die Inhibition der iNOS im subakuten Stadium eher positive Auswirkungen auf den Organismus im septischen Schock besitzt. Neuere Arbeiten führen diesen Effekt des Statins auf eine Hemmung der Rho GTPase zurück, was eine verminderte Kontraktion des Zytoskeletts und somit eine Verschmälerung der Interzellularräume bewirkt, und gleichsam eine verstärkte Expression der eNOS zur Folge hat (Jacobson, J.R. *et al.* 2005, Rikitake, Y. *et al.* Liao, J.K. 2005, Jantzen, F. *et al.* 2007). Sowohl die Hemmung der iNOS, als auch die verstärkte Expression der eNOS durch Simvastatin sind bekannt. Unsere Hämatokritbestimmungen decken sich mit diesen Ergebnissen. Es liegt mit Blick auf die Ergebnisse der cDNA-Expression-Array-Untersuchung die Vermutung nahe, dass Simvastatin die Expression der iNOS über eine Interaktion mit NF- κ B reduziert. In den Organen Darm und Herz konnte in diesem Zusammenhang eine verminderte I- κ B α -Aktivität gesehen werden als Zeichen entweder einer verminderten NF- κ B-Aktivierung, oder einer allgemein niedrigeren entzündlichen Aktivität in den entsprechenden Geweben durch die Vorbehandlung mit Simvastatin.

5.3. Leukozytenakkumulation im Endotoxinschock

Um das Ausmaß der Organschädigung im septischen Schock, sowie deren Verminderung durch Simvastatin zu untersuchen, wurden Messungen der Aktivität der Myeloperoxidase in den Schockorganen durchgeführt. Im Falle der Lungenproben der LPS-Gruppe zeigte sich eine mehr als doppelt so hohe MPO-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Untersuchung der Proben von statinvorbehandelten Tieren ergab im LPS-Schock eine deutlich reduzierte MPO-Aktivität im Vergleich zur LPS-Gruppe. Die Erklärung hierfür liefern sowohl in-vitro- als auch in-vivo-Untersuchungen, die eine verminderte Granulozytenadhäsion an Gefäßendothelien unter Statinbehandlung im

Rahmen einer Entzündung zeigen konnten (Pruefer, D. *et al.* 1999, Lefer, A.M. *et al.* 2001, Buerke, M. *et al.* 2001, Jacobson, J.R. *et al.* 2005, Grommes, J. *et al.* 2012). In anschaulicher Weise konnten diese antiadhäsiven Wirkungen des Simvastatins von Prüfer, D. *et al.* 2002 demonstriert werden: In einem Alpha-Toxin-Modell wurde mittels Intravitalmikroskopie eine vermindertes *rolling*, ein vermindertes *sticking* und eine geringere Endotheltransmigration von Granulozyten bewiesen. In derselben Arbeit erkannte man unter Zuhilfenahme von immunhistologischen Verfahren eine um 50% verminderte Oberflächenexpression des P-Selektins bei den mit Simvastatin vorbehandelten Tieren. Diese Erkenntnisse decken sich mit den Ausführungen von Ghosh, S. *et al.* Karin, M. 2002, die dies mit der verminderten Aktivierung des NF- κ B -dem Transkriptionsfaktor des P-Selektins- in Verbindung bringen.

In Analogie zu den Lungenproben konnten wir eine verminderte MPO-Aktivität in den entnommenen Darmproben der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe verglichen mit der LPS-Gruppe messen. H. Yasuda *et al.* (2006) und M.W. Merx *et al.* (2005) konnten diesen Effekt im Rahmen eines septischen Versuchsmodells an Mäusen bestätigen. Eine Sepsis wurde hierbei mittels zökaler Ligation und Punktion und darauf folgender Peritonitis erreicht, wobei ein Teil der Versuchstiere zuvor Simvastatin erhielten. Dabei konnte eine signifikant verminderte endotheliale Leukozytenadhärenz mit entsprechend niedrigerer Leukozytenakkumulation im Therapiearm verzeichnet werden.

Zu den Organen Leber, Niere und Herz lassen sich in diesem Modellaufbau keine statistisch verwertbaren Aussagen bezüglich der MPO-Aktivität machen. In der Literatur finden sich Arbeiten, die eine Akkumulation von Granulozyten in diesen Organen bereits nach vier Stunden beschreiben. Die Mehrzahl beschreibt jedoch einen späteren Zeitpunkt der Leukozyteninfiltration. Aufgrund dieses Sachverhaltes ist es möglich, dass eine statistisch signifikante Granulozytenakkumulation in Leber, Niere und Herz erst nach vier Stunden Schockdauer erreicht wird.

5.4. Histologische Aspekte des Endotoxinschocks

In den histologischen HE-Präparaten des proximalen Jejunums konnten wir deutliche Schädigungen durch die LPS-Injektion erkennen. Es zeigten sich Ulzerationen der Lamina propria epithelialis und auch tieferer Schichten mit einer partiellen Abstoßung des geschädigten Gewebes. Zusätzlich sah man hydropisch transformierte Drüsenzellen, eine Verbreiterung der Serosa, sowie thrombosierte Gefäße. Diese Veränderungen entsprechen dem Bild eines ischämischen Darmes. Morphologische Zeichen der Inflammation waren in Form einer verstärkten granulozytären Infiltration zu erkennen. Die Vorbehandlung mit Simvastatin konnte die Entwicklung dieser Läsionen verhindern. Lediglich ein geringer Zellhydrops war in den histologischen Präparaten

feststellbar. Da man sowohl eine verminderte MPO-Aktivität als auch histologisch ein geringeres Schädigungsmuster durch den LPS-induzierten Schock erkennen konnten, zeichnet sich ein therapeutischer Nutzen des Simvastatin im septischen Schock am Dünndarm ab. Makroskopisch fand man Nekrosen und Blutungen auf den dilatierten Darmschlingen und eine kaum mehr wahrnehmbare Peristaltik bei den mit LPS behandelten Tieren, während man in der LPS-plus-Simvastatingruppe einen Normalbefund feststellen konnte.

Die histologische Aufarbeitung der Herzproben ergab in allen Versuchsreihen keine Hinweise auf entzündliche oder ischämische Organveränderungen. Vom makroskopischen Aspekt her erkannte man in der LPS-Gruppe dilatierte Ventrikel. Diese Dilatation, die vornehmlich den linken Ventrikel betrifft, konnte histologisch durch eine Gefügedilatation des Herzmuskels verifiziert werden. Diese Veränderungen waren nach Statinvorbehandlung kaum zu finden. Die von anderen Autoren beschriebenen Myokardiolyse und subendokardialen Infarkte sowie Blutungen in der Endotoxämie waren nicht nachzuweisen (Buerke, M. *et al.* 2002, Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. 1997).

Die Leber ist in 45-55% der Fälle als Schockorgan beim Menschen mit einer Sepsis in das Geschehen involviert. Akut können sich läppchenzentrale Nekrosen darstellen (Larsen, R. 1994, Werdan, K. *et al.* Müller-Werdan, U. 1996, Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. (1997). In unseren Untersuchungen konnten solche Veränderungen in der LPS-Gruppe beobachtet werden. Die Hämostase im venösen Kreislaufschenkel imponierte in den Präparaten als eine Verbreiterung der sinusoidalen Räume mit darin befindlichen lysierten erythrozytären Bestandteilen. Als Zeichen einer entzündlichen Pathogenese fand man teilweise Rundzellinfiltrate im Bereich der Portalfelder. In deutlicher Weise war der therapeutische Effekt des Simvastatins in der LPS-plus-Simvastatingruppe zu erkennen. Hier fehlten die pathohistologischen Korrelate der venösen Stauung. Entzündliche Infiltrationen waren nicht zu erkennen, so dass zusammenfassend ein protektiver Effekt des Statins histologisch nachgewiesen werden konnte. Die Makropathologie der Lebern der LPS-Gruppe war gekennzeichnet durch große, blut schwere Organe mit einem typischen muskatnussartigen Aspekt. Im Gegensatz dazu zeigten die Lebern der Tiere, die mit Simvastatin vorbehandelt wurden, keinen Blutstau und die Organgröße war vergleichbar mit der der Kontrolltiere.

Die histologische Untersuchung der Nieren ergibt in der LPS-Gruppe die typischen Zeichen der Schockniere mit Tubuluszellnekrosen und abgestoßenen Zellen im Tubuluslumen, die sich zu hyalinen Gebilden formiert haben. Makropathologisch waren die Nieren geschwollen und von dunklerer Farbe. Die Befunde entsprechen den Beobachtungen anderer Untersucher, die das gleiche Schädigungsmuster im Schock

beschreiben (Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. 1997). In der LPS-plus-Simvastatingruppe konnten kaum Veränderungen der Organbeschaffenheit festgestellt werden. Demzufolge kann man eine schockbedingte schädigende Wirkung des Lipopolysaccharids auf die Nierenmorphologie festhalten, die durch die Gabe von Simvastatin vermieden werden konnte.

5.5. Genregulation der Hitzeschockproteine im Endotoxinschock

Die Untersuchung der Darmproben mit Hilfe des cDNA Expression Array-Verfahrens ergab vergleichbare Röntgenfilmschwärzungen für die Hitzeschockproteine 27, 60 und 70. Es besteht in der LPS-Versuchsgruppe eine 4-fache Erhöhung der HSP 70-mRNA-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei Vorbehandlung mit Simvastatin wird die Konzentration lediglich um den Faktor 1,69 erhöht. Es ist bekannt, dass eine hohe HSP 70-Konzentration positive Effekte auf die Organintegrität besitzt. Die Induktion von HSP 70 durch Natrium-Arsenik koinzidierte im Versuchsaufbau von Hauser, G.J. *et al.* (1996) mit einer verminderten LPS-induzierten iNOS-Expression, und demzufolge auch mit einer geringer ausgeprägten Hypotension in der Sepsis. In ähnlicher Weise demonstrierten Lau, S.S. *et al.* (2000), dass die iNOS-Expression in Kardiomyozyten von LPS-behandelten Mäusen, die HSP 70 überexprimierten geringer war als in der Kontrollgruppe (Schema zur Hemmung proinflammatorischer Prozesse durch HSP 70 in Abbildung 32). Die Überlebenszeiten der Tiere waren in diesem Modell gegenüber der Kontrollgruppe verlängert. Aus unseren Ergebnissen könnte geschlossen werden, dass die erhöhten Konzentrationen der HSP 70-mRNA in den Darmproben mit der proinflammatorischen Wirkung des LPS zusammenhängen. Simvastatin scheint - mit Blick auf die erhobenen Daten - kein HSP 70-Induktor zu sein. Simvastatin reduziert die HSP-70-Induktion unter endotoxämischen Bedingungen. Das HSP 70 könnte daher als Parameter für den Schweregrad entzündlicher Vorgänge herangezogen werden.

Das HSP 60 wurde in der Vergangenheit vor allem mit der Atherogenese in Verbindung gebracht (Amberger, A. *et al.* 1997). In in-vitro-Untersuchungen konnte erkannt werden, dass das HSP 60 gleich dem LPS über die Interaktion mit dem CD14-Rezeptor mononukleäre Zellen zu aktivieren vermag. Über diesen Mechanismus kam es zu einer vermehrten Freisetzung von TNF- α , IL-6 und NO aus humanen Monozyten (Kol, A. *et al.* 2000, Panjwani, N.N. *et al.* 2002). Die erhobenen Daten bezüglich der HSP 60-mRNA-Konzentration in den Darmproben zeigen, dass es zu einer 1,66-fachen Konzentrationserhöhung des HSP 60 unter LPS-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle kommt. Im Gegensatz dazu liegt die Konzentration in den Darmproben der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe um den Faktor 2,38 unter der der Kontrolle. Damit

besteht eine Ähnlichkeit zu den Ergebnissen der HSP 70-Untersuchung, die ebenfalls eine Reduktion der HSP-Induktion nach Simvastatingabe demonstrieren konnten.

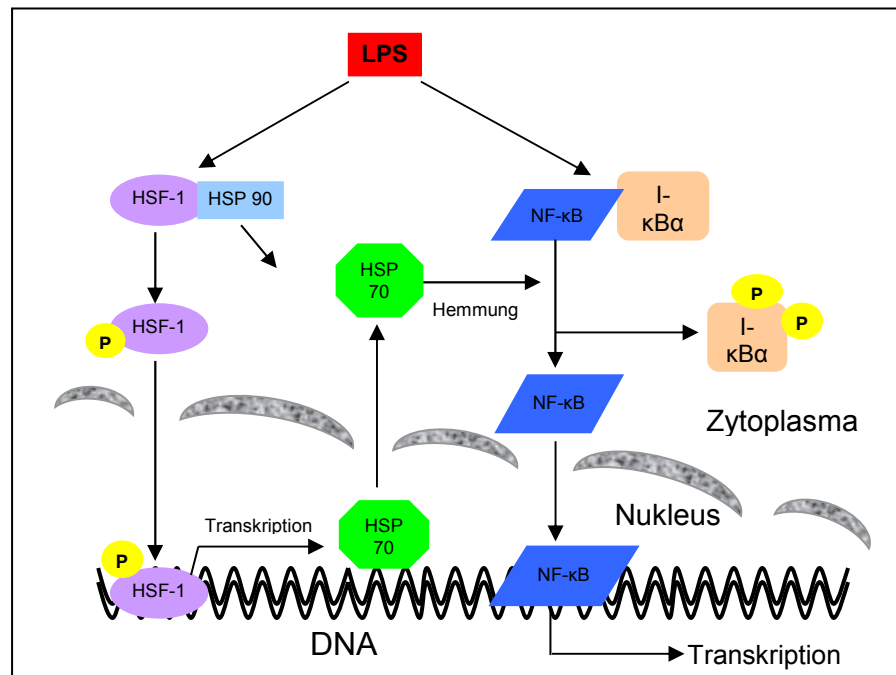


Abbildung 32: Hemmung von NF-κB durch HSP 70

LPS führt zur Translokation des HSF-1 unter Abspaltung von HSP 90 in den Zellkern, wo es zur Transkription von HSP 70 kommt. HSP 70 hemmt im Zytoplasma die Abspaltung von I-κBα von NF-κB. Die Transkription proinflammatorischer Substanzen wird dadurch gehemmt.

Das HSP 27 repräsentiert einen Vertreter der HSP-Familie, dessen Bedeutung noch wenig untersucht ist. Die hierzu veröffentlichten Arbeiten gehen von zytoprotektiven Wirkungen aus, die sich mit steigenden Konzentrationen dieses Hitzeschockproteins entfalten. Vornehmlich die Hemmung der Sauerstoffradikalfreisetzung, die Sekretion von IL-10 aus humanen Monozyten und die Hemmung der TNF-α-induzierten Apoptose wurden als Mechanismen der Zytoprotektion identifiziert. Die Darmproben zeigen eine geringe Konzentrationserhöhung für die HSP 27-mRNA in der LPS-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe. Diese wird durch die zusätzliche Gabe von Simvastatin erhöht, und erreicht ihr Maximum in der Sham-Gruppe mit dem 5,47-fachen Wert der Kontrolle. Zum einen bekräftigt dies die These, dass es unter LPS-Reiz zu einer HSP-27-Induktion kommt, zum anderen könnte man dem Simvastatin ein HSP 27-induzierendes Potential zusprechen, welches stärker als das des LPS zu sein scheint. Interessanterweise kommt es in der LPS-plus-Simvastatingruppe nicht zu einer Addition dieser Effekte. Forschungsdaten, die sich mit der Auswirkung des Simvastatins auf die HSP 27-Induktion befassen liegen nicht vor. Inwieweit diese

Veränderungen dem Simvastatin oder dem LPS zuzuordnen sind, bleibt in der vorliegenden Studie ungeklärt.

Die Analyse der HSP-mRNA-Konzentrationen in den Herzproben zeigt, dass es unter LPS-Gabe in allen drei untersuchten HSP-Familien zu einer Steigerung der Expression kommt. Deutlicher tritt dies in Augenschein im Falle des HSP 27 und des HSP 70 mit rund 1,8-fach erhöhten Kontrollwerten, während das HSP 60 mit einem rund 1,2-fach erhöhten Kontrollwert nur gering stärker exprimiert wird. In den dazugehörigen LPS-plus-Simvastatin-Gruppen und Sham-Gruppen findet man eine verminderte HSP-Induktion, die unter der der Kontrollgruppe liegt. Der aktuelle wissenschaftliche Kenntnisstand geht davon aus, dass die Induktion von HSP 70 in Kardiomyozyten eine präventive Wirkung gegenüber der gestörten Herzfunktion im hämorrhagischen- und septischen Schock, als auch in Ischämie-Reperfusionsmodellen besitzt (Lau, S.S. *et al.* 2000). Die HSP 70-Induktion koinzidiert mit einer verminderten TNF- α -Freisetzung, was sich positiv auf die Kontraktilität des Herzens auswirkt (Meng, X. *et al.* Harken, A.H. 2002). In der vorliegenden Studie stellt sich das LPS als HSP-Induktor in den Herzzellen dar. Die Gabe von Simvastatin führte zu einer Hemmung der Induktion aller untersuchter HSPs.

Bolder, U. *et al.* (2002) erkannten die protektiven Effekte der HSP-Induktion durch Hyperthermie bei LPS-Gabe auf die Leberfunktion. Es fand sich ein verbesserter Gallensäuretransport nach HSP 70- und HSP 25-Induktion im Vergleich zu nicht vorbehandelten Tieren. Unsere Ergebnisse dokumentieren einen mehr als 18-fachen Anstieg der HSP 70-mRNA-Konzentration in der LPS-Gruppe, der auf das 7,5-fache in der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe abgeschwächt wird. In Anbetracht der verbesserten Überlebenszeiten der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe und des histopathologischen Befundes ist dieser Effekt auf eine präventive Wirkung des Statins hinsichtlich des Zellstress im Rahmen der Endotoxämie zurückzuführen.

Im Falle des HSP 27, steigt die Konzentration nach LPS-Gabe deutlich gegenüber der Kontrolle an, und ist weniger ausgeprägt nach vorheriger Simvastatinapplikation. Diese Daten sind bis dahin vergleichbar mit denen der HSP 70-Reihe.

Die HSP 60-Analyse der Leberproben der LPS-Versuchsreihe unterscheidet sich stark von den bisher beschriebenen Ergebnissen, da man lediglich in der Sham-Gruppe eine Erhöhung des HSP 60 erkennt, während die übrigen Versuchsgruppen Werte annehmen, die unter dem der Kontrolle liegen. Eine Erklärung hierfür ist nicht eindeutig ersichtlich und lässt sich auch aus der gegenwärtigen Literatur nicht ableiten.

Zusammenfassend sind die Funktionen und der Stellenwert der Hitzeschockproteine im Rahmen inflammatorischer Vorgänge wenig untersucht und somit weitestgehend unklar. Hypothesen diesbezüglich können mit Blick auf die erhobenen Daten formuliert

werden. Generell scheint zum Verständnis der Zusammenhänge weiterhin ein erheblicher Forschungsbedarf zu bestehen.

5.6. NF- κ B-Regulation im Endotoxinschock

Eine zentrale Rolle bei der Generierung einer entzündlichen Reaktion auf zellulärer Ebene besitzt der Transkriptionsfaktor NF- κ B. Eine Vielzahl von Stimuli sind bisher identifiziert worden, die eine Aktivierung des NF- κ B bedingen, so auch das LPS (Boone, D.L. *et al.* 2002). Die Inhibition der Transkription durch den NF- κ B wird vor allem durch die I- κ Bs über ein negatives Feedback bewerkstelligt. Diese Mechanismen spielen sich sowohl im Zytosol ab, wo I- κ Bs den NF- κ B binden und so seine Translokation in den Nukleus hemmen, als auch im Nukleus selbst, wo I- κ Bs NF- κ B-Bindungsstellen an der DNA blockieren, oder aber durch Bindung an den NF- κ B selbst diesen ins Zytosol zurücktransportieren. Dementsprechend müssten erhöhte I- κ B-Konzentrationen im Zytosol oder im Nukleus mit einer NF- κ B-Inhibition koinzidieren. Die Kinetik der I- κ Bs ist bis dato nicht vollständig geklärt. So fanden Weil, R. *et al.* (1997), dass es bei Makrophagen unter LPS-Stimulation zu einer Reduktion des I- κ B β kam, bei einer gleichzeitig erhöhten NF- κ B-Aktivität, wobei die Konzentrationen des I- κ B α bereits wieder normal oder sogar erhöht waren. Die weitere Analyse der Daten dieser Forschergruppe ergab, dass das neu synthetisierte I- κ B β hypophosphoryliert war, und in diesem Zustand in der Lage war, das I- κ B α zu binden, und so zu einer persistierenden NF- κ B-Aktivierung führte. In einem Experiment, das eine gesteigerte NF- κ B-Aktivierung in Lungenzellen nach hämorrhagischen Schock induzierte, fand man erhöhte I- κ B α -Werte. Aufgrund dieser Tatsache vermutet man andere Aktivierungsmechanismen des NF- κ B, zum Beispiel über eine verminderte bcl-3 Konzentration, die zur Aktivitätssteigerung über eine fehlende NF- κ B-Homodimerneutralisation führt.

Statine inhibieren die NF- κ B-Aktivierung, was in mehreren Arbeiten gezeigt werden konnte. Dies geschieht vermutlich über eine verminderte Aktivierung von RhoA, einem zytosolischen G-Protein, welches von der HMG-CoA-Reduktase abhängig ist. Gleichbedeutend konnte auch eine verminderte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1 β und Interleukin 6 festgestellt werden, die in ihrer Synthese NF- κ B-abhängig sind. Diese Effekte waren reversibel, wenn die Produkte der HMG-CoA-Reduktase dem Medium zugegeben wurden, und somit die Wirkung des Simvastatins verhindert wurde (Jacobson, J.R. *et al.* 2005, Xu, H. *et al.* 2006, Cernuda-Morollon, E. *et al.* 2006). In einer Untersuchung von Dichtl, W. *et al.* (2003) koinzidierte die hemmende Wirkung der Statine auf den NF- κ B mit einer Hochregulierung des I- κ B α . Dies würde bedeuten, dass die Statine entweder das I- κ B α induzieren, oder dass es

unter Statintherapie zu einer verminderten Degradierung des I- κ B α durch die I- κ B Kinasen kommt. Ob die Statine direkt Einfluss auf die Transkription besitzen ist nicht bekannt, ebenso könnten diese Veränderungen über andere, weitgehend unbekannte, Signalkaskaden erzeugt werden. Abbildung 33 stellt schematisch die Zusammenhänge dar.

In der LPS-Gruppe zeigt sich in den Darmproben eine Erhöhung der I- κ B α -mRNA-Konzentration um den Faktor 2,49 verglichen mit der Kontrollgruppe. Bei gleichzeitiger Simvastatingabe konnte diese Steigerung auf den Faktor 1,14 reduziert werden, während die alleinige Gabe des Statins zu einer Steigerung der mRNA-Konzentration um den Faktor 1,66 führte. Zusammengefasst scheinen also sowohl das LPS, als auch das Simvastatin eine induzierende Wirkung auf das I- κ B α zu besitzen, die sich jedoch nicht summiert, wenn beide Substanzen appliziert wurden. Dies unterstützt erstens die These, dass das Simvastatin eine I- κ B α -induzierende Wirkung besitzt, und zweitens, dass es unter LPS-Stimulation via verstärkter Transkription zu einer Steigerung der I- κ B α -Synthese kommt. Bisher überwiegen in-vitro-Untersuchungen, die nicht die hämodynamischen Auswirkungen auf die Organintegrität, und den dadurch veränderten Zellmetabolismus erfassen. Aufgrund dessen könnten zusätzliche pathophysiologische Faktoren auf Zellen einwirken, die die I- κ B α -Kinetik beeinflussen. Ein weiteres Problem beim Vergleich dieser Daten mit bereits veröffentlichten Ergebnissen anderer Untersucher besteht darin, dass bisher kaum die zeitliche Abfolge der I- κ B α -Konzentrationsveränderungen unter septischen Bedingungen erforscht wurde. Liu, S.F. *et al.* (1999) berichteten, dass es zu einer starken Abnahme der I- κ B α -Konzentration eine Stunde nach LPS-Applikation in einer in-vivo-Studie an Ratten kam. Die vorliegende Untersuchung beschreibt erstmalig eine Erhöhung der I- κ B α -Konzentration nach LPS-Stimulation in Darmproben. Zusätzlich wird eine Verminderung dieses Effekts unter Statingabe beschrieben. Den NF- κ B selbst konnte man mit Hilfe des cDNA Expression Array nicht detektieren, weshalb man über seinen Aktivitätszustand nur indirekte Aussagen machen kann. Da es bei der Bestimmung der MPO-Aktivität in den Darmproben – als Abbild der erhöhten Granulozyteninfiltration - zu einer deutlichen Aktivitätszunahme kam, und die Expression von Zelladhäsionsmolekülen vom NF- κ B gesteuert wird, könnte man von einer gesteigerten Aktivität ausgehen. Die Abnahme der MPO-Aktivität in den Darmproben unter Simvastatinvorbehandlung ist konkordant mit der geringeren I- κ B α -mRNA-Konzentration in der cDNA-Expressions-Analyse.

Die Herzproben zeigten in Analogie zu den Darmproben eine Erhöhung der I- κ B-mRNA-Konzentration unter LPS-Gabe. Jedoch inhibiert das Simvastatin stärker die I- κ B α -Synthese als in den Darmproben. Als indirekter Parameter der NF- κ B-Aktivierung

dient hier das VCAM-1, das in seinem Expressionsausmaß an den NF- κ B gebunden ist. Das VCAM-1 zeigt in Übereinstimmung mit anderen Autoren eine erhöhte Expression in der LPS-Gruppe, die durch die Simvastatingabe reduziert werden kann. In ähnlicher Weise gilt dies auch für das Integrin β_1 , dessen Expression auf Zelloberflächen ebenfalls durch den NF- κ B reguliert wird (Wang, J.H. *et al.* 2003, Cernuda-Morollon, E. *et al.* Ridley, A.J. 2006). Eine deutlich erhöhte Konzentration an Integrin β_1 ist in der LPS-Gruppe zu erkennen, die unterhalb der physiologischen Konzentration der Kontrollgruppe liegt, wenn die Tiere mit Simvastatin vorbehandelt wurden. Dies entspricht und unterstützt die Daten der VCAM-1-Bestimmung und deutet in gleicher Weise auf einen erhöhten NF- κ B-Aktivierungszustand nach LPS-Gabe hin, der durch die antiinflammatorische Wirkung des Simvastatins vermindert werden kann.

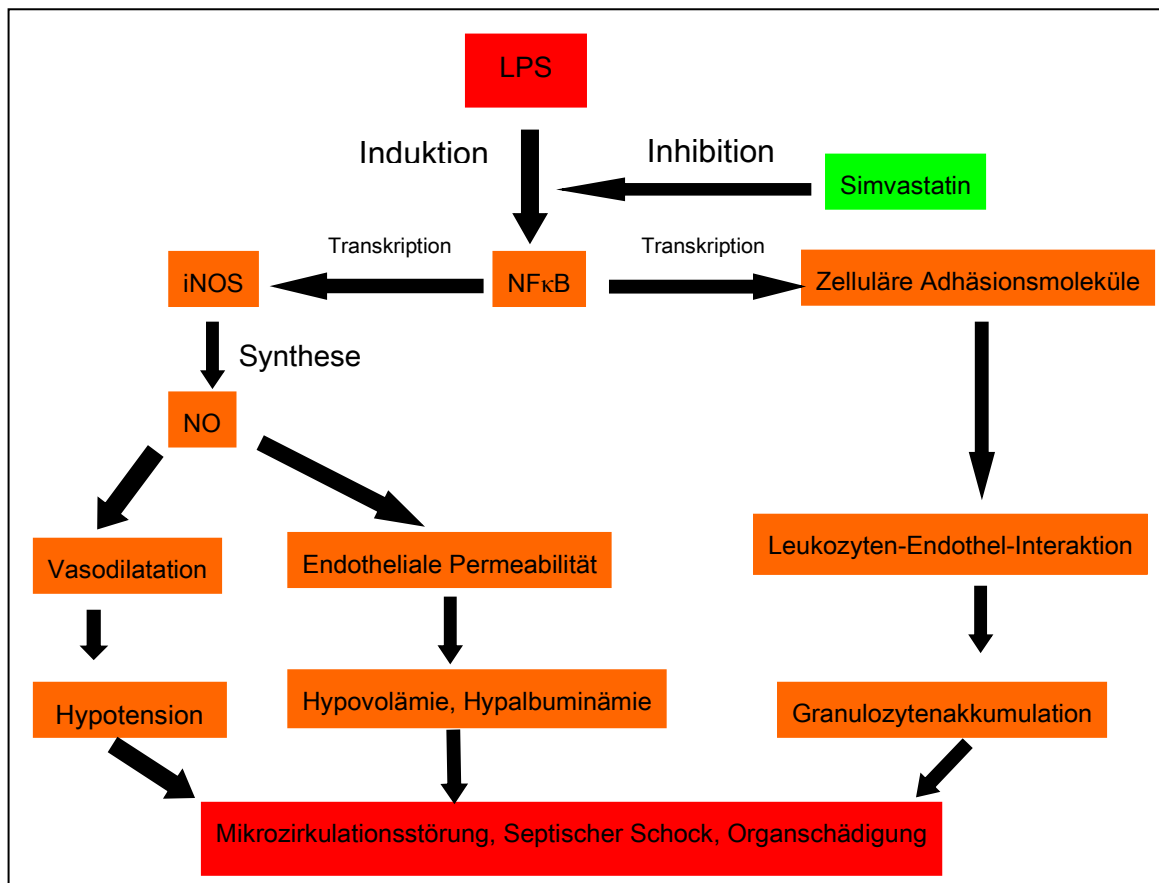


Abbildung 33: Schema zur Pathophysiologie im Endotoxinschock. Bedeutung des NF κ B sowie die Effekte des Simvastatins

Bei den Herzproben der LPS-Versuchsreihe konnte zusätzlich das p 105 analysiert werden. Das p 105 besitzt als Homodimer die gleiche Funktion wie das I- κ B α , da es die DNA-Bindungsstellen des NF- κ B maskiert und dadurch die Transkription hemmt. Die erhobenen Daten unterstreichen die Ergebnisse für das I- κ B α : Man erkennt eine

deutliche Erhöhung der p 105-mRNA-Konzentration in der LPS-Gruppe, die bei der Gabe des Statins unter der Kontrollgruppe liegt. Aufgrund der geringen wissenschaftlichen Datenlage können die Erklärungen hierfür nur hypothetischer Natur sein. Die Steigerung der I- κ B- und p 105-Transkription könnte im Rahmen der stärkeren NF- κ B-Aktivierung auftreten. Dies führt nach derzeitigem Kenntnisstand zu einer Hemmung der Transkription im Sinne eines negativen Feedbacks. Zu welchem Zeitpunkt dies jedoch nach LPS-Gabe eintritt ist bislang nicht sicher bekannt. Die einzigen Quellen hierzu berichten über eine Steigerung der I- κ B α -Konzentration innerhalb von zwei Stunden nach dem schädigenden Ereignis, bei initialem Konzentrationsabfall. Demzufolge wären theoretisch erhöhte Konzentrationen möglich. Indirekt könnten jedoch auch andere Faktoren interagieren, wie zum Beispiel das TNF- α oder das IL-1 β , die als Induktoren des NF- κ B beschrieben sind. Die geringeren Konzentrationen in der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe könnten zum einen mit der Wirkung des Statins auf die Transkription direkt erklärt werden, zum anderen könnten diese Effekte indirekt über eine Hemmung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine durch das Statin und einer damit einhergehenden verminderten Transkription des I- κ B α und des p 105 verknüpft sein.

5.7. Genregulation der Adhäsionsmoleküle im Endotoxinschock

Die veränderte Leukozyten-Endothel-Interaktion, stellt einen zentralen pathophysiologischen Faktor der Entzündung und der Sepsis dar. In der Vergangenheit konnte vielfach die zelladhäsionshemmende Wirkung der Statine nachgewiesen werden. Diese beruht auf der verminderten Expression von Selektinen, CAMs und Integrinen durch Interaktion mit dem NF- κ B und dem NO-Metabolismus (Kim, C.D. *et al.* 2000, Wei, C.Y. *et al.* 2006).

Für die β_1 -Integrinuntereinheit in Herzzellen fanden wir eine Erhöhung der mRNA-Konzentration um den Faktor 6 in der LPS-Gruppe verglichen mit der Kontrolle. Die Simvastatingabe senkte diesen Wert unter den der Kontrollgruppe ab, als Zeichen einer antiadhäsiven Wirkung des Simvastatins auf die Leukozyten. Auf welchem Weg dies durch die Statine erreicht wird ist derzeit nicht vollständig bekannt. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte man einen ähnlichen Mechanismus wie bei den Selektinen vermuten, die gleichsam unter Kontrolle des NF- κ B stehen. Über die hier beobachtete Hemmung des NF- κ B könnte es dann zu einer verminderten Synthese des Integrin β_1 kommen.

Die VCAM-1-mRNA-Konzentration der Kardiomyozyten wurde durch das LPS um nahezu den Faktor 2,4 gegenüber der Kontrolle erhöht. Auch hier findet sich eine antiadhäsive Wirkung des Simvastatins auf die Leukozyten, da die mRNA-

Konzentration in der LPS-plus-Simvastatin-Gruppe nur rund 1,9mal höher war als in der Kontrolle. Diese Ergebnisse unterstreichen die Aussagen anderer Untersucher, die die gleichen Effekte unter Statintherapie sahen (Laufs, U. *et al.* 1998, Pruefer, D. *et al.* 1999, Lefer, A.M. *et al.* 1999, Rasmussen, L.M. *et al.* 2001, Cernuda-Morollon, E. *et al.* 2006, Ridley, A.J. 2006, Grommes, J. *et al.* 2012). Obwohl dies eine erhöhte Neutrophilenakkumulation in den Herzproben, und demzufolge auch erhöhte MPO-Werte erwarten lassen würde, fand man keine statistisch signifikanten MPO-Konzentrationsveränderungen. Die Ursache, weshalb keine erhöhten MPO-Werte zu messen waren, könnte darin liegen, dass bereits nach vier Stunden die Organe entnommen wurden. Innerhalb dieser Zeitspanne könnte die Granulozyteninfiltration noch nicht zu signifikanten Veränderungen verglichen mit den Kontrolltieren führen. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass das Maximum der Granulozyteninfiltration in den entsprechenden Geweben von vielen Autoren erst nach oder in der sechsten Stunde nach dem Toxinreiz angegeben wird. Die Arbeit von Raeburn, C.D. *et al.* (2001) hat einen vergleichbaren Versuchsaufbau bei Mäusen und zielte darauf ab, die Herzfunktion und die VCAM-1-Expression in Verbindung zu bringen. Nach einer in-vivo-LPS-Gabe von 0,5 mg/kg zeigte sich nach 6 Stunden eine Erhöhung der immunfluoreszenten Aktivität von VCAM-1 in den Herzen um den Faktor 8. Daneben fand man eine über 5-fach gesteigerte Zahl an Neutrophilen. Die Verabreichung von VCAM-1-Antikörpern konnte diese Effekte gänzlich hemmen, was die pathophysiologischen Zusammenhänge verdeutlichte.

5.8. Klinische Bedeutung und Einsatz des Simvastatins in der Sepsis

Seitdem Endo, A. *et al.* 1976 von der Entdeckung eines spezifischen Inhibitors des Enzyms 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA Reduktase berichteten, fanden dieser und seine Abkömmlinge zunehmend Verwendung unter klinischen Indikationsstellungen. Der Einsatz von HMG-CoA Reduktase Inhibitoren zur Reduktion der kardiovaskulären Morbidität und Mortalität konnte in primären und sekundären Präventionsstudien eindeutig nachgewiesen werden (4S Study Group 1994, Shepherd, J. *et al.* 1995). Obwohl neben der lipoproteinsenkenden Wirkung bereits weitere Teileffekte der Statine erkannt wurden, sind deren genaue Wirkmechanismen noch weitestgehend ungeklärt. Eine Vielzahl an Untersuchungen konnte in der letzten Zeit die Summe der Teileffekte auf die Interaktion mit dem NF- κ B, der Rho-Kinase und dem NO-Metabolismus fokussieren.

Insbesondere der Einsatz unter ischämischen Bedingungen wie dem Ischämie-Reperfusionsschaden, der Sepsis und dem septischen Schock ist noch genauer zu evaluieren. Obwohl der mögliche therapeutische Benefit unter solchen Konditionen in

in-vitro-Untersuchungen abgeschätzt werden kann, fehlt es im besonderen Maße an *in-vivo*-Studien, die Licht in die pathophysiologischen Zusammenhänge der Entzündung und die therapeutische Potenz der Statine bringen könnten. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass Simvastatin im Endotoxinschock positive Effekte auf die Makro- und Mikrozirkulation, die Leukozyten-Endothel-Interaktion und die Inhibition einer proinflammatorischen Antwort auf zellulärer Ebene hat. Als Resultat dieser Effekte erkennt man bei den statinbehandelten Tieren eine Verlängerung der mittleren Überlebenszeit. Die vorliegenden Untersuchungen konnten eine verminderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen und auch eine Hemmung des NF- κ B beschreiben, jedoch war es zum überwiegenden Teil nicht möglich eine verminderte entzündliche Infiltration der geschädigten Organe festzuhalten, was am ehesten mit dem nur vierstündigen Beobachtungszeitraum zu erklären ist. Daraus ergibt sich die Nachfrage nach Studien, denen eine längere Versuchszeitspanne zugrunde liegt. Daneben deuten die Ergebnisse auf eine Involvierung der HSP-Familie in das pathophysiologische Geschehen hin, deren Abklärung interessante Ansätze in der Diagnostik und Therapie des septischen Schocks liefern könnte. Die Abbildungen 34 und 35 fassen die Effekte des Simvastatins in der Sepsis im Allgemeinen und im Speziellen mit Blick auf die vorliegende Arbeit graphisch zusammen.

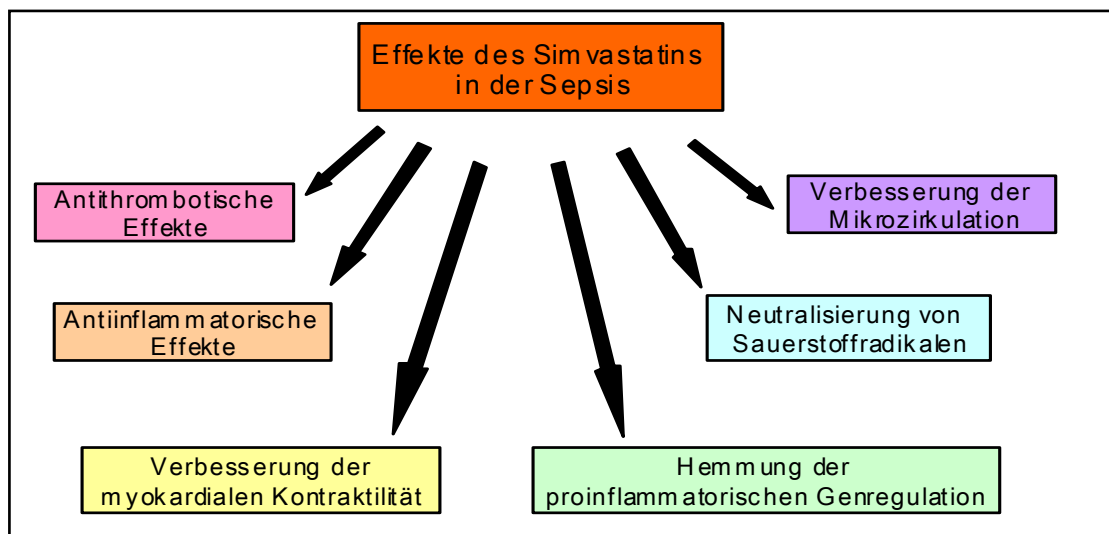


Abbildung 34: Allgemeine Effekte des Simvastatins in der Sepsis

Der klinische Vorteil der Statine im Vergleich zu den bislang untersuchten Antikörpern gegen unterschiedliche Bestandteile der Entzündung besteht in ihrem geringeren Spektrum an Nebenwirkungen. Nebenwirkungen sind häufig gastrointestinaler Art; selten sind myopathische Erkrankungen. Statine scheinen eine eher entzündungsmodulierende Wirkung zu haben, als eine komplett blockierende, woraus

sich aufgrund der Blockade eines physiologischen und essentiellen Mechanismus negative Veränderungen ergeben könnten.

Die Sepsis, der septische Schock und die damit verknüpften Komplikationen stellen ein pathophysiologisch komplexes Zusammenspiel aus Makro- und Mikrozirkulation dar, das durch die Funktion unterschiedlicher Zellsysteme, Mediatorenkaskaden und durch die pathogenetische Eigenschaft der auslösenden Erreger beeinflusst wird. Die Relevanz der einzelnen Parameter ist noch nicht vollständig geklärt. Der derzeitige Stand der Wissenschaft stellt ein Sammelsurium verschiedener therapeutischer Ansätze dar, die in unterschiedlicher Weise erfolgversprechend erscheinen. Mit der Statinbehandlung in der Sepsis wird versucht, in das komplex regulierte Entzündungssystem einzugreifen. Mehrere klinische Studien konnten in den letzten Jahren positive Effekte der Statine in der Sepsis nachweisen, wenngleich diese Effekte in den multivariaten statistischen Analysen aufgrund der Heterogenität der Patientengruppen egalisiert wurden. Durch weitere, bestenfalls prospektive randomisierte Studien, könnten sich aus den Erkenntnissen dieser und anderer Arbeiten therapeutische Perspektiven und weitere Indikationen für die Statine ableiten.

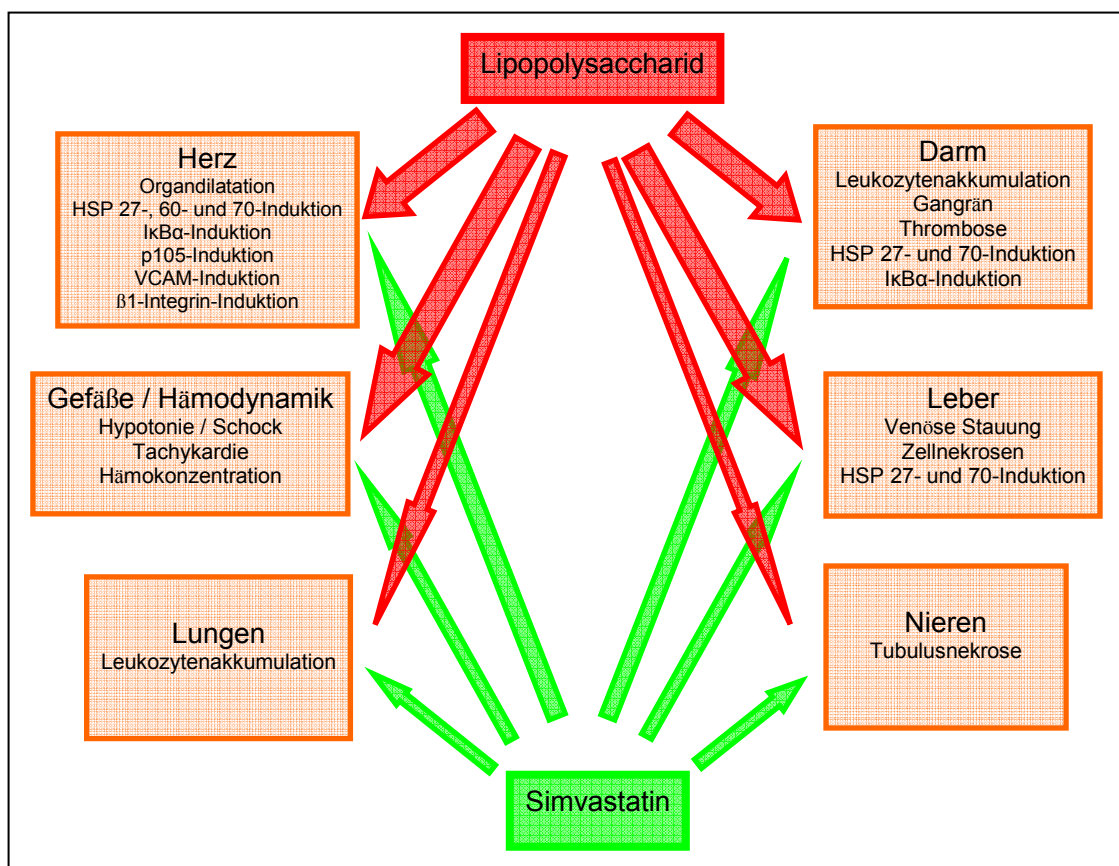


Abbildung 35: Effekte des Lipopolysaccharids (*E. coli*, Serotyp O127:B8, 10mg/kg) und des Simvastatins (100 µg/kg) auf die untersuchten Schockorgane im 4-stündigen Rattenmodell.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Männlichen Ratten wurde 10 mg/kg Lipopolysaccharid von E.coli verabreicht. 24 Stunden vor der Toxinapplikation erhielt ein Teil der Tiere eine einmalige Gabe von 100 µg/kg Simvastatin. Mittels invasivem Monitoring wurden die hämodynamischen Parameter sowie der Hämatokrit festgehalten. Nach 240 Minuten oder nach Versterben der Tiere wurden Lunge, Leber, Herz, Niere und Darm entnommen. Die Organproben dienten der Myeloperoxidaseaktivitätsmessung, der histologischen Aufarbeitung mittels HE-Färbung sowie der Bestimmung der mRNA-Expression.

Die LPS-Injektion führte zu einem statistisch signifikanten Absinken des mittleren arteriellen Blutdrucks mit kompensatorischer Tachykardie und zum vorzeitigen Versterben im septischen Schock. Die mit Simvastatin vorbehandelten Tiere blieben kreislaufstabil. Durch die endotheliale Schrankenstörung kam es zu einer Hämokonzentration nach LPS-Gabe, welche durch eine Statinapplikation verhindert werden konnte.

Die LPS-Gabe führte zu einer erhöhten Myeloperoxidaseaktivität in der Lunge und im Dünndarm, welche durch die Applikation von Simvastatin gesenkt werden konnte.

Das LPS verursachte deutlich erkennbare histologische Veränderungen vornehmlich in Darm, Leber und Niere, die dem morphologischen Bild des septischen Schocks entsprechen. Die Applikation von Simvastatin konnte die histologischen Veränderungen reduzieren, beziehungsweise vollständig verhindern.

LPS induzierte in den Herzproben eine verstärkte Transkription des VCAM-1 und des Integrin β_1 verglichen mit den statinbehandelten Tieren. Daraus könnte auf eine verminderte NF- κ B-Aktivität unter Therapie mit dem Statin geschlossen werden. Simvastatin verursachte bei den Hitzeschockproteinen 27, 60 und 70 in den Organen Leber, Herz und Darm eher eine Verminderung der mRNA-Konzentrationen, was auf eine Verminderung des Zellstress unter Statinmedikation hindeutet.

Die akut inflammatorischen Effekte des LPS führen zu einer pathophysiologischen Hämodynamik, einer gestörten endothelialen Schrankenfunktion und zu einer verstärkten Leukozyten-Endothel-Interaktion mit entsprechenden Organschädigungen. Diese pathologischen Vorgänge können durch die antiinflammatorischen Effekte von Simvastatin sowohl direkt vaskulär als auch indirekt auf genregulatorischer Ebene vermindert werden. Die Folge davon ist eine verminderte Mortalitätsrate. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Statinapplikation ein möglicher Ansatz in der Therapie der Sepsis und in der Reduktion des damit verbundenen Multiorganversagens darstellt.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Al Harbi, S.A., Tamim, H.M., Arabi, Y.M. (2011) Association between statin therapy and outcomes in critically ill patients: a nested cohort Study. *BMC Clinical Pharmacology*, 6;11:12

Alvarez de Sotomayor, M., Vega, S., Mingorance, C., Marhuenda, E., Herrera, M.D. (2008) Effects of HMG-CoA reductase inhibition by simvastatin on vascular dysfunction induced by lipopolysaccharide in rats. *Pharmacology* 82(2):89-96.

Amberger, A., Maczek, C., Jurgens, G., Michaelis, D., Schett, G., Trieb, K., Eberl, T., Jindal, S., Xu, Q., Wick, G. (1997) Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. *Cell Stress & Chaperones* 2(2):94-103

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference 1992: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical Care Medicine* 20(6):864-74.

Armstead, V.E., Minchenko A.G., Schuhl, R.A., Hayward, R., Nossuli, T.O., Lefer, A.M. (1997) Regulation of P-Selektin expression in human endothelial cells by nitric oxide. *American Journal of Physiology* 273(2 Pt 2):H740-6

Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph.U. (1997) *Pathologie Urban & Schwarzenberg-Verlag*, München, Wien, Baltimore

Bolder, U., Schmidt, A., Landmann, L., Kidder, V., Tange, S., Jauch, K.W. (2002) Heat stress prevents impairment of bile acid transport in endotoxemic rats by a posttranscriptional mechanism. *Gastroenterology* 122(4):963-73

Boone, D.L., Lee, E.G., Libby, S., Gibson, P.J., Chien, M., Chan, F., Madonia, M., Burkett, P.R., Ma, A. (2002) Recent advances in understanding NF-kappaB regulation. *Inflammatory Bowel Diseases* 8(3):201-12

Brun-Buisson, C., Doyon, F., Carlet, J. (1996) Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. *French*

Bacteremia-Sepsis Study Group. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 154(3 Pt 1):617-24

Buerke, M., Schwertz, H.-J., Seitz, W., Meyer, J., Darius, H. (2001) Novel small molecule inhibitor of C1s exerts cardioprotective effects in ischemia-reperfusion injury in rabbits. Journal of Immunology 167(9):5375-80

Buerke, M., Sibelius, U., Grandel, U., Buerke, U., Grimminger, F., Seeger, W., Meyer, J., Darius, H. (2002) Staphylococcus aureus alpha toxin mediates polymorphonuclear leukocyte-induced vasocontraction and endothelial dysfunction. Shock 17(1):30-35

Buerke, U., Carter, J.M., Schlitt, A., Russ, M., Schmidt, H., Sibelius, U., Grandel, U., Grimminger, F., Seeger, W., Mueller-Werdan, U., Werdan, K., Buerke, M. (2008) Apoptosis contributes to septic cardiomyopathy and is improved by simvastatin therapy. Shock 29(4):497-503

Carlos, T.M., Harlan, J.M. (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood 84(7):2068-101

Cernuda-Morollon, E., Ridley, A.J. (2006) Rho GTPases and leucocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells. Circulation Research 98:757

Chen, C.H., Lee, R.P., Wu, W.T., Liao, K.W., Hsu, N., Hsu B.G. (2007) Fluvastatin ameliorates endotoxin induced multiple organ failure in conscious rats. Resuscitation 74(1):166-74

Crockett-Torabi, E. (1998) Selectins and mechanisms of signal transduction. Journal of Leukocyte Biology 63(1):1-14

Dichtl, W., Dulak, J., Frick, M., Alber, H.F., Schwarzacher, S.P., Ares, M.P., Nilsson, J., Pachinger, O., Weidinger, F. (2003) HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 23(1):58-63

Endo, A., Kuroda, M., Tsujita, Y. (1976) ML-236°, ML-236-B and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by Penicillium citrinum. Journal of Antibiotics 29:1346-1348

Endres, M., Laufs, U. (2004) Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke* 35(11 Suppl.1): 2708-11

Falagas, M.E., Makris, G.C., Matthaïou, D.K., Rafailidis, P.I. (2008) Statins for infection and sepsis: a systematic review of clinical evidence. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61(4):774-85

Filep, J.G., Delalandre, A., Beauchamp, M. (1997) Dual role of nitric oxide in the regulation of plasma volume and albumin escape during endotoxin shock in conscious rats. *Circulation Research* 81(5):840-7

Fraunberger, P., Gröne, E., Gröne, H.J., Walli, A.K. (2009) Simvastatin reduces endotoxin-induced nuclear factor kappaB activation and mortality in guinea pigs despite lowering circulating low-density lipoprotein cholesterol. *Shock* 32(2):159-63.

Geerdes, H.F., Ziegler, D., Lode, H., Hund, M., Loehr, A., Fangmann, W., Wagner, J. (1992) Septicemia in 980 patients at a university hospital in Berlin: prospective studies during 4 selected years between 1979 and 1989. *Clinical Infectious Diseases* 15(6):991-1002

Gerli, R., Gresele, P., Bistoni, O., Paolucci, C., Lanfranccone, L., Fiorucci, S., Muscat, C., Costantini, V. (2001) Salicylates inhibit T cell adhesion on endothelium under nonstatic conditions: induction of L-selectin shedding by a tyrosine kinase –dependent mechanism. *Journal of Immunology* 166(2):832-40

Ghosh S., Karin M. (2002) Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl:S81-96.

Grandel, U., Reutemann, M., Kiss, L., Buerke, M., Fink, L., Bournelis, E., Heep, M., Seeger, W., Grimminger, F., Sibeliu, U. (2002) Staphylococcal alpha-toxin provokes neutrophil dependent cardiac dysfunction: role of ICAM-1 and cys-leukotrienes. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology* 282(3):H1157-65

Grandel, U., Sibeliu, U., Schrickel, J., Schmidt, D., Buerke, M., Fink, L., Bournelis, E., Heep, M., Mayer, K., Bohle, R.M., Seeger, W., Grimminger, F. (2001) Biosynthesis of constitutive nitric oxide synthase-derived nitric oxide attenuates coronary

vasoconstriction and myocardial depression in a model of septic heart failure induced by *Staphylococcus aureus* α -toxin. *Critical Care Medicine* 29(1):1-7

Grommes, J., Vijayan, S., Drechsler, M., Hartwig, H., Mörgelin, M., Dembinski, R., Jacobs, M., Koepfel, T.A., Binnebösel, M., Weber, C., Soehnlein, O. (2012) Simvastatin reduces endotoxin-induced lung injury by decreasing neutrophil recruitment and radical formation. *PLoS ONE* 7(6): e38917. doi:10.1371/journal.pone.0038917

Hashiguchi, N., Ogura, H., Tanaka, H., Koh, T., Nakamori, Y., Noborio, M., Shiozaki, T., Nishino, M., Kuwagata, Y., Shimazu, T., Sugimoto, H. (2001) Enhanced expression of heat shock proteins in activated polymorphonuclear leukocytes in patients with sepsis. *The Journal of Trauma* 51(6):1104-9

Hauser, G.J., Dayao, E.K., Wasserloos, K., Pitt, B.R., Wong, H.R. (1996) HSP induction inhibits iNOS expression and attenuates hypotension in endotoxin-challenged rats. *American Journal of Physiology* 271(6 Pt 2):H2529-35

Haziot, A., Ferrero, E., Kontgen, F., Hijiya, N., Yamamoto, S., Silver, J., Stewart, C.L., Goyert, S.M. (1996) Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. *Immunity* 4(4):407-14

Hoque, A.M., Papapetropoulos, A., Venema, R.C., Catravas, J.D., Fuchs, L.C. (1998) Effects of antisense oligonucleotide to iNOS on hemodynamic and vascular changes induced by LPS. *American Journal of Physiology* 275(3 Pt 2):H1078-83

Hordijk, P.L. (2006) Endothelial signaling events during leucocyte transmigration. *The FEBS Journal* 273:4408-4415

Imler, J.L., Hoffmann, J.A. (2000) Toll receptors in innate immunity. *Trends in Cell Biology* 11(7):304-11

Inoue, I., Itoh, F., Aoyagi, S., Tazawa, S., Kusama, H., Akahane, M., Mastunaga, G., Hayashi, K., Awata, T., Komoda, T., Katayama, S. (2002) Fibrate and statin synergistically increase the transcriptional activities of PPAR α /RXR α and decrease the transactivation of NF κ B. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290(1):131-9

Jacobson, J.R., Barnard, J.W., Grigoryev, D.N., Ma, S.-F., Tuder, R.M., Garcia, J.G.N. (2005) Simvastatin attenuates vascular leak and inflammation in murine inflammatory lung injury. *American Journal of Physiology* 288:L1026-L1032.

Johnson, D., Mayers, I. (2001) Multiple organ dysfunction syndrome: a narrative review. *Canadian Journal of Anaesthesia* 48(5):502-9

Kilbourn, R.G., Szabo, C., Traber, D.L. (1997) Nitric oxide and shock. *Disease-a-Month* 43(5):277-348

Kim, C.D., Kim, Y.K., Lee, S.H., Hong, K.W. (2000) Rebamipide inhibits neutrophil adhesion to hypoxia/reoxygenation-stimulated endothelial cells via nuclear factor- κ B-dependent pathway. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 294(3):864-69

Kol, A., Bourcier, T., Lichtman, A.H., Libby, P. (1999) Chlamydial heat shock protein 60s activate human vascular endothelium, smooth muscle cells, and macrophages. *Journal of Clinical Investigation* 103(4):571-7

Kopterides P., Falagas M.E. (2009) Statins for sepsis: a critical and updated review. *Clinical Microbiology and Infection* 15(4):325-34.

Kubes, P. et Granger, D.N. (1992) Nitric oxide modulates microvascular permeability. *American Journal of Physiology* 262(2 Pt 2):H611-5

Kurose, I., Kubes, P., Wolf, R., Anderson, D.C., Paulson, J., Miyasaka, M., Granger, D.N. (1993) Inhibition of nitric oxide production. Mechanisms of vascular albumin leakage. *Circulation Research* 73(1):164-71

Larsen, R. (1994) Schock. S.699-714. In: Benzer, H., Burchardi, H., Larsen, R., Suter, P.M. (Hrsgbr.) *Intensivmedizin*. 7. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona und Budapest

Lau, S.S., Griffin, T.M., Mestrl, R. (2000) Protection against endotoxemia by HSP 70 in rodent cardiomyocytes. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 278:H1439-1445

Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J., Liao, J.K. (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97(12):1129-35

Laufs, U., Liao, J.K. (1998) Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *Journal of Biological Chemistry* 273(37):24266-71

Lefer, A.M., Weyrich, A.S., Buerke, M. (1994) Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in ischemic-reperfusion injury. *Cardiovascular Research* 28(3):289-94

Lefer, A.M., Campbell, P., Shin, Y.K., Scalia, R., Hayward, R., Lefer, D.J. (1999) Simvastatin preserves the ischemic-perfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts. *Circulation* 100(2):178-84

Lefer, A.M., Scalia, R., Lefer, D.J. (2001) Vascular effects of HMG CoA reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovascular Research* 49(2):281-7

Lehr H.-A., Bittinger, F., Kirkpatrick, C.J. (2000) Microcirculatory dysfunction in sepsis: a pathogenetic basis for therapy? *Journal of Pathology* 190(3):373-86

Ley, K. (1996) Molecular mechanisms of leukocyte-recruitment in the inflammatory process. *Cardiovascular Research* 32(4):733-42

Liappis, A.P., Kan, V.L., Rochester, C.G., Simon, G.L. (2001) The effect of statins on mortality in patients with bacteremia. *Clinical Infectious Diseases* 33(8):1352-7

Liu, S.F., Ye, X., Malik, A.B. (1997) In vivo inhibition of nuclear factor-kappa B activation prevents inducible nitric oxide synthase expression and systemic hypotension in a rat model of septic shock. *Journal of Immunology* 159(8):3976-83

Mc Gown C.C., Brookes, Z.L. (2007) Beneficial effects of statins on the microcirculation during sepsis: the role of nitric oxide. *British Journal of Anaesthesia* 98(2):163-75

McLauchlan, G.J., Anderson, I.D., Grant, I.S., Fearon, K.C. (1995) Outcome of patients with abdominal sepsis treated in an intensive care unit. *British Journal of Surgery* 82(4):524-9

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A. Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388(6640):394-7

Mekontso Dessap A., Ouanes I., Rana N., Borghi B., Bazin C., Katsahian S., Hulin A., Brun-Buisson C. (2011) Effects of discontinuing or continuing ongoing statin therapy in severe sepsis and septic shock: a retrospective cohort study. *Critical Care* 15(4):R171.

Meng, X., Harken, A.H. (2002) The interaction between Hsp 70 and TNF- α expression: a novel mechanism for protection of the myocardium against post-injury depression. *Shock* 17(5):345-53

Merx M.W., Liehn E.A., Graf J., van de Sandt A., Schaltenbrand M., Schrader J., Hanrath P., Weber C. (2005) Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival. *Circulation* 112(1):117-24

Meyer, J., Lentz, C.W., Stothert, J.C. Jr., Traber, L.D., Herndon, D.N., Traber, D.L. (1994) Effects of nitric oxide synthesis inhibition in hyperdynamic endotoxemia. *Critical Care Medicine* 22(2):306-12

Nussler, A.K., Gansauge, S., Gansauge, F., Fischer, U., Butzer, U., Kremsner, P.G., Beger, H.G. (1998) Overexpression of endothelium-derived nitric oxide synthase isoform 3 in the vasculature of human pancreatic tumor biopsies. *Langenbeck's Archives of Surgery* 383(6):474-80

Panjwani, N.N., Popova, L., Srivastava, P.K. (2002) Heat Shock Proteins gp96 and HSP70 activate the release of nitric oxide by APCs. *Journal of Immunology* 168:2997-3003

Perera, P.Y., Vogel, S.N., Detore, D.R., Haziot, A., Goyert, S.M. (1997) CD 14-dependent and CD 14-independent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD 14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide or taxol. *Journal of Immunology* 158(9):4422-9

Pruefer, D., Scalia, R., Lefer, A.M. (1999) Simvastatin inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against inflammatory processes in normocholesterolemic rats. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 19(12):2894-900

Pruefer, D., Makowski, J., Schnell, M., Buerke, U., Dahm, M., Oelert, H., Sibelius, U., Grandel, U., Grimminger, F., Seeger, W., Meyer, J., Darius, H., Buerke, M. (2002) Simvastatin inhibits inflammatory properties of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Circulation* 106(16):2104-10

Pugin, J., Ulevitch, R.J., Tobias, P.S. (1993) A critical role for monocytes and CD 14 in endotoxin-induced endothelial cell activation. *Journal of Experimental Medicine* 178(6):2193-200

Raeburn, C.D., Calkins, C.M., Zimmermann, M.A., Song, Y., Ao, L., Banerjee, A., Meng, X., Harken, A.H. (2001) Vascular cell adhesion molecule-1 expression is obligatory for endotoxin-induced myocardial neutrophil accumulation and contractile dysfunction. *Surgery* 130(2):319-25

Reinhart, K., Brunkhorst, F.M., Bloos, S.F. (2003) Fortschritte in der Therapie der Sepsis. *Deutsches Ärzteblatt* 31-32:1731-1736

Rikitake, Y., Liao, J.K. (2005) Rho GTPases, Statins, and Nitric Oxide. *Circulation Research* 97:1232

4S Study Group (1994) Randomised of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344:1383-1389

S2 Leitlinie der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (2010)

Sands, K.E., Bates, D.W., Lanken, P.N., Graman, P.S., Hibberd, P.L., Kahn, K.L., Parsonnet, J., Panzer, R., Orav, E.J., Snyderman, D.R. (1997) Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *JAMA* 278(3):234-40

Schlag, G., Redl, H. (1994) Pathophysiologie des Multiorganversagens. S.725-738. In:

Benzer, H., Burchardi, H., Larsen, R., Suter, P.M. (Hrsgbr.) Intensivmedizin. 7. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona und Budapest

Schletter, J., Heine, H., Ulmer, A.J., Rietschel, E.T. (1995) Molecular mechanisms of endotoxin activity. *Archives of Microbiology* 164(6):383-9

Schmidt, H., Hennen, R., Keller, A., Russ, M., Müller-Werdan, U., Werdan, K., Buerke, M. (2006) Association of statin therapy and increased survival in patients with multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Medicine* 32(8):1248-51

Schoenberg, M.H., Weiss, M., Radermacher, P. (1998) Outcome of patients with sepsis and septic shock after ICU treatment. *Langenbeck's Archives of Surgery* 383(2):190-3

Schuster, H.P., Müller-Werdan, U.: Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen. In: Werdan, K., Schuster, H.P. (Hrsg.): Sepsis und MODS. Verlag Springer, 2005, Seite 4.

Shepherd, J., Cobbe, S.M., Ford, I., Isles, C.G., Lorimer, A.R., MacFarlane, P.W., McKillop, J., Packard, H. (1995) Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *New England Journal of Medicine* 333:1301-1307

Slutsky, A.S. (2002) Hot new therapy for sepsis and the acute respiratory distress syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 110(6):737-39

Sperandio, M. (2006) Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *The FEBS Journal* 273:4377-4389

Stroes, E.S., Koomans, H.A., de Bruin, T.W., Rabelink, T.J. (1995) Vascular function in the forearm of hypercholesterolaemic off and on lipid-lowering medication. *Lancet* 346(8973):467-71

Sutherland, C.L., Krebs, D.L., Gold, M.R. (1999) An 11-amino acid sequence in the cytoplasmic domain of CD40 is sufficient for activation of c-Jun N-terminal kinase, activation of MAPKAP kinase-2, phosphorylation of I kappa B alpha, and protection of

WEHI-231 cells from anti-IgM-induced growth arrest. *Journal of Immunology* 162(8):4720-30

Wang, J.H., Manning, B.J., Wu, Q.D., Blankson, S., Bouchier-Hayes, D., Redmond, H.P. (2003) Endotoxin/lipopolysaccharide activates NF-kappaB and enhances tumor cell adhesion and invasion through a beta 1 integrin-dependent mechanism. *Journal of Immunology* 170(2):795-804

Wei, C.Y., Huang, K.C., Chou, Y.H., Hsieh P.F., Lin, K.H., Lin W.W. (2006) The role of Rho-associated kinase in differential regulation by statins of interleukin-1 β and lipopolysaccharide-mediated NF- κ B activation and inducible-nitric-oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Molecular Pharmacology* 69:960-67

Weil, R., Laurent-Winter, C., Israel, A. (1997) Regulation of I κ B β degradation: similarities to and differences from I- κ B α . *Journal of Biological Chemistry* 272:9942-9949

Werdan, K., Müller-Werdan, U. (1996) Schock, Kollaps und akute Kreislaufinsuffizienz. S. 647-736. In: Erdmann, E., Riecker, G. (Hrsgbr.) *Klinische Kardiologie – Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße*. 4. Auflage. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg und New York

Xu, H., Liu, P., Liang, L., Danesh, F.R., Yang, X., Ye, Y., Zhan, Z., Yu, X., Peng, H., Sun, L. (2006) Rho-mediated tumor necrosis factor alpha-induced activation of NF-kappaB in rheumatoid synoviocytes: inhibitory effect of simvastatin. *Arthritis and Rheumatology* 54(11):3441-51

Yasuda H., Yuen P.S., Hu X., Zhou H., Star R.A. (2006) Simvastatin improves sepsis-induced mortality and acute kidney injury via renal vascular effects. *Kidney International* 69(9):1535-42

You W, Min X, Zhang X, Qian B, Pang S, Ding Z, Li C, Gao X, Di R, Cheng Y, Liu L. (2009) Cardiac specific expression of heat shock protein 27 attenuated endotoxin-induced cardiac dysfunction and mortality in mice through a p13k/Akt dependent mechanism. *Shock* 32(1):108-17

8 THESEN

1. Simvastatin reduziert innerhalb eines vierstündigen Schockmodells die Lipopolysaccharid-induzierte arterielle Hypotonie in Ratten.
2. Simvastatin verlängert die Überlebenszeiten von Ratten innerhalb eines vierstündigen septischen Schockmodells induziert durch ein Lipopolysaccharid.
3. Simvastatin reduziert in Ratten die endotheliale Permeabilitätsstörung im septischen Schock hervorgerufen durch ein Lipopolysaccharid.
4. Die Leukozytenakkumulation als indirekter Parameter für das inflammatorische Geschehen in einem Schockorgan kann im Dünndarm und in der Lunge von Ratten im septischen Schock durch die Simvastatingabe vermindert werden.
5. Die histopathologischen Veränderungen in den Schockorganen Dünndarm, Leber und Niere von Ratten nach Lipopolysaccharidgabe können durch die Simvastatingabe verhindert werden.
6. Die Konzentrationen der Hitze-Schock-Protein-mRNAs in den Schockorganen sind positiv mit der Ausprägung der Entzündung korreliert.
7. Simvastatin hemmt direkt oder indirekt die mRNA-Induktion der Hitze-Schock-Proteine 27-, 60- und 70.
8. Lipopolysaccharide aktivieren den NF- κ B-Transskriptionsfaktor. Dadurch kommt es zu einer vermehrten I- κ B- und p 105-Transkription in den Schockorganen Dünndarm und Herz von Ratten.
9. Simvastatin inhibiert die NF- κ B-Aktivierung.
10. Simvastatin hemmt die Granulozyteninfiltration im Schockorgan Herz durch Beeinflussung der Expression von Adhäsionsmolekülen.

Tabellarischer Lebenslauf

Angaben zur Person

Name:	Martin Gustav Otto Schnell
Anschrift:	Trottenweg 4 78234 Engen
Geburtsdatum:	31.10.1975
Geburtsort:	Rastatt
Familienstand:	Verheiratet, 2 Kinder
Nationalität:	deutsch

Schulischer Werdegang

09.1982 – 07.1986	Karl-Schurz-Schule, Karl-Schule, Rastatt
09.1986 – 08.1995	Ludwig-Wilhelm-Gymnasium, Rastatt
06/95	Abitur

Zivildienst

09.1995 – 08.1996	Schwerstbehindertenpflege
-------------------	---------------------------

Studium

10.1996 – 08.1998	Vorklinisches Studium/Universität Mainz
09.1998	Physikum
10.1998 – 07.1999	Klinisches Studium/Universität Mainz
08.1999	Erstes Staatsexamen
10.1999 – 07.2001	Klinisches Studium/Universität Mainz
10.2001 – 02.2002	Forschungssemester
04.2002	Zweites Staatsexamen
04.2002 – 04.2003	Praktisches Jahr am Klinikum Ludwigshafen
04.2003	Drittes Staatsexamen

Beruflicher Werdegang

- | | |
|-------------------|--|
| 07.2003 – 09.2004 | Arzt im Praktikum in der Abteilung für Gefäß-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Hegau-Klinikums Singen |
| 10.2004 – 03.2009 | Assistenzarzt in der Abteilung für Gefäß-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Hegau-Klinikums Singen |
| 04.2009 - 12.2010 | Facharzt für Allgemeine Chirurgie in der Abteilung für Allgemeine-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Hegau-Klinikums Singen |
| 01.2011 – 04.2012 | Oberarzt in der Klinik für Allgemeine-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Hegau-Klinikums Singen |
| Seit 05.2012 | Leitender Oberarzt in der Klinik für Allgemeine-, Viszeral- und Thoraxchirurgie des Hegau-Klinikums Singen / Radolfzell |

Martin Gustav Otto Schnell

Engen, den 08.11.2013

10. Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Des Weiteren erkläre ich, dass ich andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe. Ich habe die in den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen entsprechend gekennzeichnet.

Martin Gustav Otto Schnell

Engen, den 08.11.2013

11. Erklärung über frühere Promotionsversuche

Hiermit erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Dissertation an einer anderen Fakultät zum Zwecke der Promotion eingereicht habe.

Martin Gustav Otto Schnell

Engen, den 08.11.2013

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. M. Buerke für die freundliche Überlassung des Themas sowie die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Dank seiner Erfahrungen und seiner kreativen Anregungen war es mir möglich diese Arbeit zu gestalten und in den wissenschaftlichen Kontext zu setzen. Im Besonderen bedanke ich mich für seine aufbauenden Worte und seine Geduld.

Dank gebührt der damaligen Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit und die Nutzung methodischer Synergien.

Ich danke meinen Eltern und meinem Stiefvater, die mir das Studium der Medizin ermöglicht haben und mich stets motivierten, meine Arbeit fortzuführen. Im Besonderen gilt dies für meine Mutter Michaela.

Meiner eigenen Familie mit Sonja, Alexander und Lilly verdanke ich die Geduld, das Verständnis und die Liebe, die nötig waren, um diese Arbeit doch noch zu Ende zu bringen.